

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039736**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.04

(21) Номер заявки
201792032

(22) Дата подачи заявки
2016.03.14

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) **АНТИ-PDL1-АНТИТЕЛА, АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИ-PDL1-АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/133,231; 62/139,596; 62/218,883**

(32) **2015.03.13; 2015.03.27; 2015.09.15**

(33) **US**

(43) **2018.04.30**

(86) **PCT/US2016/022345**

(87) **WO 2016/149201 2016.09.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САЙТОМКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Уэст Джеймс Уильям, Мей Ли, Мур
Стефен Джеймс, Нгуйен Маргарет,
Хостеттер Дэниел, Васильева Ольга,
Сэйджерт Джейсон, Терретт Джонатан
(US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2011066389**
WO-A1-2015013671
WO-A2-2013163631

(57) Изобретение относится, в общем, к антителам, которые связываются с лигандом 1 полипептида программируемой смерти (PDL1), к активируемым антителам, которые специфически связываются с PDL1, и способам получения и применения этих анти-PDL1-антител и активируемых анти-PDL1-антител в различных терапевтических, диагностических и профилактических показаниях.

039736
B1

039736
B1

Настоящая заявка заявляет приоритет над предварительной заявкой США № 62/133231, поданной 13 марта 2015 г.; предварительной заявкой США № 62/139596, поданной 27 марта 2015 г.; и предварительной заявкой США № 62/218883, поданной 15 сентября 2015 г.; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится, в общем, к антителам, которые связываются с лигандом 1 полипептида программируемой смерти (PDL1), активируемым антителам, которые специфически связываются с PDL1, и способам получения и применения этих анти-PDL1-антител и активируемых анти-PDL1-антител в различных терапевтических, диагностических и профилактических показаниях.

Уровень техники

Лекарственные средства на основе антител доказали свою эффективность в лечении некоторых заболеваний, но в ряде случаев токсичность в результате широкой экспрессии мишеней ограничивает их терапевтическую эффективность. Кроме того, лекарственные средства на основе антител имеют другие ограничения, такие как быстрый клиренс из системы кровообращения после введения.

В области лекарственных средств на основе низкомолекулярных молекул были разработаны стратегии для обеспечения пролекарств активной химической молекулы. Такие пролекарства вводятся в относительно неактивной (или значительно менее активной) форме. После введения пролекарство метаболизируется *in vivo* с превращением в активное соединение. Такие стратегии с применением пролекарств могут обеспечить повышенную избирательность лекарственного средства для его предназначенной мишени и снижение побочных эффектов.

Следовательно, в области лекарственных средств на основе антител существует остающаяся потребность в антителах, которые имитируют желаемые характеристики низкомолекулярных пролекарств.

Сущность изобретения

В изобретении обеспечиваются антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с лигандом 1 полипептида программируемой смерти (PDL1), также известным как PD-L1, CD274, B7 гомолог 1 и/или B7-H1. Использование термина "PDL1" предназначено для включения любого его варианта, например, в качестве неограничивающего примера PD-L1 и/или PDL-1, все варианты используются здесь взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PDL1. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PDL1, представляют моноклональное антитело, доменное антитело, одноцепочечное антитело, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv, scAb, dAb, однодоменное антитело на основе тяжелой цепи или однодоменное антитело на основе легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PDL1, является мышинным антителом, антителом другого грызуна, химерным, гуманизированным или полностью человеческим моноклональным антителом.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которые специфически связываются с PDL1 млекопитающего, где AB имеет одну или несколько из следующих характеристик: (a) AB специфически связывается с человеческим PDL1 и мышинным PDL1; (b) AB специфически связывается с человеческим PDL1 и PDL1 обезьяны циномогус; (c) AB специфически связывается с человеческим PDL1, мышинным PDL1 и PDL1 обезьяны циномогус; (d) AB ингибирует связывание человеческого B7-1 и человеческого PD1 с PDL1 человека со значением EC₅₀ ниже 10 нМ; (e) AB ингибирует связывание мышинового B7-1 и мышинового PD1 с PDL1 мыши со значением EC₅₀ ниже 10 нМ; и (f) AB ингибирует связывание B7-1 обезьяны циномогус и PD1 обезьяны циномогус с PDL1 обезьяны циномогус со значением EC₅₀ ниже 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с PDL1 млекопитающего с константой диссоциации, ниже или равной 0,01 нМ, ниже или равной 0,05 нМ, ниже или равной 0,1 нМ, ниже или равной 0,2 нМ, ниже или равной 0,3 нМ, ниже или равной 0,4 нМ, ниже или равной 0,5 нМ, ниже или равной 0,75 нМ и ниже или равной 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с PDL1 млекопитающего с константой диссоциации в диапазоне от 0,01 до 1 нМ, от 0,05 до 1 нМ, от 0,1 до 1 нМ, от 0,2 до 1 нМ, от 0,3 до 1 нМ, от 0,4 до 1 нМ, от 0,5 до 1 нМ, от 0,75 до 1 нМ, 0,01 до 0,75 нМ, от 0,05 до 0,75 нМ, от 0,1 до 0,75 нМ, от 0,2 до 0,75 нМ, от 0,3 до 0,75 нМ, от 0,4 до 0,75 нМ, от 0,5 до 0,75 нМ, от 0,01 до 0,5 нМ, от 0,05 до 0,5 нМ, от 0,1 до 0,5 нМ, от 0,2 до 0,5 нМ, от 0,3 до 0,5 нМ, от 0,4 до 0,5 нМ, от 0,01 до 0,4 нМ, от 0,05 до 0,4 нМ, от 0,1 до 0,4 нМ, от 0,2 до 0,4 нМ, от 0,3 до 0,4 нМ, от 0,01 до 0,3 нМ, от 0,05 до 0,3 нМ, от 0,1 до 0,3 нМ, от 0,2 до 0,3 нМ, от 0,01 до 0,2 нМ, от 0,05 до 0,2 нМ, от 0,1 до 0,2 нМ, 0,01 до 0,1 нМ, от 0,05 до 0,1 нМ или от 0,01 до 0,05 нМ.

В некоторых вариантах осуществления PDL1 млекопитающего выбран из группы, состоящей из человеческого PDL, мышинового PDL1, крысиного PDL1 и PDL1 обезьяны циномогус.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с человеческим PDL1, мышинным PDL1 и PDL1 обезьяны циномогус с константой диссоциации ниже 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления PDL1 млекопитающего представляет PDL1 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют одну или более из следующих характеристик: (a) АВ специфически связывается с человеческим PDL1, мышинным PDL1 и PDL1 обезьяны циномоглус; (b) АВ ингибирует связывание человеческого B7-1 и человеческого PD1 с PDL1 человека; (c) АВ ингибирует связывание мышинового B7-1 и мышинового PD1 с PDL1 мыши; и (d) АВ ингибирует связывание B7-1 обезьяны циномоглус и PD1 обезьяны циномоглус с PDL1 обезьяны циномоглус.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокируют способность природного лиганда связываться с PDL1 млекопитающего со значением EC_{50} , ниже или равным 0,5 нМ, ниже или равным 1 нМ, ниже или равным 2 нМ, ниже или равным 3 нМ, ниже или равным 4 нМ, ниже или равным 5 нМ, ниже или равным 6 нМ, ниже или равным 7 нМ, ниже или равным 8 нМ, ниже или равным 9 нМ и/или ниже или равным 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокируют способность природного лиганда связываться с PDL1 млекопитающего со значением EC_{50} в диапазоне от 0,5 до 10 нМ, от 0,5 до 5 нМ, от 0,5 до 3 нМ, от 0,5 до 2 нМ, от 0,5 до 1 нМ, от 1 до 10 нМ, от 1 до 5 нМ, от 1 до 3 нМ, от 1 до 2 нМ, от 2 до 10 нМ, от 2 до 5 нМ, от 2 до 3 нМ, от 3 до 10 нМ, от 3 до 5 нМ или от 5 до 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд представляет PD1 млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд выбран из группы, состоящей из человеческого PD1, мышинового PD1 и PD1 обезьяны циномоглус.

В некоторых вариантах осуществления природный лиганд представляет B7-1 млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд выбран из группы, состоящей из человеческого B7-1, мышинового B7-1 и B7-1 обезьяны циномоглус.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 и 56. В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 48, 50, 52, 54 и 56, и аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 48, 50, 52, 54 и 56, и аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 и 56. В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 48, 50, 52, 54 и 56, и аминокислотную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 48, 50, 52, 54 и 56, и аминокислотную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит

VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где по меньшей мере одна последовательность CDR выбрана из группы, состоящей из последовательности VL CDR1, содержащей RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 209); последовательности VL CDR2, содержащей AASSLQS (SEQ ID NO: 215); последовательности VL CDR3, содержащей DNGYPST (SEQ ID NO: 228); последовательности VH CDR1, содержащей SYAMS (SEQ ID NO: 212); последовательности VH CDR2, содержащей SSIWRNGIVTVYADS (SEQ ID NO: 246); и последовательности VH CDR3, содержащей WSAAFDY (SEQ ID NO: 235).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо полиспецифического антитела, например биспецифического антитела, включает комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где последовательность VH CDR2 содержит SSIWRNGIVTVYADS (SEQ ID NO: 246). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо полиспецифического антитела, например, биспецифического антитела, включает комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где последовательность VH CDR2 содержит SSIWRNGIVTVYADS (SEQ ID NO: 246), и последовательность VH CDR3 содержит WSAAFDY (SEQ ID NO: 235).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо полиспецифического антитела, например биспецифического антитела, включает комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где комбинация включает последовательность VL CDR1, содержащую RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 209); последовательность VL CDR2, содержащую AASSLQS (SEQ ID NO: 215); последовательность VL CDR3, содержащую DNGYPST (SEQ ID NO: 228); последовательность VH CDR1, содержащую SYAMS (SEQ ID NO: 212); последовательность VH CDR2, содержащую SSIWRNGIVTVYADS (SEQ ID NO: 246); и последовательность VH CDR3, содержащую WSAAFDY (SEQ ID NO: 235).

Изобретение также обеспечивает активируемые антитела, которые включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PDL1, связанные с маскирующим фрагментом (ММ) таким образом, что соединение ММ уменьшает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с PDL1. В некоторых вариантах осуществления ММ связан через последовательность, которая включает субстрат для протеазы, например протеазы, которая активна в пораженной ткани и/или протеазы, которая локализуется совместно с PDL1 в области, подлежащей лечению, у субъекта. Активируемые анти-PDL1-антитела, обеспеченные здесь, также называемые здесь активируемыми анти-PDL1-антителами или активируемыми антителами к PDL1, стабильны в системе кровообращения, активируются в предполагаемых местах лечения и/или диагностики, но не в нормальной, например здоровой ткани или другой ткани, не предназначенной для лечения и/или диагностики, и при активации проявляют связывание с PDL1, которое, по меньшей мере, сравнимо со связыванием соответствующего немодифицированного антитела.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело, которое в активированном состоянии специфически связывается с PDL1 млекопитающего, включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которые специфически связываются с PDL1 млекопитающего; маскирующий фрагмент (ММ), который ингибирует связывание АВ с PDL1 млекопитающего, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы.

В некоторых вариантах осуществления обеспечивается активируемое антитело, которое в активированном состоянии имеет одну или несколько из следующих характеристик: (а) специфически связывается с PDL1 млекопитающего; и (b) специфически блокирует природный лиганд PDL1 от связывания с PDL1 млекопитающего, где активируемое антитело включает: антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которые специфически связываются с PDL1 млекопитающего; маскирующий фрагмент (ММ), который ингибирует связывание АВ с PDL1 млекопитающего, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии специфически связывается с PDL1 млекопитающего с константой диссоциации, ниже или равной 1 нМ, ниже или равной 2 нМ, ниже или равной 3 нМ, ниже или равной 4 нМ, ниже или равной 5 нМ, ниже или равной 10 нМ, ниже или равной 15 нМ, ниже или равной 20 нМ и/или ниже или равной 25 нМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии специфически связывается с PDL1 млекопитающего с константой диссоциации, выше или равной 1 нМ, выше или равной 2 нМ, выше или равной 3 нМ, выше или равной 4 нМ, выше или равной 5 нМ, выше

или равной 10 нМ, выше или равной 15 нМ, выше или равной 20 нМ и/или выше или равной 25 нМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии специфически связывается с PDL1 млекопитающего с константой диссоциации в диапазоне от 1 до 2 нМ, от 1 до 5 нМ, от 1 до 10 нМ, от 1 до 15 нМ, от 1 до 20 нМ, от 1 до 25 нМ, от 2 до 5 нМ, от 2 до 10 нМ, от 2 до 15 нМ, от 2 до 20 нМ, от 2 до 25 нМ, от 5 до 10 нМ, от 5 до 15 нМ, от 5 до 20 нМ, от 5 до 25 нМ, от 10 до 15 нМ, от 10 до 20 нМ, от 10 до 25 нМ, от 15 до 20 нМ, от 15 до 25 нМ или от 20 до 25 нМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в активированном состоянии специфически связывается с PDL1 млекопитающего с константой диссоциации ниже или равной 0,01 нМ, ниже или равной 0,05 нМ, ниже или равной 0,1 нМ, ниже или равной 0,2 нМ, ниже или равной 0,3 нМ, ниже или равной 0,4 нМ, ниже или равной 0,5 нМ, ниже или равной 0,75 нМ и ниже или равной 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в активированном состоянии специфически связывается с PDL1 млекопитающего с константой диссоциации в диапазоне от 0,01 до 1 нМ, от 0,05 до 1 нМ, от 0,1 до 1 нМ, от 0,2 пМ до 1 нМ, от 0,3 до 1 нМ, от 0,4 до 1 нМ, от 0,5 до 1 нМ, от 0,75 до 1 нМ, от 0,01 до 0,75 нМ, от 0,05 до 0,75 нМ, от 0,1 до 0,75 нМ, от 0,2 до 0,75 нМ, от 0,3 нмоль до 0,75 нМ, от 0,4 до 0,75 нМ, от 0,5 до 0,75 нМ, от 0,01 до 0,5 нМ, от 0,05 до 0,5 нМ, от 0,1 до 0,5 нМ, от 0,2 до 0,5 нМ, от 0,3 до 0,5 нМ, от 0,4 до 0,5 нМ, от 0,01 до 0,4 нМ, от 0,05 до 0,4 нМ, от 0,1 до 0,4 нМ, от 0,2 до 0,4 нМ, от 0,3 до 0,4 нМ, от 0,01 до 0,3 нМ, от 0,05 до 0,3 нМ, от 0,1 до 0,3 нМ, от 0,2 до 0,3 нМ, от 0,01 до 0,2 нМ, от 0,05 до 0,2 нМ, от 0,1 до 0,2 нМ, от 0,01 до 0,1 нМ, от 0,05 до 0,1 нМ или от 0,01 до 0,05 нМ.

В некоторых вариантах осуществления АВ специфически связывается с PDL1 млекопитающего с константой диссоциации, ниже или равной 0,01 нМ, ниже или равной 0,05 нМ, ниже или равной 0,1 нМ, ниже или равной 0,2 нМ, ниже или равной 0,3 нМ, ниже или равной 0,4 нМ, ниже или равной 0,5 нМ, ниже или равной 0,75 нМ и ниже или равной 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления АВ специфически связывается с PDL1 млекопитающего с константой диссоциации в диапазоне от 0,01 до 1 нМ, от 0,05 до 1 нМ, от 0,1 до 1 нМ, от 0,2 до 1 нМ, от 0,3 до 1 нМ, от 0,4 до 1 нМ, от 0,5 до 1 нМ, от 0,75 до 1 нМ, от 0,01 до 0,75 нМ, от 0,05 до 0,75 нМ, от 0,1 до 0,75 нМ, от 0,2 нмоль до 0,75 нМ, от 0,3 до 0,75 нМ, от 0,4 до 0,75 нМ, от 0,5 до 0,75 нМ, от 0,01 до 0,5 нМ, от 0,05 до 0,5 нМ, от 0,1 до 0,5 нМ, от 0,2 до 0,5 нМ, от 0,3 до 0,5 нМ, от 0,4 до 0,5 нМ, 0,01 пМ до 0,4 нМ, от 0,05 до 0,4 нМ, от 0,1 до 0,4 нМ, от 0,2 до 0,4 нМ, от 0,3 до 0,4 нМ, от 0,01 до 0,3 нМ, от 0,05 до 0,3 нМ, от 0,1 до 0,3 нМ, от 0,2 до 0,3 нМ, от 0,01 до 0,2 нМ, от 0,05 до 0,2 нМ, от 0,1 до 0,2 нМ, от 0,01 до 0,1 нМ, от 0,05 до 0,1 нМ или от 0,01 до 0,05 нМ.

В некоторых вариантах осуществления PDL1 млекопитающего выбран из группы, состоящей из человеческого PDL, мышиноного PDL1, крысиного PDL1 и PDL1 обезьяны циномогус. В некоторых вариантах осуществления АВ специфически связывается с человеческим PDL, мышинным PDL1 или PDL1 обезьяны циномогус с константой диссоциации ниже 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления PDL1 млекопитающего представляет PDL1 человека.

В некоторых вариантах осуществления АВ имеет одну или несколько из следующих характеристик: (а) АВ специфически связывается с человеческим PDL1 и мышинным PDL1; (b) АВ специфически связывается с человеческим PDL1 и PDL1 обезьяны циномогус; и (с) АВ специфически связывается с человеческим PDL1, мышинным PDL1 и PDL1 обезьяны циномогус.

В некоторых вариантах осуществления АВ имеет одну или несколько из следующих характеристик: (а) АВ специфически связывается с человеческим PDL, мышинным PDL1 или PDL1 обезьяны циномогус; (b) АВ ингибирует связывание человеческого В7-1 и человеческого PD1 с PDL1 человека; (с) АВ ингибирует связывание мышиноного В7-1 и мышиноного PD1 с PDL1 мыши; и (d) АВ ингибирует связывание В7-1 обезьяны циномогус и PD1 обезьяны циномогус с PDL1 обезьяны циномогус.

В некоторых вариантах осуществления АВ блокирует способность природного лиганда связываться с PDL1 млекопитающего со значением EC_{50} , ниже или равным 0,5 нМ, ниже или равным 1 нМ, ниже или равным 2 нМ, ниже или равным 3 нМ, ниже или равным 4 нМ, ниже или равным 5 нМ, ниже или равным 6 нМ, ниже или равным 7 нМ, ниже или равным 8 нМ, ниже или равным 9 нМ и/или ниже или равным 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления АВ блокирует способность природного лиганда связываться с PDL1 млекопитающего со значением EC_{50} от 0,5 до 10 нМ, от 0,5 до 5 нМ, от 0,5 до 3 нМ, от 0,5 до 2 нМ, от 0,5 до 1 нМ, от 1 до 10 нМ, от 1 до 5 нМ, от 1 до 3 нМ, от 1 до нМ, от 2 до 10 нМ, от 2 до 5 нМ, от 2 до 3 нМ, от 3 до 10 нМ, от 3 до 5 нМ или от 5 до 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления природный лиганд представляет PD1 млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд выбран из группы, состоящей из человеческого PD1, мышиноного PD1 или PD1 обезьяны циномогус.

В некоторых вариантах осуществления природный лиганд представляет В7-1 млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд выбран из группы, состоящей из человеческого В7-1, мышиноного В7-1 и В7-1 обезьяны циномогус.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело имеет одну или несколько из следующих характеристик: (а) АВ индуцирует диабет 1 типа у диабетических мышей без ожирения (NOD); и (b) активируемое антитело в нерасщепленном состоянии ингибирует индукцию диабета 1 типа у диабетической мыши без ожирения NOD.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело ингибирует индукцию диабета 1 типа у мыши NOD после введения активированного антитела в однократной дозе от 0,1 до 3 мг/кг, от 0,5 до 3 мг/кг, от 1 до 3 мг/кг, от 2 до 3 мг/кг, от 0,1 до 2 мг/кг, от 0,5 до 2 мг/кг, от 1 до 2 мг/кг, 0,1 до 1 мг/кг, от 0,5 до 1 мг/кг или от 0,1 до 0,5 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело индуцирует диабет 1 типа у субъекта после введения активированного антитела в однократной дозе 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления субъектом является мышь NOD.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело индуцирует диабет 1 типа у субъекта после введения активированного антитела в однократной дозе, ниже или равной 3 мг/кг, ниже или равной 2 мг/кг, ниже или равной 1 мг/кг, ниже или равной 0,5 мг/кг и/или ниже или равной 0,1 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело индуцирует диабет 1 типа у субъекта после введения активированного антитела в однократной дозе в диапазоне, выбранном из группы, состоящей от 0,1 до 3 мг/кг, от 0,5 до 3 мг/кг, от 1 до 3 мг/кг, от 2 до 3 мг/кг, от 0,1 до 2 мг/кг, от 0,5 до 2 мг/кг, от 1 до 2 мг/кг, от 0,1 до 1 мг/кг, от 0,5 до 1 мг/кг и от 0,1 до 0,5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления субъектом является мышь NOD.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело имеет одну или несколько из следующих характеристик: (а) активированное антитело в нерасщепленном состоянии не индуцирует диабет 1 типа более чем у 50% популяции диабетических мышей без ожирения (NOD), и АВ индуцирует диабет 1 типа более чем у 50% популяции мышей NOD.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело не индуцирует диабет 1 типа более чем у 50% популяции мышей NOD после введения каждой мыши в популяции в однократной дозе, ниже или равной 3 мг/кг, ниже или равной 2 мг/кг, ниже или равной 1 мг/кг, ниже или равной 0,5 мг/кг и/или ниже или равной 0,1 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело не индуцирует диабет 1 типа более чем у 50% популяции мышей NOD после введения каждой мыши в популяции однократно активированного антитела в дозе от 0,1 до 3 мг/кг, от 0,5 до 3 мг/кг, от 1 до 3 мг/кг, от 2 до 3 мг/кг, от 0,1 до 2 мг/кг, от 0,5 до 2 мг/кг, от 1 до 2 мг/кг, от 0,1 до 1 мг/кг, от 0,5 до 1 мг/кг или от 0,1 до 0,5 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело имеет одну или несколько из следующих характеристик: (а) активированное антитело в нерасщепленном состоянии не индуцирует диабет 1 типа более чем у 50% популяции диабетических мышей без ожирения (NOD) при введении в однократной дозе 1 мг/кг; и (б) АВ индуцирует диабет 1 типа более чем у 50% популяции мышей NOD при введении в однократной дозе 1 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления АВ индуцирует диабет 1 типа более чем у 50% популяции мышей NOD после введения каждой мыши в популяции однократно АВ в дозе, ниже или равной 3 мг/кг, ниже или равной 2 мг/кг, ниже или равной 1 мг/кг, ниже или равной 0,5 мг/кг и/или ниже или равной 0,1 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления АВ индуцирует диабет 1 типа более чем у 50% популяции мышей NOD после введения каждой мыши в популяции однократно АВ в дозе от 0,1 до 3 мг/кг, от 0,5 до 3 мг/кг, от 1 до 3 мг/кг, от 2 до 3 мг/кг, от 0,1 до 2 мг/кг, от 0,5 до 2 мг/кг, от 1 до 2 мг/кг, от 0,1 до 1 мг/кг, от 0,5 до 1 мг/кг или от 0,1 до 0,5 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления он мышь NOD представляет мышь самку NOD/подвида ShiLtJ.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело ингибирует индукцию диабета 1 типа у мыши NOD, по меньшей мере в 3 раза выше по сравнению с АВ.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело обладает запасом безопасности, который по меньшей мере в три раза выше запаса безопасности по сравнению с АВ.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело в нерасщепленном состоянии связывается с меньшим процентом популяции CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови, чем АВ.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело не связывается с более чем 50% популяции CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови после введения однократно активированного антитела в дозе ниже или равной 5 мг/кг, ниже или равной 4 мг/кг, ниже или равной 3 мг/кг, ниже или равной 2 мг/кг, ниже или равной 1 мг/кг, ниже или равной 0,5 мг/кг и/или ниже или равной 0,1 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело не связывается с более чем 50% популяции CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови после введения однократно активированного антитела в дозе от 0,1 до 5 мг/кг, от 0,5 до 5 мг/кг, от 1 до 5 мг/кг, от 2 до 5 мг/кг, от 3 до 5 мг/кг, от 0,1 до 3 мг/кг, от 0,5 до 3 мг/кг, от 1 до 3 мг/кг, от 2 до 3 мг/кг, от 0,1 до 2 мг/кг, от 0,5 до 2 мг/кг, 1 до 2 мг/кг, от 0,1 до 1 мг/кг, от 0,5 до 1 мг/кг или от 0,1 до 0,5 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления АВ связывается с более чем 50% популяции CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови после введения однократно АВ в дозе от 0,1 до 5 мг/кг, от 0,5 до 5 мг/кг, от 1 до 5 мг/кг, от 2 до 5 мг/кг, от 3 до 5 мг/кг, от 0,1 до 3 мг/кг, от 0,5 до 3 мг/кг, от 1 до 3 мг/кг, от 2 до 3 мг/кг, от 0,1 до 2 мг/кг, от 0,5 до 2 мг/кг, от 1 до 2 мг/кг, от 0,1 до 1 мг/кг или от 0,1 до 0,5 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоциты периферической крови являются

мышинными. В некоторых вариантах осуществления мышинные CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоциты периферической крови получены от мыши, несущей опухоль.

В некоторых вариантах осуществления процент популяции CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови, с которыми связывается АВ, составляет ниже 60%, когда активируемое антитело вводят в дозе от 1 до 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления процент популяции CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови, с которыми связывается АВ, составляет ниже 50%, когда активируемое антитело вводят в дозе от 1 до 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления процент популяции CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови, с которыми связывается АВ, составляет от 30 до 60%, когда активируемое антитело вводят в дозе от 1 до 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления процент популяции CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови, с которыми связывается АВ, составляет от 30 до 50%, когда активируемое антитело вводят в дозе от 1 до 5 мг/кг.

Изобретение также относится к способам лечения, профилактики и/или задержки начала или замедления прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с aberrантной экспрессией и/или активностью PDL1 у субъекта, с использованием активируемых антител, которые связываются с PDL1, в частности, активируемых антител, которые связываются и нейтрализуют или иным образом ингибируют по меньшей мере одну биологическую активность, опосредованную PDL1 и/или сигнальным путем с участием PDL1.

Активируемые антитела в активированном состоянии связываются с PDL1 и включают (i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которые специфически связываются с PDL1; (ii) маскирующий фрагмент (ММ), который, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, ингибирует связывание АВ с PDL1; и (с) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, где СМ представляет полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит линкерный пептид между ММ и СМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит линкерный пептид между СМ и АВ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый линкерный пептид (LP1) и второй линкерный пептид (LP2), и где активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-LP1-СМ-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ-LP1-ММ. В некоторых вариантах осуществления два линкерных пептида не обязательно должны быть идентичны друг другу.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 191) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 192), где n представляет собой целое число, по меньшей мере один.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGSG (SEQ ID NO: 193), GGSGG (SEQ ID NO: 194), GSGSG (SEQ ID NO: 195), GSGGG (SEQ ID NO: 196), GGGSG (SEQ ID NO: 197) и GSSSG (SEQ ID NO: 198).

В некоторых вариантах осуществления LP1 содержит аминокислотную последовательность GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 199), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 200), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 201), GSSGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 202), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 203) или GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 204).

В некоторых вариантах осуществления LP2 содержит аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGS (SEQ ID NO: 205), GSSGT (SEQ ID NO: 206) или GSSG (SEQ ID NO: 207).

В некоторых вариантах осуществления АВ имеет константу диссоциации примерно 100 нМ или ниже для связывания с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент которые специфически связываются с PDL1. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PDL1, представляют моноклональное антитело, доменное антитело, одноцепочечное антитело, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv, scAb, dAb, однодоменное антитело на основе тяжелой цепи или однодоменное антитело на основе легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PDL1, являются мышинным антителом, антителом другого грызуна, химерным, гуманизированным или полностью человеческим моноклональным антителом.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 и 56. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществле-

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где комбинация включает VL CDR1, содержащую RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 209); последовательность VL CDR2, содержащую AASSLQS (SEQ ID NO: 215); последовательность VL CDR3, содержащую DNGYPST (SEQ ID NO: 228); последовательность VH CDR1, содержащую SYAMS (SEQ ID NO: 212); последовательность VH CDR2, содержащую SSIWRNGIVTVYADS (SEQ ID NO: 246); и последовательность VH CDR3, содержащую WSAAFDY (SEQ ID NO: 235).

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает комбинацию последовательности участка, определяющего комплементарность, варибельной области тяжелой цепи 1 (VH CDR1, также называемого здесь CDRH1), последовательности участка, определяющего комплементарность, варибельной области тяжелой цепи 2 (VH CDR2, также называемого здесь CDRH2), последовательности участка, определяющего комплементарность, варибельной области тяжелой цепи 3 (VH CDR3, также называемого здесь CDRH3), последовательности участка, определяющего комплементарность, варибельной области легкой цепи 1 (VL CDR1, также называемого здесь CDRL1), последовательности участка, определяющего комплементарность, варибельной области легкой цепи 2 (VL CDR2, также называемого здесь CDRL2), и последовательности участка, определяющего комплементарность, варибельной области легкой цепи 3 (VL CDR3, также называемого здесь CDRL3), где по меньшей мере одна последовательность CDR выбрана из группы, состоящей из последовательности VH CDR1, показанной в табл.17; последовательности VH CDR2, показанной в табл.17; последовательности VH CDR3, показанной в табл.17; последовательности VL CDR1, показанной в табл.17; последовательности VL CDR2, показанной в табл.17; и последовательности VL CDR3, показанной в табл.17.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где по меньшей мере одна последовательность CDR выбрана из группы, состоящей из последовательности VH CDR1, которая включает последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична последовательности VH CDR1, показанной в табл.17; последовательности VH CD2, которая включает последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична последовательности VH CDR2, показанной в табл.17; последовательности VH CDR3, которая включает последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична последовательности VH CDR3, показанной в табл.17; последовательности VL CDR1, которая включает последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична последовательности VL CDR1, показанной в табл.17; последовательности VL CDR2, которая включает последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична последовательности VL CDR2, показанной в табл.17; и последовательности VL CDR3, которая включает последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична последовательности VL CDR3, показанной в табл.17.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где комбинация представляет комбинацию, показанную в табл.17.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична соответствующей последовательности CDR в комбинации, показанной в табл.17.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 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, 155, 157, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1144-1191, 1200 и 1201. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 48, 50, 52, 54 и 56. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 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, 155, 157, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 955, 957, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1144-1191, 1200 и 1201, и аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 48, 50, 52, 54 и 56.

леиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15, 17, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 и 55, и последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15, 17, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 и 55, и последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 47, 49, 51, 53 и 55, и последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, 47, 49, 51, 53 и 55, и последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности нуклеиновой кислоты легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет константу диссоциации для связывания с АВ, которая выше константы диссоциации для связывания АВ с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет константу диссоциации для связывания с АВ, которая не выше константы диссоциации для связывания АВ с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет константу диссоциации для связывания с АВ, которая ниже константы диссоциации для связывания АВ с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет константу диссоциации для связывания с АВ, которая примерно равна константе диссоциации для связывания АВ с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления ММ не препятствует или не конкурирует с АВ за связывание с PDL1, когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления ММ представляет полипептид длиной от 2 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления ММ представляет полипептид длиной до 40 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления ММ представляет полипептидную последовательность ММ отличается от последовательности PDL1. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность ММ не более чем на 50% идентична любому природному партнеру по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность ММ отличается от последовательности PDL1 и не более чем на 40, 30, 25, 20, 15 или 10% идентична любому природному партнеру по связыванию с АВ.

В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59-81, 208 и 426. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59-81, 208 и 426.

В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связываться с PDL1 таким образом, что константа диссоциации (K_d) АВ при соединении с ММ по отношению к PDL1 по меньшей мере в два раза выше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ по отношению к PDL1.

В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связываться с PDL1 таким образом, что константа диссоциации (K_d) АВ при соединении с ММ по отношению к PDL1 по меньшей мере в пять раз выше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ по отношению к PDL1.

В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связываться с PDL1 таким образом, что константа диссоциации (K_d) АВ при соединении с ММ по отношению к PDL1 по меньшей мере в 10 раз выше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ по отношению к PDL1.

В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связываться с PDL1 таким образом, что константа диссоциации (K_d) АВ при соединении с ММ по отношению к PDL1 по меньшей мере в 20 раз выше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ по отношению к PDL1.

В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связываться с PDL1 таким образом, что константа диссоциации (K_d) АВ при соединении с ММ по отношению к PDL1 по меньшей мере в 40 раз выше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ по отношению к PDL1.

В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связываться с PDL1 таким образом, что константа диссоциации (K_d) АВ при соединении с ММ по отношению к PDL1

по меньшей мере в 100 раз выше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ по отношению к PDL1.

В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связываться с PDL1 таким образом, что константа диссоциации (K_d) АВ при соединении с ММ по отношению к PDL1, по меньшей мере в 1000 раз выше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ по отношению к PDL1.

В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с АВ снижает способность АВ связываться с PDL1 таким образом, что константа диссоциации (K_d) АВ при соединении с ММ по отношению к PDL1 по меньшей мере в 10000 раз выше, чем K_d АВ, когда оно не связано с ММ по отношению к PDL1.

В некоторых вариантах осуществления в присутствии PDL1 ММ снижает способность АВ связываться с PDL1 по меньшей мере на 90%, когда СМ не отщеплен, по сравнению с тем, когда СМ отщеплен, что было определено в анализе *in vitro* с использованием теста вытеснения мишени, такого как, например, анализ, описанный в публикации международной заявки РСТ WO 2010/081173, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте.

В некоторых вариантах осуществления протеаза, которая расщепляет СМ, является активной, например подвергается положительной регуляции в пораженной ткани, и протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое анти тело подвергается воздействию протеазы.

В некоторых вариантах осуществления протеаза локализуется в ткани совместно с PDL1, и протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое анти тело подвергается воздействию протеазы.

В некоторых вариантах осуществления протеаза присутствует на относительно более высоких уровнях в непосредственной близости к ткани, содержащей мишень, в области, подлежащей лечению или диагностике, чем в ткани участков, не подлежащих лечению (например, в здоровой ткани), и протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое анти тело подвергается воздействию протеазы.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположен в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое анти тело находится в нерасщепленном состоянии, то связывание активируемого анти тела с PDL1 снижается с константой диссоциации, которая по меньшей мере в два раза выше константы диссоциации для связывания немодифицированного АВ с PDL1, тогда как в расщепленном состоянии (т.е. когда активируемое анти тело находится в расщепленном состоянии) АВ связывается с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположен в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое анти тело находится в нерасщепленном состоянии, то связывание активируемого анти тела с PDL1 снижается с константой диссоциации, которая по меньшей мере в пять раз выше константы диссоциации для связывания немодифицированного АВ с PDL1, тогда как в расщепленном состоянии (т.е. когда активируемое анти тело находится в расщепленном состоянии) АВ связывается с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположен в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое анти тело находится в нерасщепленном состоянии, то связывание активируемого анти тела с PDL1 снижается с константой диссоциации, которая по меньшей мере в 10 раз выше константы диссоциации для связывания немодифицированного АВ с PDL1, тогда как в расщепленном состоянии (т.е. когда активируемое анти тело находится в расщепленном состоянии) АВ связывается с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположен в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое анти тело находится в нерасщепленном состоянии, то связывание активируемого анти тела с PDL1 снижается с константой диссоциации, которая по меньшей мере в 20 раз выше константы диссоциации для связывания немодифицированного АВ с PDL1, тогда как в расщепленном состоянии (т.е. когда активируемое анти тело находится в расщепленном состоянии) АВ связывается с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположен в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое анти тело находится в нерасщепленном состоянии, то связывание активируемого анти тела с PDL1 снижается с константой диссоциации, которая по меньшей мере в 40 раз выше константы диссоциации для связывания немодифицированного АВ с PDL1, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывается с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположен в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое анти тело находится в нерасщепленном состоянии, то связывание активируемого анти тела с PDL1 снижается с константой диссоциации, которая по меньшей мере в 50 раз выше константы диссоциации для связывания немодифицированного АВ с PDL1, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывается с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположен в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое анти тело находится в нерасщепленном состоянии, то связывание активируемого анти тела с PDL1 снижается с константой диссоциации, которая по меньшей мере в 100 раз выше константы диссоциации для связывания немодифицированного АВ с PDL1, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывается с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположен в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое анти тело находится в нерасщепленном состоянии, то связывание активируемого

антитела с PDL1 снижается с константой диссоциации, которая по меньшей мере в 200 раз выше константы диссоциации для связывания немодифицированного АВ с PDL1, тогда как в расщепленном состоянии АВ связывается с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет полипептид длиной до 15 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет полипептид, который включает первый расщепляемый фрагмент (СМ1), который является субстратом по меньшей мере для одной матриксной металлопротеазы (ММР), и второй расщепляемый фрагмент (СМ2), который является субстратом по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP). В некоторых вариантах осуществления каждая из последовательности субстрата СМ1 и последовательности субстрата СМ2 субстрата СМ1-СМ2 независимо представляет полипептид длиной до 15 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет субстрат по меньшей мере для одной протеазы, которая, как полагается, подвергается положительной регуляции при раке. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет субстрат по меньшей мере для одной протеазы, которая, как полагается, подвергается положительной регуляции при воспалении.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат по меньшей мере для одной протеазы, которая, как полагается, подвергается положительной регуляции при аутоиммунитете.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет субстрат по меньшей мере для одной протеазы, выбранной из группы, состоящей из матриксной металлопротеазы (ММР), тромбина, нейтрофильной эластазы, цистеиновой протеазы, легоумаина и сериновой протеазы, такой как матриптаза (MT-SP1) и урокиназа (uPA). Не желая связываться с теорией, полагается, что данные протеазы подвергаются положительной регуляции по меньшей мере при одном из рака, воспаления и/или аутоиммунитета.

Типичные субстраты включают, не ограничиваясь этим, субстраты, расщепляемые одним или несколькими из следующих ферментов или протеаз, приведенных в табл.12.

В некоторых вариантах осуществления СМ выбран для применения со специфической протеазой, например протеазой, о которой известно, что она локализуется совместно с мишенью активируемого антитела.

В некоторых вариантах осуществления СМ выбран для применения со специфической протеазой, например, протеазой, о которой известно, что она находится в непосредственной близости от мишени активируемого антитела.

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом по меньшей мере для одной ММР. Примеры ММР включают ММР, приведенные в табл.12. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для протеазы, выбранной из группы, состоящей из ММР9, ММР14, ММР1, ММР3, ММР13, ММР17, ММР11 и ММР19. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для ММР9. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для ММР 14.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет субстрат, который включает последовательность

TGRGPSWV (SEQ ID NO: 338); SARGPSRW (SEQ ID NO: 339); TARGPSFK (SEQ ID NO: 340); LSGRSDNH (SEQ ID NO: 341); GGWHTGRN (SEQ ID NO: 342); HTGRSGAL (SEQ ID NO: 343); PLTGRSGG (SEQ ID NO: 344); AARGPAIH (SEQ ID NO: 345); RGPAPFNP (SEQ ID NO: 346); SSRGPAYL (SEQ ID NO: 347); RGPATPIM (SEQ ID NO: 348); RGPA (SEQ ID NO: 349); GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 350); FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 351); VHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 352); SPLTGRSG (SEQ ID NO: 353); SAGFSLPA (SEQ ID NO: 354); LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 355); SGGPLGVR (SEQ ID NO: 356); PLGL (SEQ ID NO: 357); LSGRSGNH (SEQ ID NO: 883); SGRSANPRG (SEQ ID NO: 884); LSGRSDDH (SEQ ID NO: 885); LSGRSDIH (SEQ ID NO: 886); LSGRSDQH (SEQ ID NO: 887); LSGRSDTH (SEQ ID NO: 888); LSGRSDYH (SEQ ID NO: 889); LSGRSDNP (SEQ ID NO: 890); LSGRSANP (SEQ ID NO: 891); LSGRSANI (SEQ ID NO: 892); и/или LSGRSDNI (SEQ ID NO: 893).

В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSDNH (SEQ ID NO: 341). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность TGRGPSWV (SEQ ID NO: 338). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность PLTGRSGG (SEQ ID NO: 344). В некоторых вариантах осуществе-

тельность SPLPLRVP (SEQ ID NO: 369). В некоторых вариантах осуществления СМ включает аминокислотную последовательность RMHLRSLG (SEQ ID NO: 370). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LAAPLGLL (SEQ ID NO: 371). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность AVGLLAPP (SEQ ID NO: 372). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LLAPSHRA (SEQ ID NO: 373). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность PAGLWLDP (SEQ ID NO: 374). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность MIAPVAYR (SEQ ID NO: 894). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность RPSPMWAY (SEQ ID NO: 895). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность WATPRPMR (SEQ ID NO: 896). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность FRLLDWQW (SEQ ID NO: 897). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность ISSGL (SEQ ID NO: 898). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность ISSGLLS (SEQ ID NO: 899). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность ISSGLL (SEQ ID NO: 900).

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для тромбина. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для тромбина и содержит последовательность GPRSFGL (SEQ ID NO: 375) или GPRSGF (SEQ ID NO: 376). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность GPRSFGL (SEQ ID NO: 375). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность GPRSGF (SEQ ID NO: 376).

В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 435); NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 436); TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 437); TSGRSANP (SEQ ID NO: 438); VAGRSMRP (SEQ ID NO: 439); WPEGRRS (SEQ ID NO: 440); ILPRSPAF (SEQ ID NO: 441); MVLGRSLL (SEQ ID NO: 442); QGRAITFI (SEQ ID NO: 443); SPRSIMLA (SEQ ID NO: 444); SMLRSMPL (SEQ ID NO: 445).

В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 435). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 436). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 437). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность TSGRSANP (SEQ ID NO: 438). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность VAGRSMRP (SEQ ID NO: 439). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность WPEGRRS (SEQ ID NO: 440). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность ILPRSPAF (SEQ ID NO: 441). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность MVLGRSLL (SEQ ID NO: 442). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность QGRAITFI (SEQ ID NO: 443). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SPRSIMLA (SEQ ID NO: 444). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SMLRSMPL (SEQ ID NO: 445).

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для нейтрофильной эластазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет субстрат для сериновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для uPA. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для легумина. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет субстрат для матриптазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет субстрат для цистеиновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет субстрат для цистеиновой протеазы, такой как катепсин.

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом СМ1-СМ2 и содержит последовательность

ISSGLLSGRSDNH

(SEQ ID NO: 377); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 378);
 AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 379); TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP
 (SEQ ID NO: 380); VHMPGLGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 381);
 TSTSGRSANPRGGGVHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 382); AVGLLAPPGGLSGRSDNH
 (SEQ ID NO: 383); LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 384);
 VHMPGLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 385); LSGRSDNHGGVHMPGLGFLGP (SEQ
 ID NO: 386); LSGRSDNHGGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 387);

LSGRSGNHGGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 388); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 389); LSGRSDNHGGSGGSONQALRMA (SEQ ID NO: 390); QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 391); LSGRSGNHGGSGGSONQALRMA (SEQ ID NO: 392); QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 393); ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 394); ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 901); AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 902); AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 903); ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 904); ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 905); ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 906); ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 907); ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 908); ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 909); ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 910); ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 911); AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 912); AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 913); AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 914); AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 915); AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 916); AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 917); AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 918); AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 919); ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 920); AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 921); GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 1009); и/или GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 1010).

В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 377), которая также относится здесь к субстрату 2001. В некоторых вариантах субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 378), которая также относится здесь к субстрату 1001/LP'/0001, где LP', используемый в этом субстрате CM1-CM2, представляет аминокислотную последовательность GGSGGS (SEQ ID NO: 922). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 379), которая также относится здесь к субстрату 2015 и/или субстрату 1004/LP'/0003, где LP', используемый в этом субстрате CM1-CM2, представляет аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 380), которая также относится здесь к субстрату 0003/LP'/1004, где LP', используемый в этом субстрате CM1-CM2, представляет аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 381), которая также относится здесь к субстрату 1003/LP'/0003, где LP', используемый в этом субстрате CM1-CM2, представляет аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 382), которая также относится здесь к субстрату 0003/LP'/1003, где LP', используемый в этом субстрате CM1-CM2, представляет аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 383), которая также относится здесь к субстрату 3001 и/или субстрату 1004/LP'/0001, где LP', используемый в этом субстрате CM1-CM2, представляет аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах субстрат CM1-CM2 содержит последовательность LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 384), которая также относится здесь к субстрату 0001/LP'/1004, где LP', используемый в этом субстрате CM1-CM2, представляет аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 385), которая также относится здесь к субстрату 1003/LP'/0001, где LP', используемый в этом субстрате CM1-CM2, представляет аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 386), которая также относится здесь к субстрату 0001/LP'/1003, где LP', используемый в этом субстрате CM1-CM2, представляет аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность LSGRSDNHGGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 387), которая также относится здесь к субстрату 0001/LP'/1001, где LP', используемый в этом субстрате CM1-CM2, представляет аминокислотную последовательность GGSGGS (SEQ ID NO: 922). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность LSGRSGNHGGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 388), которая

кислотную последовательность GG.

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом по меньшей мере для двух протеаз. В некоторых вариантах осуществления каждая протеаза выбрана из группы, состоящей из протеаз, которые показаны в табл.12. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом по меньшей мере для двух протеаз, где одна из протеаз выбрана из группы, состоящей из ММР, тромбина, нейтрофильной эластазы, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы и других сериновых протеаз, и другая протеаза выбрана из группы, состоящей из протеаз, приведенных в табл.12. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом по меньшей мере для двух протеаз, выбранных из группы, состоящей из ММР, тромбина, нейтрофильной эластазы, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы и других сериновых протеаз.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит, по меньшей мере, первый СМ и второй СМ. В некоторых вариантах осуществления первый СМ и второй СМ каждый представляют полипептид длиной не более 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления первый СМ и второй СМ в активируемом антителе в нерасщепленном состоянии имеют следующую структурную организацию от N-конца к C-концу: MM-СМ1-СМ2-AB или AB-СМ2-СМ1-MM. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого СМ и второго СМ представляет полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы, выбранной из группы, состоящей из ММР, тромбина, нейтрофильной эластазы, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы и других сериновых протеаз. В некоторых вариантах осуществления первый СМ расщепляется первым расщепляющим агентом, выбранным из группы, состоящей из ММР, тромбина, нейтрофильной эластазы, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы и других сериновых протеаз в ткани-мишени, и второй СМ расщепляется вторым расщепляющим агентом в ткани-мишени. В некоторых вариантах осуществления другая протеаза выбрана из группы, состоящей из протеаз, приведенных в табл.12. В некоторых вариантах осуществления первый расщепляющий агент и второй расщепляющий агент представляют одну и ту же протеазу, выбранную из группы, состоящей из ММР, тромбина, нейтрофильной эластазы, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы и других сериновых протеаз, и первый СМ и второй СМ представляют различные субстраты для фермента. В некоторых вариантах осуществления первый расщепляющий агент и второй расщепляющий агент представляют собой одну и ту же протеазу, выбранную из группы, состоящей из протеаз, приведенных в табл.12. В некоторых вариантах осуществления первый расщепляющий агент и второй расщепляющий агент представляют различные протеазы. В некоторых вариантах осуществления первый расщепляющий агент и второй расщепляющий агент локализуются совместно в ткани-мишени. В некоторых вариантах осуществления первый СМ и второй СМ расщепляются по меньшей мере одним расщепляющим агентом в ткани-мишени.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело подвергается воздействию и расщепляется протеазой таким образом, что в активированном или расщепленном состоянии активированное антитело включает аминокислотную последовательность легкой цепи, которая содержит, по меньшей мере, фрагмент последовательности LP2 и/или СМ после того, как протеаза расщепила СМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело также включает агент, конъюгированный с АВ. В некоторых вариантах осуществления агент, конъюгированный с АВ или АВ активируемого антитела, является терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления агент представляет противоопухолевое средство. В некоторых вариантах осуществления агент представляет токсин или его фрагмент. Как здесь используется, фрагмент токсина представляет собой фрагмент, который сохраняет токсическую активность. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через линкер, который включает по меньшей мере одну последовательность субстрата СМ1-СМ2. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через линкер, который расщепляется во внутриклеточной или лизосомальной среде. В некоторых вариантах осуществления агент представляет ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления агент представляет агент, повреждающий нуклеиновую кислоту, такой как алкилятор ДНК, агент, расщепляющий ДНК, агент, сшивающий ДНК, или интеркалятор ДНК, или другой агент, повреждающий ДНК. В некоторых вариантах осуществления агент представляет агент, выбранный из группы, приведенной в табл.11. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой доластатин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет ауристин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет ауристин Е или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет монометилауристин Е (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления агент представляет монометилауристин D (ММАД). В некоторых вариантах осуществления агент представляет майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления агент представляет DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления агент представляет дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет пиролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет димер пиролобензодиазепина.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело конъюгировано с одним или более эквивалентами агента. В некоторых вариантах осуществления активированное антитело конъюгировано с одним эквивалентом агента. В некоторых вариантах осуществления активированное антитело конъюгировано с двумя, тремя, четырьмя, пятью, семью, восемью, девятью, десятью или более десяти эквивалентами агента. В некоторых вариантах осуществления активированное антитело является частью смеси активируемых антител, имеющих одинаковое число эквивалентов конъюгированных агентов. В некоторых вариантах осуществления активированное антитело является частью смеси активируемых антител, имеющих различное число эквивалентов конъюгированных агентов. В некоторых вариантах осуществления смесь активируемых антител такова, что среднее число агентов, конъюгированных с каждым активируемым антителом, составляет от нуля до одного, от одного до двух, от двух до трех, от трех до четырех, от четырех до пяти, от пяти до шести, от шести до семи, от семи до восьми, от восьми до девяти, от девяти до десяти, и равно десяти и более. В некоторых вариантах осуществления смесь активируемых антител такова, что среднее число агентов, конъюгированных с каждым активируемым антителом, составляет один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело содержит одну или несколько сайт-специфических модификаций аминокислотной последовательности таким образом, что количество остатков лизина и/или остатков цистеина увеличивается или уменьшается по сравнению с исходной аминокислотной последовательности активируемого антитела, таким образом, в некоторых вариантах осуществления соответственно увеличивается или уменьшается количество агентов, которые могут быть конъюгированы с активируемым антителом, или в некоторых вариантах осуществления ограничивается конъюгация агентов с активируемым антителом сайт-специфическим образом. В некоторых вариантах осуществления модифицированное активированное антитело модифицировано одной или более неестественными аминокислотами сайт-специфическим образом, так, что в некоторых вариантах осуществления конъюгация агентов ограничивается только в сайтах неестественных аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления агент является противовоспалительным средством.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело также включает детектируемую группу. В некоторых вариантах осуществления детектируемая группа является диагностическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело также включает сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид конъюгирован с активируемым антителом через спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер конъюгирован с активируемым антителом в отсутствие сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления спейсер соединяется непосредственно с ММ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления спейсер соединяется непосредственно с ММ активируемого антитела в следующей структурной организации от N-конца к C-концу: спейсер-ММ-СМ-АВ.

Пример спейсера, непосредственно соединенного с N-концом ММ активируемого антитела, выбран из группы, состоящей из

QGQSGS

(SEQ ID NO: 923); GQSGS (SEQ ID NO: 1192); QSGS (SEQ ID NO: 1193); SGS (SEQ ID NO: 1194); GS (SEQ ID NO: 1195); S; QGQSGQG (SEQ ID NO: 924); GQSGQG (SEQ ID NO: 395); QSGQG (SEQ ID NO: 925); SGQG (SEQ ID NO: 926); GQG (SEQ ID NO: 927); QG (SEQ ID NO: 928); Г; QGQSGQ (SEQ ID NO: 1196); GQSGQ (SEQ ID NO: 1197); QSGQ (SEQ ID NO: 1198); SGQ (SEQ ID NO: 616); GQ (SEQ ID NO: 1199); и Q.

В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QGQSGS (SEQ ID NO: 923). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность GQSGS (SEQ ID NO: 1192). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QSGS (SEQ ID NO: 1193). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность SGS (SEQ ID NO: 1194). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность GS (SEQ ID NO: 1195). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность S. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QGQSGQG (SEQ ID NO: 924). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность GQSGQG (SEQ ID NO: 395). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QSGQG (SEQ ID NO: 925). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность SGQG (SEQ ID NO: 926). В некоторых вариантах осуществления спейсер

довательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где комбинация представляет комбинацию шести последовательностей CDR (VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3), показанных в одной строке в табл. 16.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, которая содержит комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2 и последовательности VH CDR3, где комбинация представляет комбинацию трех последовательностей CDR тяжелой цепи (VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3), показанных в одной строке в табл.16.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо полиспецифического активируемого антитела, например биспецифического активируемого антитела, содержит комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична соответствующей последовательности CDR в комбинации шести последовательностей CDR (VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3), показанных в одной строке в табл.16.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, которая содержит комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2 и последовательности VR CDR3, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична соответствующей последовательности CDR в комбинации трех последовательностей CDR тяжелой цепи (VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3), показанных в одной строке в табл.16.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо полиспецифического активируемого антитела, например биспецифического активируемого антитела, содержит комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где по меньшей мере одна последовательность CDR выбрана из группы, состоящей из последовательности VL CDR1, содержащей RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 209); последовательности VL CDR2, содержащей AASSLQS (SEQ ID NO: 215); последовательности VL CDR3, содержащей DNGYPST (SEQ ID NO: 22 8) ; последовательности VH CDR1, содержащей SYAMS (SEQ ID NO: 212); последовательности VH CDR2, содержащей SSIWRNGIVTVYADS (SEQ ID NO: 24 6) ; и последовательности VH CDR3, содержащей WSAAFDY (SEQ ID NO: 235).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо полиспецифического активируемого антитела, например биспецифического активируемого антитела, включает комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где последовательность VH CDR2 содержит SSIWRNGIVTVYADS (SEQ ID NO: 246). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо полиспецифического активируемого антитела, например биспецифического активируемого антитела, включает комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где последовательность VH CDR3 содержит WSAAFDY (SEQ ID NO: 235). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо полиспецифического активируемого антитела, например биспецифического активируемого антитела, включает комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где последовательность VH CDR2 содержит SSIWRNGIVTVYADS (SEQ ID NO: 246) , и последовательность VH CDR3 содержит WSAAFDY (SEQ ID NO: 235).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо полиспецифического активируемого антитела, например биспецифического активируемого антитела, включает комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где комбинация включает последовательность VL CDR1, содержащую RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 209); последовательность VL CDR2, содержащую AASSLQS (SEQ ID NO: 215); последовательность VL CDR3, содержащую DNGYPST (SEQ ID NO: 228); последовательность VH CDR1, содержащую SYAMS (SEQ ID NO: 212); последовательность VH CDR2, содержащую SSIWRNGIVTVYADS (SEQ ID NO: 246); и последовательность VH CDR3, содержащую WSAAFDY (SEQ ID NO: 235).

В некоторых вариантах осуществления анти-PDL1-антитела, конъюгированные анти-PDL1-антитела, активируемые анти-PDL1-антитела и/или конъюгированные активируемые анти-PDL1-антитела, описанные здесь, применяются в качестве единственных активных агентов. В некоторых вариантах осуществления анти-PDL1-антитела, конъюгированные анти-PDL1-антитела, активируемые анти-PDL1-антитела и/или конъюгированные активируемые анти-PDL1-антитела, описанные здесь, применяются в сочетании с одним или несколькими дополнительными агентами или комбинацией дополнитель-

ных агентов. Подходящие дополнительные агенты включают имеющиеся в настоящее время фармацевтические и/или хирургические методы лечения для предназначенного применения, например, такого как рак. Например, анти-PDL1-антитела, конъюгированные анти-PDL1-антитела, активируемые анти-PDL1-антитела и/или конъюгированные активируемые анти-PDL1-антитела, описанные здесь, применяются в сочетании с дополнительным химиотерапевтическим или противоопухолевым средством.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент(ы) представляет химиотерапевтический препарат, такой как химиотерапевтический препарат, выбранный из группы, состоящей из доцетаксела, паклитаксела, абраксана (т.е. конъюгированного с альбумином паклитаксела), доксорубицина, оксалиплатина, карбоплатина, цисплатина, иринотекана и гемцитабина.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент(ы) представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек, ингибитор киназы, агент, нацеливающий ингибиторы в микросреду опухоли, и/или агонист Т-клеток или NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент(ы) представляет собой лучевую терапию, одну или в комбинации с другим дополнительным агентом(ми), таким как химиотерапевтический или противоопухолевый препарат. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент(ы) представляет собой вакцину, онковирус и/или агент, активирующий DC, такой как, в качестве неограничивающего примера, агонист Толл-подобного рецептора (TLR) и/или α -CD40. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент(ы) представляет собой антитело, нацеленное на опухоль, предназначенное для элиминации опухоли посредством ADCC или посредством прямой конъюгации с токсином (например, конъюгат лекарственного средства с антителом (ADC)).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет ингибитор мишени, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, LAG-3, PD1 (также относится к PD-1), PDL1, TIGIT, TIM-3, B7H4 и Vista. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы выбран из группы, состоящей из ингибиторов B-RAFi, MEKi и Btk, таких как ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет кризотиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор микросреды опухоли выбран из группы, состоящей из ингибитора IDO, ингибитора α -CSFIR, ингибитора α -CCR4, TGF-бета, супрессорной клетки миелоидного происхождения или Т-регуляторной клетки. В некоторых вариантах осуществления агонист выбран из группы, состоящей из 0x40, GITR, CD137, ICOS, CD27 и HVEM.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор LAG-3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор PD1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор PDL1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор TIGIT. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор TIM-3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор B7H4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор является ингибитором Vista. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор B-RAFi. В некоторых вариантах осуществления ингибитор B-RAFi представляет вемурафениб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор MEKi. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор Btk. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет кризотиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор IDO. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор α -CSFIR. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор α -CCR4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет ингибитор TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет супрессорную клетку миелоидного происхождения. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет Т-регуляторную клетку.

В некоторых вариантах осуществления агонист составляет 0x40. В некоторых вариантах осуществления агонистом является GITR. В некоторых вариантах осуществления агонистом является CD137. В некоторых вариантах осуществления агонистом является ICOS. В некоторых вариантах осуществления агонистом является CD27. В некоторых вариантах осуществления агонистом является HVEM.

В некоторых вариантах осуществления анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело вводят до, и/или во время, и/или после лечения в комбинации с одним или несколькими дополнительными агентами, например, такими как химиотерапевтический препарат, противовоспалительный агент и/или иммуносупрессорный агент. В некоторых вариантах осуществления анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент формулируются в виде одной терапевтической композиции, и анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент вводятся одновременно. Альтернативно анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный

агент отделены друг от друга, например каждый из них формулируется в отдельной терапевтической композиции, и анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент вводят одновременно, или анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент вводят в разное время во время схемы лечения. Например, анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело вводят до введения дополнительного агента, анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело вводят после введения дополнительного агента, или анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент вводят поочередно. Как здесь описано, анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент вводят в однократных дозах или в многократных дозах.

В некоторых вариантах осуществления анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент(ы) вводят одновременно. Например, анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент(ы) могут формулироваться в виде одной композиции или вводиться в виде двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент(ы) вводят последовательно, или анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент вводят в разное время во время схемы лечения.

В некоторых вариантах осуществления анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело вводят до, и/или во время, и/или после лечения в комбинации с одним или более дополнительными агентами, например, в качестве неограничивающего примера, химиотерапевтическим препаратом, противовоспалительным препаратом и/или иммуносупрессорным агентом, таким как алкилирующий агент, антимаболит, антимикротрубочковый агент, ингибитор топоизомеразы, цитотоксический антибиотик и/или любой другой агент, повреждающий нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет таксан, такой как паклитаксел (например, Abрахане®). В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет антимаболит, такой как гемцитабин. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет алкилирующий агент, такой как химиотерапевтический препарат на основе платины, такой как карбоплатин или цисплатин. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент является целевым агентом, таким как ингибитор киназы, например сорафениб или эрлотиниб. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент является целевым агентом, таким как другое антитело, например моноклональное антитело (например, бевацизумаб), биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет ингибитор протеасом, такой как бортезомиб или карфилзомиб. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет иммуномодулирующий агент, такой как леналидомид или IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент является агентом, рассматриваемым в качестве стандарта ухода специалистами в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет химиотерапевтический препарат, хорошо известный специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или другое конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или другое конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент против той же мишени, что и первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, первое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например против PDL1. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или другое конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

антигенсвязывающее его фрагмент против мишени, отличной от мишени первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, первого конъюгированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, активируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или конъюгированного активируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (т.е. мишени, отличной от PDL1). В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет химерным антигенным рецептором модифицированную Т-клетку, модифицированную НК-клетку, или другую модифицированную иммунную эффекторную клетку, или иммунную эффекторную клетку, модифицированную другим рецептором. В некоторых вариантах осуществления дополнительным агентом является прохимерным антигенным рецептором модифицированную Т-клетку, модифицированную НК-клетку, или другую модифицированную иммунную эффекторную клетку, или иммунную эффекторную клетку, модифицированную другим рецептором.

В качестве неограничивающего примера антитело или антигенсвязывающий фрагмент, и/или АВ активируемого антитела является партнером по связыванию для любой мишени, указанной в табл.22. В некоторых вариантах осуществления данным дополнительным агентом является ипилимумаб, CTLA4-связывающий фрагмент ипилимумаба и/или активируемое антитело ипилимумаба.

Таблица 22. Примерные мишени

1-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LIF-R	STEAP1
Альфа-4-интегрин	CD56	DLK1	Гиалуронидаза	Lewis X	STEAP2
Альфа-V-интегрин	CD64	DLL4	ICOS	LIGHT	TAG-72
Альфа-4-бета-1-интегрин	CD70	DPP-4	IFN-альфа	LRP4	TAPA1
Альфа-4-бета-7-интегрин	CD71	DSG1	IFN-бета	LRRC26	TGF-бета

AGR2	CD74	EGFR	IFN-гамма	MCSP	TIGIT
Анти-Lewis-Y		EGFRviii	IgE	Мезотелин	TIM-3
Рецептор апелина J	CD80	Рецептор эндотелина B	Рецептор IgE (FcεRI)	MRP4	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MUC1	TLR4
B7-H4	CD86	EpCAM	IGF1R	Муцин-16 (MUC16, CA-125)	TLR6
BAFF	CD95	EPHA2	IL1B	Na/K АТРаза	TLR7
BTLA	CD117	EPHB2	IL1R	Нейтрофи льная	TLR8
Комплемент C5	CD125	ERBB3	IL2	NGF	TLR9
C-242	CD132 (IL-2RG)	F-белок RSV	IL11	Никастрин	TMEM31
CA9	CD133	FAP	IL12	Рецепторы Notch	TNF-альфа
CA19-9 (Левиса)	CD137	FGF-2	IL12p40	Notch 1	TNFR
Карбоангидраза 9	CD138	FGF8	IL-12R, IL-12Rβета 1	Notch 2	TNFRS12 A
CD2	CD166	FGFR1	IL13	Notch 3	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	Notch 4	TRAIL-R2
CD6	CD248	FGFR3	IL15	NOV	Трансферрин
CD9	CDH6	FGFR4	IL17	OSM-R	Рецептор трансферрина
CD11a	CEACAM5 (CEA)	Фолатный рецептор	IL18	OX-40	TRK-A
CD19	CEACAM6 (NCA-90)	GAL3ST1	IL21	PAR2	TRK-B
CD20	CLAUDIN-3	G-CSF	IL23	PDGF-AA	αPAR
CD22	CLAUDIN-4	G-CSFR	IL23R	PDGF-BB	VAP1
CD24	cMet	GD2	IL27/IL27R (wsx1)	PDGFR- альфа	VCAM-1
CD25	Коллаген	GITR	IL29	PDGFR- бета	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	IL-31R	PD-1	VEGF-A
CD28	CSFR	GLUT4	IL31/IL31R	PD-L1	VEGF-B
CD30	CSFR-1	GM-CSF	IL2R	PD-L2	VEGF-C
CD33	CTLA-4	GM-CSFR	IL4	Фосфатидил-серин	VEGF-D

CD38	CTGF	Рецепторы GP IIb/IIIa	IL4R	P1GF	VEGFR1
CD40	CXCL10	Gp130	IL6, IL6R	PSCA	VEGFR2
CD40L	CXCL13	GPIIB/IIIA	Рецептор инсулина	PSMA	VEGFR3
CD41	CXCR1	GNMB	Лиганды Jagged	RAAG12	VISTA
CD44	CXCR2	GRP78	Jagged 1	RAGE	WISP-1
CD44v6		HER2/neu	Jagged 2	SLC44A4	WISP-2
CD47	CXCR4	HGF	LAG-3	Сфингози н-1-	WISP-3
CD51	CYR61	hGN			

В качестве неограничивающего примера антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, и/или АВ активируемого антитела представляют или получены из антител, приведенных в табл.23.

Таблица 23. Примерные источники АВ

Торговое название антитела (название)	Мишень
Avastin™ (бевацизумаб)	VEGF
Lucentis™ (ранибизумаб)	VEGF
Erbitux™ (цетуксимаб)	EGFR
Vectibix™ (панитумумаб)	EGFR
Remicade™ (инфликсимаб)	TNFα
Humira™ (адалимумаб)	TNFα
Tysabri™ (натализумаб)	Интегрин-α-4
Simulect™ (базиликсимаб)	IL2R
Sobris™ (экулизумаб)	Комплемент C5
Raptiva™ (эфализумаб)	CD11a
Веххар™ (тозитумомаб)	CD20
Zevalin™ (ибритумомаб тиуксетан)	CD20
Rituxan™ (ритуксимаб)	CD20
(Окрелизумаб)	CD20
Arzerra™ (офатумумаб)	CD20
Gazyva™ (обинутузумаб)	CD20
Zenapax™ (даклизумаб)	CD25
Adcetris™ (брентуксимаб ведотин)	CD30
Myelotarg™ (гемтузумаб)	CD33
Mylotarg™ (гемтузумаб озогамин)	CD33
Campath™ (алемтузумаб)	CD52
ReoPro™ (абциксимаб)	Рецептор гликопротеина
Xolair™ (омализумаб)	IGE
Herceptin™ (трастузумаб)	Her2
Kadcyla™ (трастузумаб эмтанзин)	Her2
Synagis™ (паливизумаб)	F-белок RSV
(Ипилимумаб)	CTLA-4
(Тремелимумаб)	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(Пертузумаб)	Her2-neu

(Эртумаксумаб)	CD3/Her2-neu
Orencia™ (абатацепт)	CTLA-4
(Танезумаб)	NGF
(Бавитуксимаб)	Фосфатидилсерин
(Залутумумаб)	EGFR
(Малатумумаб)	EGFR
(Матузумаб)	EGFR
(Нитотузумаб)	EGFR
ICR62	EGFR
mAb 528	EGFR
CH806	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(Эдреколомаб)	EpCAM
RAV12	RAAG12
huJ591	PSMA
Enbrel™ (этанерцепт)	TNF-R
Amevive™ (алефацепт)	1-92-LFA-3
Antril™, Kineret™ (анакинра)	IL-1Ra
GC1008	TGFbeta
	Notch, например, Notch 1
	Jagged 1 или Jagged 2
(Адекатумумаб)	EpCAM
(Фигитумумаб)	IGF1R
(Тоцилизумаб)	рецептор IL-6
Stelara™ (устекинумаб)	IL-12/IL-23
Proha™ (денозумаб)	RANKL

В некоторых вариантах осуществления дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет моноклональное антитело, доменное антитело, одноцепочечное антитело, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv, scAb, dAb, однодоменное антитело на основе тяжелой цепи или однодоменное антитело на основе легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет мышинное антитело, антитело другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

В изобретении также обеспечиваются способы получения полипептида анти-PDL1-антитела и/или активируемого анти-PDL1-антитела культивированием клетки в условиях, которые приводят к экспрессии полипептида, где клетка содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело и/или активируемое антитело, описанное здесь, и/или векторы, которые включают такие выделенные последовательности нуклеиновых кислот. Изобретение обеспечивает способы получения антитела и/или активируемого антитела культивированием клетки в условиях, которые приводят к экспрессии антитела и/или активируемого антитела, где клетка содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело и/или активируемое антитело, описанные здесь, и/или векторы, которые включают такие выделенные последовательности нуклеиновых кислот.

Изобретение также обеспечивает способ получения активируемых антител, которые в активированном состоянии связываются с PDL1 путем (а) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует активируемое антитело в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ) и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которые специфически связываются с PDL1, (i) где СМ представляет полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы; и (ii) где СМ расположен в активируемом антителе таким образом, что когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, то ММ препятствует специфическому связыванию АВ с PDL1, и в расщепленном состоянии ММ не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с PDL1; и (b) выделения активируемого антитела. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любой из АВ, ММ и/или СМ, описанных здесь.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит линкерный пептид между ММ и СМ. В

некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит линкерный пептид между СМ и АВ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый линкерный пептид (LP1) и второй линкерный пептид (LP2), и где активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-LP1-СМ-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ-LP1-ММ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: спейсер-ММ-LP1-СМ-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ-LP1-ММ-спейсер. В некоторых вариантах осуществления два линкерных пептида не обязательно должны быть идентичны друг другу.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 191) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 192), где n представляет собой целое число по меньшей мере один.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGSG (SEQ ID NO: 193), GGSGG (SEQ ID NO: 194), GSGSG (SEQ ID NO: 195), GSGGG (SEQ ID NO: 196), GGGSG (SEQ ID NO: 197) и GSSSG (SEQ ID NO: 198).

В некоторых вариантах осуществления LP1 содержит аминокислотную последовательность GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 199), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 200), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 201), GSSGGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 202), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 203) или GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 204).

В некоторых вариантах осуществления LP2 содержит аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 205), GSSGT (SEQ ID NO: 206) или GSSG (SEQ ID NO: 207).

Изобретение относится к способам профилактики, замедления прогрессирования, лечения, ослабления симптома или иного облегчения опосредованного PDL1 заболевания у субъекта введением терапевтически эффективного количества анти-PDL1-антитела, конъюгированного анти-PDL1-антитела, активируемого анти-PDL1-антитела и/или конъюгированного активируемого анти-PDL1-антитела, описанного здесь, субъекту, нуждающемуся в этом.

Изобретение также относится к способам профилактики, замедления прогрессирования, лечения, ослабления симптома или иного облегчения рака у субъекта введением терапевтически эффективного количества анти-PDL1-антитела, конъюгированного анти-PDL1-антитела, активируемого анти-PDL1-антитела и/или конъюгированного активируемого анти-PDL1-антитела, описанного здесь, субъекту, нуждающемуся в этом. Известно, что PDL1 экспрессируется при многих видах рака, например, таких как меланома, немелкоклеточный рак легкого, рак носоглотки, глиобластома/смешанная глиома, аденокарцинома ободочной кишки, гепатоцеллюлярная карцинома, уротелиальный рак, множественная миелома, рак яичника, рак желудка, рак пищевода, рак поджелудочной железы, почечноклеточная карцинома (PCC), рак молочной железы, лимфомы и лейкозы (см., например, Chen et al., "Molecular Pathways: Next-Generation Immunotherapy - Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1", Clin. Can. Res., vol. 18: 6580-6587 (2012), содержание данной публикации включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, карциноид, рак шейки матки, рак ободочной кишки, рак эндометрия, глиому, злокачественные опухоли головы и шеи, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечноклеточный рак, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, урогенитальный рак и/или уротелиальный рак.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы (MEL), почечноклеточной карциномы (RCC), плоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), неплакоклеточного НМРЛ, колоректального рака (CRC) кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC), гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), плоскоклеточной карциномы головы и шеи, карцином пищевода, яичника, органов желудочно-кишечного тракта и молочной железы, или гематологического злокачественного заболевания, такого как множественная миелома, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина/первичная медиастинальная В-клеточная лимфома и хронический миелоидный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак представляет злокачественную опухоль, экспрессирующую PDL1.

Изобретение также относится к способам лечения пациентов, страдающих раком, с аутоиммунным или воспалительным заболеванием введением терапевтически эффективного количества анти-PDL1-антитела, конъюгированного анти-PDL1-антитела, активируемого анти-PDL1-антитела и/или конъюгированного активируемого анти-PDL1-антитела, описанного здесь, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет колит, РА, панкреатит, диабет или пневмонит.

Анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело, используемое в любом из вариантов осуществления этих способов и применений, можно вводить на любой стадии заболевания. Например, такое анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или

конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело, можно вводить пациенту, страдающему раком на любой стадии, от ранней до метастатической стадии. Термины "субъект" и "пациент" используются здесь взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек, примат, отличный от человека, домашнее животное (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или зоопарковое животное. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект является домашним животным. В некоторых вариантах осуществления субъект является животным, находящимся на попечении ветеринара.

Анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело, и его терапевтические композиции вводят субъекту, страдающему или подверженному риску развития заболевания или расстройства, связанного с аномальной экспрессией и/или активностью PDL1. Субъект, страдающий или подверженный риску развития заболевания или расстройства, связанного с аномальной экспрессией и/или активностью PDL1, идентифицируется с использованием любого из различных методов, известных в данной области. Например, субъекты, страдающие раком или другим неопластическим состоянием, идентифицируются с использованием любого из различных клинических и/или лабораторных анализов, таких как физическое обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъекты, страдающие воспалением и/или воспалительным расстройством, идентифицируются с использованием любого из различных клинических и/или лабораторных анализов, таких как физическое обследование и/или анализ жидкости организма, например, анализ крови, мочи, и/или кала, для оценки состояния здоровья.

Введение анти-PDL1-антитела, конъюгированного анти-PDL1-антитела, активируемого анти-PDL1-антитела и/или конъюгированного активируемого анти-PDL1-антитела пациенту, страдающему заболеванием или расстройством, связанным с аномальной экспрессией и/или активностью PDL1, считается успешным, если достигнута любая из ряда лабораторных или клинических целей. Например, введение анти-PDL1-антитела, конъюгированного анти-PDL1-антитела, активируемого анти-PDL1-антитела и/или конъюгированного активируемого анти-PDL1-антитела пациенту, страдающему заболеванием или расстройством, связанного с аномальной экспрессией и/или активностью PDL1, считается успешным, если один или несколько симптомов, связанных с заболеванием или расстройством, облегчаются, уменьшаются, подавляются или не прогрессируют в дальнейшем, т.е. в худшее состояние. Введение анти-PDL1-антитела, конъюгированного анти-PDL1-антитела, активируемого анти-PDL1-антитела и/или конъюгированного активируемого анти-PDL1-антитела пациенту, страдающему заболеванием или расстройством, связанным с аномальной экспрессией и/или активностью PDL1, считается успешным, если заболевание или расстройство вступает в стадию ремиссии или не прогрессирует в дальнейшем, т.е. в худшее состояние.

В некоторых вариантах осуществления анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело, вводят до и/или во время, и/или после лечения в комбинации с одним или более дополнительными агентами, например такими как химиотерапевтический препарат, противовоспалительный агент и/или иммуносупрессорный агент. В некоторых вариантах осуществления анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент(ы) вводятся одновременно. Например, анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент(ы) могут формулироваться в виде одной композиции или вводиться в виде двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления анти-PDL1-антитело, конъюгированное анти-PDL1-антитело, активируемое анти-PDL1-антитело и/или конъюгированное активируемое анти-PDL1-антитело и дополнительный агент(ы) вводят последовательно.

Изобретение также обеспечивает способы и наборы для применения активируемых анти-PDL1-антител и/или конъюгированных активируемых анти-PDL1-антител в различных диагностических и/или профилактических показаниях. Например, изобретение обеспечивает способы и наборы для детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени, представляющей интерес, у субъекта или в образце, посредством (i) контактирования субъекта или образца с активируемым анти-PDL1-антителом, где анти-PDL1-антитело включает маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, и его антигенсвязывающий участок или фрагмент (АВ), которое специфически связывается с интересующей мишенью, где активируемое анти-PDL1-антитело в нерасщепленном неактивированном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (a) где ММ представляет пептид, который ингибирует связывание АВ с PDL1, и где ММ не имеет аминокислотной последовательности встречающегося в природе партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и (b) где, когда АВ находится в нерасщепленном неактивированном состоянии, то ММ препятствует специфическому связыванию АВ с PDL1, и когда АВ находится в расщепленном, активи-

рованном состоянии, то ММ не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с PDL1; и (ii) измерения уровня активированного активируемого анти-PDL1-антитела у субъекта или в образце, где детектируемый уровень активированного активируемого анти-PDL1-антитела у субъекта или в образце указывает, что расщепляющий агент и PDL1 присутствуют у субъекта или в образце, и где недетектируемый уровень активированного активируемого анти-PDL1-антитела у субъекта или в образце указывает, что расщепляющий агент, PDL1 или оба расщепляющий агент и PDL1 отсутствуют у субъекта или в образце.

В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело представляет активируемое анти-PDL1-антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка расположена в АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активированного анти-PDL1-антитела у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое анти-PDL1-антитело включает детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов детектируемая метка включает визуализирующий агент, контрастный агент, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или несколько ионов металлов или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов визуализирующий агент включает радиоизотоп. В некоторых вариантах осуществления этих методов и наборов радиоизотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов контрастный агент включает йод, гадолиний или оксид железа. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов фермент включает пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу или β -галактозидазу. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов флуоресцентная метка включает желтый флуоресцентный белок (YFP), циановый флуоресцентный белок (CFP), зеленый флуоресцентный белок (GFP), модифицированный красный флуоресцентный белок (mRFP), красный димерный флуоресцентный белок (RFP dimer2), HCREd или производное европия. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов люминесцентная метка включает производное N-метилякридия. В некоторых вариантах осуществления этих способов метка содержит метку Alexa Fluor®, такую как Alex Fluor® 680 или Alex Fluor® 750. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов метка на основе лиганда включает биотин, авидин, стрептавидин или один или более гаптенов.

В некоторых вариантах осуществления этих методов и наборов субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления этих методов субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека, такое как примат, отличный от человека, домашнее животное (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или зоопарковое животное. В некоторых вариантах осуществления субъект является грызуном.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов данный способ является способом *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов данный способ является способом *in situ*. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов данный способ является способом *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов данный способ является способом *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления способов и наборов данный способ применяется для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящих для лечения активируемым анти-PDL1-антителом по изобретению, с последующим лечением введением данного активируемого анти-PDL1-антитела и/или конъюгированного активируемого анти-PDL1-антитела субъекту, нуждающемуся в этом. Например, пациенты, которые дают положительный результат на мишень (например, PDL1) и на протеазу, которая расщепляет субстрат в расщепляемом фрагменте (СМ) активируемого анти-PDL1-антитела, которое тестируется в этих способах, идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким активируемым анти-PDL1-антителом, содержащим такой СМ, и затем пациенту вводят терапевтически эффективное количество активируемого анти-PDL1-антитела и/или конъюгированного активируемого анти-PDL1-антитела, которое было протестировано. Аналогично пациенты, которые дают отрицательный результат на одно или оба из мишени (например, PDL1) и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ в активируемом антителе, которое тестируется с использованием этих способов, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другого вида лечения. В некоторых вариантах осуществления такие пациенты могут быть протестированы с использованием других активируемых анти-PDL1-антител до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое анти-PDL1-антитело для лечения (например, активируемое анти-PDL1-антитело, содержащее СМ, который расщепляется у пациента в очаге заболевания). В некоторых вариантах осуществления затем пациенту вводят

терапевтически эффективное количество активируемого и/или конъюгированного анти-PDL1-антитела, на которое у пациента имеется положительный результат. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любой из АВ, ММ и/или СМ, описанных здесь.

Фармацевтические композиции по изобретению могут включать антитело по изобретению и носитель. Эти фармацевтические композиции могут быть включены в наборы, например такие как диагностические наборы.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлен график, показывающий результаты анализа связывания на основе ELISA, свидетельствующие о том, что PDL1 с60 ScFv-фаг специфически связывается с PDL1 человека и мыши.

На фиг. 2 представлен график, показывающий, что hPDL1 ингибирует связывание клонов 12, 18 и 60 с hPDL1 в формате ELISA и, кроме того, что mPDL1 ингибирует связывание клона 60 с mPDL1.

На фиг. 3 представлен график, показывающий результаты исследования насыщенного связывания, и они демонстрируют, что клон анти-PDL1 60:IgG связывается с PDL1 человека с аффинностью связывания на уровне ~1 нМ и с PDL1 мыши на уровне 30 нМ.

На фиг. 4А и В представлена серия графиков, показывающих специфичность и перекрестную реактивность H2 (фиг. 4А) и специфичность и перекрестную реактивность H3W (фиг. 4В).

На фиг. 5А и В представлена серия графиков, показывающих, что объединение CDR3 зрелых вариабельных областей тяжелых цепей с CDR2 вариабельных областей тяжелых цепей приводит к получению антител с повышенной аффинностью к PDL1 человека.

На фиг. 6А, В, С и D представлена серия графиков, показывающих, что анти-PDL1-антитело C5H9 связывается с человеческим и мышинным PDL1 почти с одинаковой аффинностью и что анти-PDL1-антитела C5B10 и C5E10 связываются только с человеческим PDL1.

На фиг. 7 представлен график, показывающий способность анти-PDL1-антитела C5H9 связываться с высокой и равной аффинностью с человеческим, мышинным PDL1 и PDL1 обезьяны циномоглус.

На фиг. 8А и В представлена серия графиков, показывающих, что анти-PDL1-антитело C5H9v2 обладает более низким потенциалом иммуногенности и улучшенной технологичностью получения. Данные графики демонстрируют снижение прогнозируемой иммуногенности, увеличение уровней экспрессии (3x) и увеличение процентного содержания мономеров в человеческом формате IgG1.

На фиг. 9А, В и С представлена серия графиков, показывающих способность анти-PDL1-антитела C5H9v2 связываться с высокой аффинностью с (А) мышинным, (В) обезьяны циномоглус и (С) человеческим PDL1. На фиг. 9А-С показано, что оба анти-PDL1-антитела C5H9 и C5H9v2 связываются с человеческим, мышинным PDL1 и PDL1 обезьяны циномоглус почти с одинаковой аффинностью.

На фиг. 10 представлен график, показывающий специфичность C5H9v2 для панели человеческих и мышинных белков. На фиг. 10 показано, что анти-PDL1-антитело C5H9v2 связывается только с человеческим и мышинным PDL1, демонстрируя специфичность к PDL1.

На фиг. 11 представлена серия графиков, показывающих блокирование B7-1 и PD1. На фиг. 11 показано, что оба анти-PDL1-антитела C5H9 и анти-PDL1-антитело C5H9v2 являются эффективными блокаторами связывания B7-1 или PD1 с PDL1, и это блокирование включает все три вида PDL1, человека, обезьяны циномоглус и мыши с одним значением EC₅₀ на уровне нМ.

На фиг. 12 представлен график, показывающий, что анти-PDL1-антитело C5H9 ускоряет начало развития диабета у мышей NOD, аналогично анти-PDL1-антителу 10F9G2, использованному в качестве положительного контроля.

На фиг. 13 представлен график, показывающий, что анти-PDL1-антитело C5H9v2 ускоряет начало диабета развития у мышей NOD дозозависимым образом.

На фиг. 14 представлен график, показывающий, что анти-PDL1-антитело C5H9v2 ингибирует рост сингенных опухолей MC38, аналогично анти-PDL1-антителу 10F9G2, использованному в качестве положительного контроля.

На фиг. 15 представлен график, показывающий изотермы связывания для активируемых анти-PDL1-антител, которые включают анти-PDL1-антитело C5H9v2.

На фиг. 16 представлен график, показывающий изотермы связывания для активируемых анти-PDL1-антител, которые включают анти-PDL1-антитело C5H9v2.

На фиг. 17 представлен график, показывающий изотермы связывания для активируемых анти-PDL1-антител, которые включают анти-PDL1-антитело C5H9v2.

На фиг. 18А и В представлена серия графиков, показывающих, что при введении активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2 в дозе 1 мг/кг отсутствует индукция диабета, и активируемое анти-PDL1-антитело PL18-0003-C5H9v2 при введении в дозе 1 мг/кг задерживает индукцию диабета по сравнению с анти-PDL1-антителом C5H9v2, введенным в дозе 1 мг/кг, у мышей NOB (фиг. 18А); кроме того, активируемое анти-PDL1-антитело PL15-0003-C5H9v2 при введении в дозе 3 мг/кг индуцировало развитие диабета у 2 из 8 мышей NOB (75% без диабета), по сравнению с введением анти-PDL1-антитела C5H9v2 в дозе 1 мг/кг, которое обеспечивало 38% мышей NOB без диабета (фиг. 18В).

На фиг. 19 представлен график, показывающий, что активируемые анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2 и PL18-0003-C5H9v2 ингибируют рост сингенных опухолей MC38, аналогично анти-PDL1-

антителу C5H9v2.

На фиг. 20А, В, С и D представлена серия графиков, показывающих процент анти-PDL1-антитела C5H9v2 и активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2, связанных с СВ4+ и СВ8+ Т-клетками из периферической крови (фиг. 20А, В) или селезенки (фиг. 20С, D). На всех графиках кружками показано изотипное антитело, квадраты представляют анти-PDL1-антитело C5H9v2, и треугольниками показано активируемое анти-PDL1-антитело PL15-0003-C5H9v2.

На фиг. 21А и В представлена серия графиков, показывающих, что присутствие протеаз, происходящих из опухоли, способных расщеплять активируемое анти-PDL1-антитело PL15-0003-C5H9v2 (показано квадратами), не приводило к высоким уровням активированного активируемого антитела в крови по сравнению с анти-PDL1-антителом C5H9v2 (показано кружками) или изотипным антителом (показано треугольниками) (фиг. 21А), несмотря на то, что концентрации активируемого антитела в плазме выше, чем антитела (фиг. 21В).

На фиг. 22 представлен график, показывающий способность активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2 повышать CMV-стимулированную секрецию IFN-гамма по сравнению с контрольным hIgG4, но со сниженной активностью по сравнению с родительским анти-PDL1-антителом C5H9v2.

На фиг. 23А, В, С и D представлена серия графиков, показывающих способность активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2 активироваться и связываться с замороженными тканями злокачественной опухоли MC38 мыши с использованием метода визуализации *in situ*.

На фиг. 24 показано, что активируемое анти-PDL1-антитело PL15-0003-C5H9v2 имело более высокое значение EC₅₀ для связывания PDL1 и блокирования PD1, чем анти-PDL1-антитело, что было определено с помощью ELISA. На фигуре также показано, что активация активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2 матриптазой полностью восстанавливало связывание PDL1 и блокирование PD1 до уровней, сравнимых с уровнями, определенными для анти-PDL1-антитела C5H9v2.

На фиг. 25А и В представлена серия графиков, показывающих способность активируемых анти-PDL1-антител, обозначенных здесь как PL07-2001-C5H9v2 и PF07-3001-C5H9v2, и анти-PDL1-антитела, обозначенного здесь C5H9, связываться с человеческим или мышинным PDL1.

На фиг. 26А, В, С представлена серия графиков, показывающих способность активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2, uPA-активированного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2, MMP14-активированного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2 и анти-PDL1-антитела C5H9v2 блокировать связывание человеческого PD1 (PD-1) с PDL1 человека (фиг. 26А), PD1 (PD-1) обезьяны циномоглус с PDL1 обезьяны циномоглус (фиг. 26В) или крысиного PD1 (PD-1) с PDL1 крысы (фиг. 26С).

На фиг. 27А и В представлена серия графиков, показывающих способность активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2, uPA-активированного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2, MMP14-активированного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2 и анти-PDL1-антитела C5H9v2 блокировать связывание человеческого PD1 (PD-1) с PDL1 человека (фиг. 27А), PD1 (PD-1) обезьяны циномоглус с PDL1 обезьяны циномоглус (фиг. 27В) или крысиного PD1 (PD-1) с PDL1 крысы.

На фиг. 28 представлен график, показывающий способность активируемых анти-PDL1-антител PL15-0003-C5H9v2, PL15-2001-C5H9v2 и PL15-3001-C5H9v2 ингибировать рост сингенных опухолей MC38, аналогично анти-PDL1-антителу C5H9v2, которое использовали в качестве положительного контроля.

На фиг. 29А, В, С представлена серия графиков, показывающих, что присутствие протеаз, происходящих из опухоли, способных расщеплять активируемые анти-PDL1-антитело C5H9v2 или активируемое анти-PDL1-антитело PL15-0003-C5H9v2, PL15-2001-C5H9v2 или PL15-3001-C5H9v2, не приводило к высоким уровням активированных активируемых антител в крови.

На фиг. 30 представлено изображение, показывающее способность протеаз в опухоли, имплантированной мыши, активировать активируемое анти-PDL1-антитело PL07-2001-C5H9v2.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам (mAb) и активируемым моноклональным антителам, которые специфически связываются с лигандом 1 полипептида программируемой смерти. PDL1 представляет собой трансмембранный белок с молекулярной массой 40 кДа типа I, который образует комплекс с его рецептором полипептида программируемой смерти клеток (PD1), также известным как CD279. Взаимодействие PDL1 с его рецептором PD1 на Т-клетках обеспечивает сигнал, который ингибирует TCR-опосредованную активацию продукции IL-2 и пролиферацию Т-клеток. Аберрантная экспрессия и/или активность PDL1 и связанный с PDL1 сигнальный путь участвуют в патогенезе многих заболеваний и расстройств, таких как рак, воспаление и аутоиммунитет.

Активируемые анти-PDL1-антитела применяются в способах лечения, профилактики, замедления прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома заболевания или расстройства, связанного с аномальной экспрессией и/или активностью PDL1. Например, активируемые анти-PDL1-антитела используются в способах лечения, профилактики, замедления прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома рака или другого неопластического состояния.

Активируемые антитела включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые спе-

цифически связываются с PDL1, связанным с маскирующим фрагментом (ММ) таким образом, что соединение ММ уменьшает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться с PDL1. В некоторых вариантах осуществления ММ связан через последовательность, которая включает субстрат для протеазы, например протеазы, которая локализована совместно с PDL1 в месте, подвергнутом лечению, у субъекта.

Типичные активируемые анти-PDL1-антитела по изобретению включают, например, активируемые антитела, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, которые представляют или получены из антител, описанных в примерах, например в примере 3 и примере 4.

В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает тяжелую цепь, которая содержит или получена из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 и 56, и легкую цепь, которая содержит или получена из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит комбинацию последовательности участка, определяющего комплементарность, вариабельной области тяжелой цепи 1 (VH CDR1, также называемого здесь CDRH1), последовательности участка, определяющего комплементарность, вариабельной области тяжелой цепи 2 (VH CDR2, также называемого здесь CDRH2), последовательности участка, определяющего комплементарность, вариабельной области тяжелой цепи 3 (VH CDR3, также называемого здесь CDRH3), последовательности участка, определяющего комплементарность, вариабельной области легкой цепи 1 (VL CDR1, также называемого здесь CDRL1), последовательности участка, определяющего комплементарность, вариабельной области легкой цепи 2 (VL CDR2, также называемого здесь CDRL2), и последовательности участка, определяющего комплементарность, вариабельной области легкой цепи 3 (VL CDR3, также называемого здесь CDRL3), где по меньшей мере одна последовательность CDR выбрана из группы, состоящей из последовательности VH CDR1, показанной в табл.15; последовательности VH CDR2, показанной в табл.15; последовательности VH CDR3, показанной в табл.15; последовательности VL CDR1, показанной в табл.15; последовательности VL CDR2, показанной в табл.15; и последовательности VL CDR3, показанной в табл.15.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2, последовательности VH CDR3, последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где комбинация представляет комбинацию шести последовательностей CDR (VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3), показанных в одной строке в табл. 15.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, которая содержит комбинацию последовательности VH CDR1, последовательности VH CDR2 и последовательности VH CDR3, где комбинация представляет комбинацию трех последовательностей CDR тяжелой цепи (VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3), показанные в одной строке в табл.15.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает легкую цепь, которая содержит комбинацию последовательности VL CDR1, последовательности VL CDR2 и последовательности VL CDR3, где комбинация представляет комбинацию трех последовательностей CDR легкой цепи (VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3), показанных в одной строке в табл.15.

В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает тяжелую цепь, которая содержит или получена из аминокислотной последовательности тяжелой цепи, показанной в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает легкую цепь, которая содержит или получена из аминокислотной последовательности легкой цепи, показанной в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает тяжелую цепь, которая содержит или получена из аминокислотной последовательности тяжелой цепи, показанной в табл.15, и легкую цепь, которая содержит или получена из аминокислотной последовательности, показанной в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи из комбинаций, показанных в группе А в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, показанных в группе В в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, показанных в группе С в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, показанных в группе В в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, показанных в группе Е в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, показанных в группе F в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, показанных в группе F в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, показанных в группе F в табл.15.

лой цепи и вариательной области легкой цепи, показанных в группе G в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи, показанных в группе H в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи, показанных в группе I в табл.15. В некоторых вариантах активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи, показанных в группе J в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи, показанных в группе K в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи, показанных в группе K в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи, показанных в группе L в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи, показанных в группе M в табл.15. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи, показанных в группе N в табл.15. В некоторых вариантах активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи, показанных в группе O в табл.15.

Таблица 15: последовательности вариательной области тяжелой цепи (VH) и вариательной области легкой цепи (VL) для активируемых антител, которые связываются с PDL1 (последовательности CDR подчеркнуты; последовательности CDR, раскрытые здесь, идентифицированы в соответствии с определениями по системе нумерации Кабата, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))).

Таблица 15

Группа A	
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYGF ^{SVWRQAPGQGLEWMGWITAYNGNTNYAQKLQGRVTM} TTDTSTSTVYME ^{LRSLRSDDTAVYYCARDYFYGMDVWGQGT} TVTVSS (SEQ ID NO: 248)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFSTY ^{ALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGKAHYAQKFQGRVTI} TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR ^{KFHVSGSPFGMDVWGQGT} TVTVSS (SEQ ID NO: 249)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTS ^{YDVHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQKFQGRVTI} TRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR ^{ERIQLWFDYWGQGT} (SEQ ID NO: 250)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKVSGGIFSTY ^{AINWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANHAQKFQGRVTI} TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD ^{QGIAAALFDYWGQGT} LVTVSS (SEQ ID NO: 251)
VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFTFD ^{DYVHWVRQAPGKLEWVSGNSGNIGYADSVKGRFTISR} NAKNSLYLQMN ^{SLRAEDTALYYCAVPFDYWGQGT} LVTVSS (SEQ ID NO: 252)

VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGRAHYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHVSVGSPFGMDVWGQGT ^T TVTVSS (SEQ ID NO: 253)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGKAHYAQKFQGRVTI TADESTTTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKYDYVSVGSPFGMDVWGQGT ^T TVTVSS (SEQ ID NO: 254)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGSANYAQKFQDRVTI TADESTSAAYMELSSLRSEDTAVYYCARDSSGWSRYMDVWGQGT ^T TVTVSS (SEQ ID NO: 255)
VH	QVQLVQSGAEVKEPGSSVKVCKASGGTFNSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPLFGLAHYAQKFQGRVTI TADESTNTAYMDLSSLRSEDTAVYYCARKYSYVSVGSPFGMDVWGQGT ^T TVTVSS (SEQ ID NO: 256)
VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGITFDYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNRGRIEYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKGRFRYFDWFLDYWGQGT ^L TVTVSS (SEQ ID NO: 257)
VH	QMQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYFWSGFSAFDIWGGKGT ^L TVTVS (SEQ ID NO: 449)
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLWVYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 258)
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 259)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISWLAWYQOKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 260)
VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 261)
VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 262)
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGT ^R LEIK (SEQ ID NO: 263)
VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISALAWYQOKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQFN ^S YPFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 264)
	DIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQGISWLAWYQOKPGRAPKVLIIYKASTLESQVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 450)
Група B	
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWF ^G ELAFDYWGQGT ^L TVTVSS (SEQ ID NO: 265)
VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSLPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 266)
Група C	
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF ^D YWGQGT ^L TVTVSA (SEQ ID NO: 267)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSWIHWVRQAPGKGLEWVAWILPYGGSSYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF ^D YWGQGT ^L TVTVSA (SEQ ID NO: 451)

VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 268)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYYNVPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 452)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYYAPPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 453)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYYTVPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 454)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVINTFLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYYTVPRTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 455)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQGYGVPRTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 456)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYLFPTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 457)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYFITPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 458)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYYTPTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 459)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQFFYTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 460)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSLFTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 461)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSLYTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 462)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSWYHPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 463)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYFYIPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 464)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYWYTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 465)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYFIPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 466)
Грyнна D	
VH	METGLRWLLLVAVLKGVQCLSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFTITNYHMFWRQAPGKGLEWIGVIT SSGIGSSSTYYATWAKGRFTISKSTSTVNLRITSPTTEDTATYFCARDYFTNTYYALDIWPGTLTVTS S (SEQ ID NO: 467)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFSTYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGKAHYAQK FGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARK HFVSGSPFGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO: 249)

VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYDVHWVRQAPGQRL</u> EWMGWLHADTGITKFSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE <u>RIQLWFDYWGQ</u> GLTVTVSS (SEQ ID NO: 468)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKVSGGI <u>FSTYAINWVRQAPGQGLEW</u> MGGIIPIFGTANHAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD <u>QGIAAALFDYWGQ</u> GLTVTVSS (SEQ ID NO: 251)
VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFT <u>FDYVHWVRQAPGKLEWV</u> SGISGNSGNIYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAV <u>PFDYWGQ</u> GLTVTVSS (SEQ ID NO: 469)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKTSGDT <u>FSSYAISWVRQAPGQGLEW</u> MGGIIPIFGRAHYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR <u>KHFVSGSPFGMDVWGQ</u> TTVTVSS (SEQ ID NO: 253)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKTSGDT <u>FSSYAISWVRQAPGQGLEW</u> MGGIIPIFGKAHYAQKFQGRVTI TADESTTTAYMELSSLRSEDTAVYYCARK <u>YDVS</u> SGSPFGMDVWGQTTTVTVSS (SEQ ID NO: 254)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGT <u>FSSYAINWVRQAPGQGLEW</u> MGGIIPIFGSANYAQKFQDRVTI TADESTSAAYMELSSLRSEDTAVYYCARD <u>SSGWSRYMDVWGQ</u> TTVTVSS (SEQ ID NO: 255)
VH	QVQLVQSGAEVKEPGSSVKVSKASGGT <u>FNSYAISWVRQAPGQGLEW</u> MGGIIPFLGIAHYAQKFQGRVTI TADESTNTAYMDLSSLRSEDTAVYYCARK <u>YSYVSGSPFGMDVWGQ</u> TTVTVSS (SEQ ID NO: 256)
VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGIT <u>FDYGMHWVRQAPGKLEWV</u> SGISWNRGRIEYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK <u>GRFRYFDWFLDYWGQ</u> GLTVTVSS (SEQ ID NO: 257)
VL	MDTRAPTQLLGLLLWLPGARCALVMTQ <u>TPSSTSTAVGGT</u> VTIKCQASQSI SVYLAWYQQKPGQP <small>PKLLI</small> YSASTLASGVPSRFKGSRSRSGTEYTLTISG <u>VQREDAATYYCLGS</u> AGS (SEQ ID NO: 470)
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY <u>LWVYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI</u> PARFSGSGSGTD FTLTISLSEPEDFAVYYC <u>QQRSNWPRTFGQ</u> GTKVEIK (SEQ ID NO: 258)
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY <u>LAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI</u> PARFSGSGSGTD FTLTISLSEPEDFAVYYC <u>QQRSNWPRTFGQ</u> GTKVEIK (SEQ ID NO: 259)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISS <u>LAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD</u> FTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYNSYPYTFGQ</u> GTKLEIK (SEQ ID NO: 260)
VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSY <u>LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPWTFGQ</u> GTKVEIK (SEQ ID NO: 261)
VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSY <u>LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFGG</u> GTKVEIK (SEQ ID NO: 262)
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY <u>LAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI</u> PARFSGSGSGTD FTLTISLSEPEDFAVYYC <u>QQRSNWPRTFGQ</u> TRLEIK (SEQ ID NO: 263)
VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISS <u>LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES</u> GVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYC <u>QQFNSYPFTFGP</u> GTKVDIK (SEQ ID NO: 264)
Група E	
VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT <u>FSSYIMMWVRQAPGKLEWV</u> SSIYPSGGITFYADTVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARI <u>KLGTVT</u> TVDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 471)
VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSD <u>VGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM</u> IYDVSNRPSGVSNRFSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYC <u>SSYTSSTRVFGT</u> GTKVTVL (SEQ ID NO: 472)

Група F	
VH	EVKLQESGPSLVKPSQTL SLTCSVTGYSITS <u>SDYWNWIRKFPGNKLEYVGYISYTGSTYYNPSLKS</u> RISIT RDTSKNQYYLQ LN SVTSED TATYYCARYGGWLS PF FDYWGQ TTLTVSS (SEQ ID NO: 473)
VH	EVQLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT YSINWIRQPPGKLEWLGVMWAGG TNSNSVLKS RLIIS KDNSK SQVFLKMNSLQ TDDTARYYCARYYGN SPYYAIDYWGQ TSVTVSS (SEQ ID NO: 474)
VH	EVKLQESGPSLVKPSQTL SLTCSVTGYSIIS <u>SDYWNWIRKFPGNKLEYLGYISYTGSTYYNPSLKS</u> RISIT RDTSKNQYYLQ LN SVTTE DATYYCARRGGWLL PF FDYWGQ TTLTVSS (SEQ ID NO: 475)
VH	EVKLQESGPSLVKPGASVKLSCKASGYT F TSYDINWVKQRPQGLEWIGWIFPRDNNTKY NENFKG KATL TVDTSS TAYMELHSLT SEDSAVYFCTKENWVG DFDYWGQ TTLTLSS (SEQ ID NO: 476)
VH	EVQLQ QSGPDLVTPGASVRI SCQASGYT FPDY YMNWVKQSHGKSLEWIGDIDPNYGG T TYNQ RFKG KAIL TVDRSS STAYMELRSLT SEDSAVY YCARGAL TDWGQ TS TLTVSS (SEQ ID NO: 477)
VH	EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASSSVSYIYWFQ QKPGQSPRPLIYAAFNRATGIPARFSGSGSGTDY TLTISSLEPEDFAVY YCQQWSNNPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 478)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYT FPDY YMNWVRQAPGQ GLEWMDIDPNYGG T NYAQ RFQGRVTM TRDTSI STAYMELRSLR SDDTAVY YCARGAL TDWGQ GM TVTVSS (SEQ ID NO: 479)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYT FPDY YMNWVRQAPGQ SLEWMDIDPNYGG T NYNQ RFQGRVTM TRDTSI STAYMELRSLR SDDTAVY YCARGAL TDWGQ GM TVTVSS (SEQ ID NO: 480)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYT FPDY YMNWVRQAPGQ SLEWMDIDPNYGG T NYNQ RFQGRVTM TVDRSS STAYMELRSLR SDDTAVY YCARGAL TDWGQ GM TVTVSS (SEQ ID NO: 481)
VH	EVQLVESGGGLVQPG RSRLSCTASGYT FPDY YMNWVRQAPGK GLEWVDIDPNYGG T TYAASVKGRFTI SVDRSKSIAYLQ MSLKTEDTAVY YCTRGALTDWGQ GM TVTVSS (SEQ ID NO: 482)
VH	EVQLVESGGGLVQPG RSRLSCTASGYT FPDY YMNWVRQAPGK GLEWVDIDPNYGG T TYNASVKGRFTI SVDRSKSIAYLQ MSLKTEDTAVY YCARGALTDWGQ GM TVTVSS (SEQ ID NO: 483)
VL	DIVMTQSHKLMSTSVGDRV SITCKASQDVGTA VAWYQ QKPGQSPKLLIY WASTRHTGVPDRFTGSGSGTD FTLTISNVQSEDLADYFCQ QDSSYPLTFGAGTK VELK (SEQ ID NO: 484)
VL	DIVTTQSHKLMSTSVGDRV SITCKASQDVGTA VAWYQ QKPGQSPKLLIY WASTRHTGVPDRFTGSGSGTD FTLTISNVQSEDLADYFCQ QDSSYPLTFGAGTK VELK (SEQ ID NO: 485)
VL	DIVMTQSPSSLA VS VG EK VSMGCKSSQ LLYSSNQKNSLAWYQ QKPGQSPKLLIDWASTRES GV PDRFTG SGSGTDFTLTIS SVKAEDLAVY YCQ QYYGYPLTFGAGTK LELK (SEQ ID NO: 486)
VL	DIVMTQSPAIMSAS PGEKVTMTCSASSI RYMH WYQ QKPGTSPKRWISD TSKLTSGV PARFSGSGSGT SY ALTISSMEAE DAATYYCHQRSSYPWT FGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 487)
VL	QIVLSQSPAILSAS PGEKVTMTCRASSSVSYIYWFQ QKPGSSPKPWIYATFN LASGV PARFSGSGSGT SY SLTISR VETEDAATYYCQQWSNNPLTFGAGTK LELK (SEQ ID NO: 488)
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASSSVSYIYWFQ QKPGQAPRLIYAAFNRATGIPARFSGSGSGTDY TLTISSLEPEDFAVY YCQQWSNNPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 489)
VL	QIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASSSVSYIYWFQ QKPGQSPRPLIYATFN LASGIPARFSGSGSGT SY TLTISRLEPEDFAVY YCQQWSNNPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 490)
VL	DIQLTQSPSSLSASV GDRVTITCRASSGVS IYWFQ QKPGKAPKLLIYAAFNLASGV PSR FSGSGSGTEY TLTISS LQPEDFATYYCQQWSNNPLTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 491)

VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSGVSIIYWFQQKPGKAPKPLIYAAFNLASGVPSRFSGSGSGTEY TLTISSLQPEDFATYYCQQWSNNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 492)
VL	DIQLTQSPSILSASVGDRVTITCRASSSVSYIYWFQQKPGKAPKPLIYATFNLASGVPSRFSGSGSGTSY TLTISSLQPEDFATYYCQQWSNNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 493)

Група G	
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTM TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARALPSGTLVGGWFDWPGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 494)
VH	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRSLSCAASGFTFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDVFPETFSMNYGMDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 495)
VH	QVQLVQSGGGVVQPGGSLRSLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSLISGDGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNSLYLQMNLSRTEDTALYYCAKVLPLCSSTSCYGSVGAFDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 496)
VH	QVQLVQSGGSVVRPAGESLRSLSCVASGFIFDNYDMSWVRQVPGKGLEWVSRVNWNGGSTTYADAVKGRFTI SRDNTKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCVREVFVAYDLWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 497)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSCVFGDTFRGLYIHWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TTDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASGLRWGIWGFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 498)
VH	EVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCAFGGTFSDNAISWVRQAPGQGPPEWMGGIIPIFGKPNYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMVLSSLRSEDTAVYYCARTMVRGFLGVMDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 499)
VH	QVQLVQSGGGVLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKQFVTIFGVPRYGMVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 500)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSYAIISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRQMFAGIDFWGPGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 501)
VH	EVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCVSGGTFGTYALNWVRQAPGQGLEWMGRIVPLIGLVNYAHNFEGRISI TADKSTGTAYMELSNLRSDDTAVYYCAREVYGGNSDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 502)
VH	QVQLVQSGGEVKKPGASVKVSCASGYTLLSHGITWVRQAPGQGLEWMGWISAHNGHASNAQKVEDRVTM TTDTSTNTAYMELRSLTADDTAVYYCARVHAALYYGMDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 503)
VH	QVQLQESGGVVQPGRSLRSLSCSASGFTFSRHGMHWVRQAPGKGLEWVAVISHDGSVKYYADSMKGRFSI SRDNSNNTLYLQMDSLRADDTAVYYCARGLSYQVSGWFDWPGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 504)
VH	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDTS SNSASLTISGLKTKDEADYYCQSYDGIITVIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 505)
VH	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTLPCSTRSSGSIASHYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNKRPSGVPDRFSGSIDSS SNSASLSISGLKTEDEADYYCQSYDSSNRWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 506)
VH	LPVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGLVNVSRIYIYWFQQKPGSRPQYLLNYKSDSNKQQASGVPSRFSG SKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWYSSAVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 507)
VL	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGNIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSS SNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNLWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 508)

VL	SSELTQDP AVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTA SLTITGAQA EDEADYYCNSRDSSGNHYVFGTGT KVTVL (SEQ ID NO: 509)
VL	LPVLTQAPS SVS VAPGKTARITCGGSDIGRKS VHWYQQKPGQAPALVIYSDRDRPSGISERFSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEADYYCQVWDNNSDHVYVFGAGTELIVL (SEQ ID NO: 510)
VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSNRPSGVS NRFSGSKSG NTASLTISGLQA EDEADYYC SSYTSSTLPFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 511)
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGNSLAWYQQKPGQAPRLLMYGASSRATGIPDRFSGSGAGTD FTLTISSLEPEDEFATYYCQQHTIPTFSFGPGTKVEVK (SEQ ID NO: 512)
VL	DIVMTQTPSFLSASIGDRVTITCRASQIGSYLAWYQQRPGEAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISNLQPEDFATYYCQQLNNYPITFGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 513)
VL	QSALTQPPSVSVSPGQTANIPCSGDKLGNKYAYWYQQKPGQSPVLLIYQDIKRPSRI PERFSGNSADTA TLTISGTQAMDEADYYCQ TWDNSVVF GGGTKLTVL (SEQ ID NO: 514)
VL	NFMLTQPHSVSESPGKT VTI SCTRSSGSIDS NYVQWYQQRPGSAPT TVIYEDNQ RPSGVPDRFSGSIDSS SNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNRHVIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 515)
VL	NFMLTQPHSVSESPGKT VTI SCTRSSGNI GTNYVQWYQQRPGSAPVALIYEDYRRPSGVPDRFSGSIDSS SNSASLIISGLKPEDEADYYCQSYHSSGWEF GGGTKLTVL (SEQ ID NO: 516)
VL	QSVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKGVHWYQQKPGQAPVLVYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 517)
VL	NFMLTQPHSVSESPGKT VTI SCTRSSGSIAS NYVQWYQQRPGSAPT TVIYEDNQ RPSGVPDRFSGSIDSS SNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSTTPSVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 518)
VL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWTSPHNGLTAFQA ILEGRVTM TTDTSTNTAYMELRNLTFDDTAVYFCAKVHPVFSYALDVWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 519)
VL	EVQLVQSGAEVMNPGSSVRVSCRSGGDFSTYAFSWVRQAPGQGLEWMGR IIPILGIANYAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARDGYSDPVLWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 520)
VL	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKVQGRVTM TTDTSTSTGYMELRSLRSDDTAVYYCARGDFRKPFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 521)
Грyнна Н	
VH	EVQLVQSGPELKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNP FNDGTYNEMFKGRATL TSDKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARQAWGYPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 522)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNP FNDGTYNEMFKGRATL TSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 523)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNP FNDGTYNEMFKGRATL TSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 524)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNP FNDGTYNEMFKGRATL TSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 525)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNP FNDGTYNEMFKGRATI TSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 526)
VL	DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRATESVEYGTSLVQWYQQKPGQP P KLLIYAASSVD SGVPSRFSGSG SGTDFTLTINSLEEEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 527)

VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPSRFSGSG SGTDFTLTINSLEAEDAAMYFCQQRVRYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 528)
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPSRFSGSG SGTDFTLTINSLEAEDAAMYFCQQRVRYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 529)
VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPSRFSGSG SGTDFTLTINSLEAEDAAMYFCQQRVRYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 530)
Грyнна I	
VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGTIYDSSGYSFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 531)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIINPSGGSTSYAQKFQGRVSM TRDTSTSTVYMESSLTSEDVAVYYCARDLFPFIYGNYYGMDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 532)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLAVPGAFDIWGQGLTMVTVSS (SEQ ID NO: 533)
VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRSLCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGQWLVTLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 534)
VH	EVQLVESGSEVEKPGSSVKVSCASGGTFSDSGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFATPYAQKFQDRVTI TAEDESTSTVYMESSLRSDDTAVFYCARDRGRHLPWYFDLWGRGLTVTVSS (SEQ ID NO: 535)
VH	EVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTI TAEDESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAPYYYYYMDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 536)
VH	EVQLLESVGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSRYALSWVRQAPGQGPVAVGAIIPFGTPHYSKKFQDRVII TVDTSTNTAFMELSSLRFEDTALYFCARGHDEYDISGYHRLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 537)
VH	QVQLVQSGSELKKPGSSVKVSCASGYSFSGYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDPNSGVTNYVRRFQGRVTM TRDTSLSTAYMELSGLTADDTAVYYCARDENLWQFGYLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 538)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSTRYGVHWVRQAPGQGLEWMGRLIPIVSMNTYAQKFQDRVSI TTDKSTGTAYMELRSLTSEDVAVYYCASVGGQLPWVFFAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 539)
VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRSLCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRTEEDTAVYYCARGWLDLDRIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 540)
VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRSLCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRTEEDTAVYYCARGWLDLDRIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 541)
VH	EVQLVQSGGGVLPVGGSLRSLCAASGFTFSDYGMHWVRQPPGKGLVAVISYDGSYKIHADSVQGRFTI SRDNAKNSVFLQMNLSLKTEDTAVYYCTDRKWLAWHGMDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 542)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTI TAEDESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDGIVADFQHWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 543)
VH	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCASGDTFSRYGITWVRQAPGRGLEWMGNIVPFFGATNYAQKFQGRRLTI TADKSSYTSYMDLSSLRSDDTAVYYCARDHFYGGGDFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 544)
VH	EVQLLESVGAEVKKPGASVKVSCASGYTFNSYDINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTANYAESFQGRVTM TADHSTSTAYMELNLSRSEDVAVYYCARDRWYHESRPMVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 545)

VH	EVQLVESGGGLVLRPGGSLRLACAASGFSFSDDYMTWIRQAPGRGLEWIAIYISDSGQTVHYADSVKGRFTI SRDNTKNSLFLQVNTLRAEDTAVYYCAREDLLGYYLQSWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 546)
VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSR ITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDEPRAVAGSQAYYYYGMDVWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 547)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI TRDTSTSTVHMELSSLRSEDTAVYYCARDLFPHIYGNYYGMDIWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 548)
VH	QMQLVQSGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEDTAVYYCARGWLDLRDIDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 549)
VH	QVQLVQSGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEDTAVYYCARGWLDLRDIDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 550)
VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGNSNIANNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNYRPSGIPDRFSGSKSGT SATLDITGLQTDGDEADYYCGVWDGSLTTGVFGGKTLTVL (SEQ ID NO: 551)
VL	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASSTLESQVPSRFRSGSGSGTD FTLTISLQPEDLATYCYQQLTFTPLTFGGGKTKVEIK (SEQ ID NO: 552)
VL	QPVLTPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGAYNFVSWYRQHPGKAPKLMIEVNRPSGVPDRFSGSKSG NTASLTVSGLQAEDEADYYCSSLYAGTNSLGI FGTGKTLTVL (SEQ ID NO: 553)
VL	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSDIGNHYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGIPDRFSGSKSGT SATLAITGLQTDGDEADYYCGTWDNSLSPHLLFGGKTLTVL (SEQ ID NO: 554)
VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNMGNVYVSWYQVPGTAPKLLIYENDKRPSGIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTDGDEADYYCGTWDNSLSGFVFASGKVTTL (SEQ ID NO: 555)
VL	QSALTQPASVSGSLGQSVTISCTGSSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPNLMIDVSKRPSGVSNRFRSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYYCSSLYTGISTVVFVGGGKTLTVL (SEQ ID NO: 556)
VL	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGVSNRFRSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSLYGGFNLLFGGKTLTVL (SEQ ID NO: 557)
VL	DIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQRI SAYVNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLRSGVPSRFRSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYCYQQTYSSPWTFGGKTKVEIK (SEQ ID NO: 558)
VL	QSVLTQPPSVASGSPGQSVTISCTGTSSDIGYDSVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKRPSGVSNRFRSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSLYSSSIFFYVFGTGTKVTTL (SEQ ID NO: 559)
VL	LPVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGYDVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKRPSGVSNRFRSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSLYSSSTHVFGTGTKTLTVL (SEQ ID NO: 560)
VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSNRPSGVSNRFRSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSLYRSSTLGPVFGGKTLTVL (SEQ ID NO: 561)
VL	QAGLTQPPSVSEAPRQRVTISCSGSSSNIGNAVNWYQQLPKAPKLLIYDDLPSGVSDRFRSGSKSGT SASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGTGTKTLTVL (SEQ ID NO: 562)
VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSKRPSGVPDRFRSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSLYSSSTHVFGTGTKVTTL (SEQ ID NO: 563)
VL	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNVYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGIPDRFRSGSKSGT SATLGITGLQTDGDEADYYCGTWDSSLSVWVFGGKTLTVL (SEQ ID NO: 564)

VL	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGRAPRLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEGDYCYSSYTSGGTLGPVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 565)
VL	QAGLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLQSEDEADYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 566)
VL	AIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISINYLWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 567)
VL	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYRQHPGKAPKLMYDVSYRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYCYSSYDSSSTRVVFVGTGKLTVL (SEQ ID NO: 568)
VL	QPVLTPPPSASGTPGQRVVAISCSGSRSNIEINSVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQGTGDEADYCGSWDSSLSADVFGTGTGKLTVL (SEQ ID NO: 569)
VL	QSVLTQPPSVSAAPGKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLQSEDEADYCATWDDSLNGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 570)
VL	QSVVTQPPSVSAGPQRVITISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNNRHSVGPDRFSGSKSG TSASLAITGLQAEDEAEFFCGTWD SRLTYVFGSGTKLTVL (SEQ ID NO: 571)
VL	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQGTGDEADYCGTWDSSLSAVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 572)
VL	VIWMTQSPSSLSASVGDRVTITCAASSLQSWYQQKPGKAPKLLIYEASTLESVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 573)
VL	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQVPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGNSDT SATLGITGLQGTGDEADYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 574)
VL	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQGTGDEADYCGTWDSSLSAGSVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 575)
VL	SYELMQPPSVSVAPGKTATIACGGENIGRKTVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNGNTA TLTISRVEAGDEADYCLVWDSSSDHRIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 576)
VL	SYELMQPPSVSVAPGKTATIACGGENIGRKTVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNGNTA TLTISRVEAGDEADYCVWDSSSDHRIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 577)
VL	SYELMQPPSVSVAPGKTATIACGGENIGRKTVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNGNTA TLTISRVEAGDEADYCVWDSSSDHRIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 578)
VL	SYELMQPPSVSVAPGKTATIACGGENIGRKTVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNGNTA TLTISRVEAGDEADYCVWDSSSDHRIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 579)
Група J*	
HC	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTL TTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFYWGQGTVTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPS NTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYV LPDSQSEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHENHHTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 580)

HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFNSNGMHVVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT TKTYTCNV DKP SNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKG FYPS DI AVEWES NGQ PENNYKTT PPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 581)
LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQOKPGQAPRLLIYLASYLES GV PARFSGSG SGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFY P PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO: 582)
LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLT ISSLEPEDFAVYYCQSSNWPRTFGQ TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFN RGEC (SEQ ID NO: 583)
Група K	
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF FDYWGQGLTVTVSSASTK (SEQ ID NO: 735)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF FDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 736)
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF FDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPS DI AVEWES NGQ PENNYKTT PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQ GNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 737)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLT ISSLQPEDFATYYCQOYLYHPATFGQ TKVEIKR (SEQ ID NO: 268)
LC	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLT ISSLQPEDFATYYCQOYLYHPATFGQ TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFN RGEC (SEQ ID NO: 738)
Група L	
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSR F WMSVVRQAPGKGLEWVANINQDGEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCANTYYDFWSGHFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 739)
VH	QEHLVESGGGVVQPGRSLRLSCEASGFTFNS F GMHVRQAPGKGLEWVAALWSDGNSKYYADSVKGRVTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGR G APIPIFGYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 740)

VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKRKTDGGTTDYAAPVKGRFTI TISRDDSKNTLHLQMNLSKTEDTAVYYCTTDDIVVVPVAVMREYFYGMDVWGQGT ^{TVTVSS} (SEQ ID NO: 741)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVQVSKASGYSTFGYYIHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGTKKYAHKFQGRVTM TRDTSIDTAYMILSSLSDDTAVYYCARDEDWNFGSWFDSWGQGT ^{LVTVSS} (SEQ ID NO: 742)
VH	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYIHVWRQAPGHGLEWMGWLNPNTGTTKYIQNFQGRVTM TRDTSSTAYMELTRLRSDDTAVYYCARDEDWNYGSWFDTWGQGT ^{LVTVSS} (SEQ ID NO: 743)
VH	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMTWVRQAPGRGLEWVSGIHWHGKRTGYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNLSKGEDTALYHCVRGGMSTGDWFD ^{WPWGQGT} LVI ^{VSS} (SEQ ID NO: 744)
VH	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMTWVRQVPGKGLEWVSGIHWSGRSTGYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCARGMSTGDWFD ^{WPWGQGT} LVT ^{VSS} (SEQ ID NO: 745)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVGSNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYADSVKGRFTI RLTSKNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCARGIRGLDVWGQGT ^{TVTVSS} (SEQ ID NO: 746)
VH	EERLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGITVGTNYMNWVRQAPGKGLEWVSVISSGGNTHYADSVKGRFIMS RQTSKNTLYLQMNLSLETEDTAVYYCARGIRGLDVWGQGT ^{MVTVSS} (SEQ ID NO: 747)
VH	QVQLVQSGAEVKMPGSSVRVSKASGGIFSSSTISWVRQAPGQGLEWMGEIIPVFGTVNYAQKQFQDRVIF TADESTTTAYMELSSLSKSGDTAVYFCARNWGLGSFYIWGQGT ^{MVTVSS} (SEQ ID NO: 748)
VH	EVQLVESGGDLVHPGRSLRLSCAASGFPFDEYAMHWVRQVPGKGLEWVSGISWSN ^{NNI} GYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNLSLRPEDTAFYYCAKSGIFDSWGQGT ^{LVTVSS} (SEQ ID NO: 749)
VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVTLISYEGRNKYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDRTLYGMDVWGQGT ^{TVTVSS} (SEQ ID NO: 750)
VH	QVTLRESGPALVKTQTTLTCTFSGFSLS ^{TNRMC} VTWIRQPPGKALEWLARIDWDGKYYNTSLKTRLT ISKDTSKNQVVLMTNMDPVD ^{TATFYCAR} STSLTFYFDYWGQGT ^{LVTVSS} (SEQ ID NO: 751)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTVGTNHMNWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGN ^{TFY} ADSVKGRFTI RHTSKNTLYLQMNLSLTAEDTAVYYCARGLGGMDVWGQGT ^{TVTVSS} (SEQ ID NO: 752)
VH	EVQLVESGGGLVQRGESLRLYCAASGFTFSKYWMN ^{WVRQ} APGKGLEWVANIKDGS ^{EKY} YVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDYWGSGYFDFWGQGT ^{LVTVSS} (SEQ ID NO: 753)
VH	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKDGS ^{EKY} YVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNLSLRADDTAVYYCARD ^{DDIVVVP} PAPMGYYYYYFYGMDVWGQGT ^{TVTVSS} (SEQ ID NO: 754)
VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDFAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWTGGNMDYANSVKGRFTI SPREDAKNSLYLQMNLSRAADTALYYCVDIRGIVATGGAFDIWGRGT ^{MVTVSS} (SEQ ID NO: 755)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVGTNYMNWVRQAPGKLEWISVIYSGGSTFYADSVKGRFTI RQTSQNTLYLQMNLSLRPEDTAVYYCARGIRGFDI ^{WGQGT} MVT ^{VSS} (SEQ ID NO: 756)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISTNYMNWVRQAPGKGLEWVAVIYSSGSTYI ^{DS} VKGRFTI RLTSKNTVYLQMNLSLNSED ^{TAVYYC} ARGIRGFDI ^{WGQGT} MVT ^{VSS} (SEQ ID NO: 757)
VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTIDDSAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKS ^{SGS} IGYADSVRGRFTI SRDNAKNSLYLQMNLSLRVEDTALYYCVDIRGNWNYGGNWFDPWGQGT ^{LVTVSS} (SEQ ID NO: 758)

VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTVGVNHMNWVRQAPGKGLEWVSVIFSSGRTFYGDYVKGRLTIF RQTSQNTVYLQMNLSRSEDTAIYYCARGIGGLDIWGRGTMVTVSS (SEQ ID NO: 759)
VH	EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFDYALHWVRQAPGKGLEWVSGISWTGGTIDYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMSLRTEDTAIYYCTRDIRGNWKYGGWFDPPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 760)
VH	QVQLVQSGTEVKKPGASVKVSKKASGYTFAYYMHWVRQAPGQGLDWMGWISPNISGFTNYAQKFQGRVTM TRDTSINTFYMELSLRSDDTAVYYCAREGSTHHSFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 761)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVGTNFMNHWVRQAPGKGLEWVSAIYSGGTANYADSVKGRFTIS RDTSRNTLYLQMNLSRTEDTAVYYCARGGGMDVWGQGTTVTVTVSS (SEQ ID NO: 762)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGGTFNTYVLSWVRQAPGQGLEWMGEIIPILGAANYAQNFGGRVTF TTDESTNTAYMDLSSLRSEDTAVYYCARDRTSGGFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 763)
VH	QVQLVQSGAEVEKPGASVKVSKKASGYIFTHYGISWVRQAPGQGLEWVGWISPYNGYTDYAQKLQGRVTL TTDTSTTTAYMELRNLRSDDTAMYCYCSRGRGPYWSFDLWGRGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 764)
VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSI SNWLAWYQOKPGKAPKLLIYKASSLESQVPSRFSGSGSGTE FTLTISLQPEDFATYYCQQYHSYSYTFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 765)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGI RNDLGWYQOKPGKAPKRLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTE FTLTISLQPEDFATYYCLOHNSYPLTFGGGTKVAIK (SEQ ID NO: 766)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQGI RNDLGWYQOKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTE FTLTISLQPEDFATYYCLOHNNYPYTFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 767)
VL	DIVMTQTPLSPPVTLGQPASISCRSSQTLVHGDGNTYLSWIQQRPQPRLLIYKVSNQFSGVDPDRFSGS GAGTDFTLKISRVEAEDVGLYFCMQATHFPITFGQGTREIK (SEQ ID NO: 768)
VL	DIVMTQTPLSPPVTLGQPASISCRSSPSLVHSDGNTYLSWLQQRPQPRLLIYKISNRFSGVDPDRFSGS GAGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQATHFPITFGQGTREIR (SEQ ID NO: 769)
VL	DIQMTQSPSSLSASLGDRTITCRASQSI NSYLNWYQOKPGKAPKLLIYVASSLQSGVPSRFSGSGSGTE FTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTREIK (SEQ ID NO: 770)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SSYLNWYQOKPGKAPKLLIYVASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTREIK (SEQ ID NO: 771)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTINIYLNWYQOKPGRAPRLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCHQSYSTPPITFGQGTREIK (SEQ ID NO: 772)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSMSSYLNWYQOKPGRAPKLLIFAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTREIK (SEQ ID NO: 773)
VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSFNFNYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTINRLEPEDFGVFYCCQYQYESAPWTFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 774)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SSYLNWYQOKPGKLLIYAASSLQSGVPSRFSGGSGTDFTL TISSLRPEDFATYYCQQSYCTPPITFGQGTREIK (SEQ ID NO: 775)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SSYLNWYQOKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTREIK (SEQ ID NO: 776)
VL	DRVTITCRASQVISNYLAWYQOKPGKVPRLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATY YCQKYNAPRTFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 777)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQININNYLNWYQOKPGKAPKLLIYAASSFQNAVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYNTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 778)

VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGI RNDLGWYQOKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTE FTLTISLQPEDFATYYCLOHNSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 779)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQOSYSTPPITFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 780)
Γρυνna M	
VH	QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLSSNGLTWVRQAPGEGLEWIGTINKDASAYYASWAKGRLTISK PSSTKVDLKITSPTEEDTATYFCGRIAFKGTSIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1108)
VL	AIVMTQTSPVSAAVGGTVTINCQASESVYSNNYLSWFQOKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFKSGSGG TQFTLTISGVQCDDAATYYCIGGKSSSTDGNAFGGGTEVVVR (SEQ ID NO: 1109)
Γρυνna N	
VH	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGNIVATITPLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1110)
VH	QPVLTPQPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIANNVSWYQQLPGTAPKLLIFANNKRPSGIPDRFSGSKSGT SAALDITGLQTDGADYYCGTWDSDLRAGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1111)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREGTIYDSSGYSFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1112)
VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEEDTAVYYCARGWLDLRDIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1113)
VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEEDTAVYYCARGWLDLRDIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1114)
VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEEDTAVYYCARGWLDLRDIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1115)
VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEEDTAVYYCARGWLDLRDIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1116)
VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEEDTAVYYCARGWLDLRDIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1117)
VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEEDTAVYYCARGWLDLRDIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1118)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSRYGVHWVRQAPGQGLEWMGRLIPIVSMTNYAQKFQDRVSI TTDKSTGTAYMELRSLTSED TALLYCASVGGQLPWVFFAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1119)
VH	QMQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEEDTAVYYCARGWLDLRDIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1120)
VH	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRTEEDTAVYYCARGWLDLRDIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1121)
VH	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAYSWVRQAPGQGLEWMGGIIPISFGTANYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGPIVATITPLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1122)
VH	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAYSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGPIVATITPLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1123)

VH	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAYSWVRQAPGQGLEWGGIIPSGFTANYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGPIVATITPLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1124)
VH	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWGGIIPAFGTANYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGPIVATITPLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1125)
VL	SYELMQPPSVSVAPGKTATIACGGENIGRKTVHWYQQKPGQAPVLIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHRIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1126)
VL	AIRMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYTTSSLKSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISRQLQPEDFATYYCQSYSSTWTFGRGTVKVEIK (SEQ ID NO: 1127)
VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGNSNIANNVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGIPDRFSGSKSGT SATLDTGLQGTGDEADYYCGVWDGSLTTGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1128)
VL	LPVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYDYSWYQQHPGKAPKLLIYDVKRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTHVFVGTGKTLTVL (SEQ ID NO: 1129)
VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLLIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYRSSTLGPVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1130)
VL	QAGLTQPPSVSEAPRQRTVITSCSGSSNIANNVSWYQQLPGKAPKLLIYDNLPSGVSDFRFSGSKSGT SASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGTGTGKTLTVL (SEQ ID NO: 1131)
VL	QSALTQPPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLLIYDVKRPSGVPDRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTHVFVGTGKTVTVL (SEQ ID NO: 1132)
VL	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIANNVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQGTGDEADYYCGTWDSLSVWVFGGGTQLTVL (SEQ ID NO: 1133)
VL	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGRAPRLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLGPVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1134)
VL	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIANNVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQGTGDEADYYCGTWDSLSAVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1135)
VL	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIANNVSWYQQVPGTAPKLLIYDNNRPSGIPDRFSGSNSDT SATLGITGLQGTGDEADYYCGTWDSLSAWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1136)
VL	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIANNVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQGTGDEADYYCGTWDSLSAGSVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1137)
VL	SYELMQPPSVSVAPGKTATIACGGENIGRKTVHWYQQKPGQAPVLIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEADYYCLVWDSSSDHRIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1138)
VL	SYELMQPPSVSVAPGKTATIACGGENIGRKTVHWYQQKPGQAPVLIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHRIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1139)
VL	SYELMQPPSVSVAPGKTATIACGGENIGRKTVHWYQQKPGQAPVLIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHRIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1140)
VL	SYELMQPPSVSVAPGKTATIACGGENIGRKTVHWYQQKPGQAPVLIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHRIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1141)
Группа O	
VH	QVQLVQSGSEVKKSGSSVKVSKCTSGGTFSTITNYAINWVRQAPGQGLEWGGILPIFGAAKYAQKFQDRV TITADESTNTAYLELSSLTSEDTAMYYCARGKRWLQSDLQYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1142)
VL	QPVLTPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGSYDLVSWYQQSPGKVPKLLIYEGVKRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGTRNFVFGGGTQLTVL (SEQ ID NO: 1143)

Следует отметить, что последовательности, приведенные для группы J, представляют аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи; последовательности, приведенные для группы K, включают аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи, варибельной

области легкой цепи, тяжелой цепи и легкой цепи; все другие последовательности, приведенные в табл.15, представляют последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает тяжелую цепь, которая содержит или получена из аминокислотной последовательности тяжелой цепи, показанной в патентах США № 7943743; 8779108; 8217149; 8460927; 7794710; 8741295 и 8981063; в публикациях заявок на патент США № 2014356353; 20130323249; 2014341917; 20130309250; 20110280877 и 20090317368 (в настоящее время выдана в виде патента США № 8981063, приведенного выше); и в публикациях международных заявок PCT WO 2014/100483; WO 2012/145493; WO 2014/100439; WO 2014/195852; WO 2014/100079; WO 2013/173223 и WO 2014/55897, содержание каждого источника включено в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает легкую цепь, которая содержит или получена из аминокислотной последовательности легкой цепи, показанной в патентах США № 7943743; 8779108; 8217149; 8460927; 7794710; 8741295 и 8981063; в публикациях заявок на патент США № 2014356353; 20130323249; 2014341917; 20130309250; 20110280877 и 20090317368 (в настоящее время выдана в виде патента США № 8981063, приведенного выше); и в публикациях международных заявок PCT WO 2014/100483; WO 2012/145493; WO 2014/100439; WO 2014/195852; WO 2014/100079; WO 2013/173223 и WO 2014/55897, содержание каждого источника включено в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает тяжелую цепь и легкую цепь, которые содержат или получены из аминокислотной последовательности тяжелой цепи и аминокислотной последовательности легкой цепи, показанной в патентах США № 7943743; 8779108; 8217149; 8460927; 7794710; 8741295 и 8981063; в публикациях заявок на патент США № 2014356353; 20130323249; 2014341917; 20130309250; 20110280877 и 20090317368 (в настоящее время выдана в виде патента США № 8981063, приведенного выше); в публикациях международных заявок PCT WO 2014/100483; WO 2012/145493; WO 2014/100439; WO 2014/195852 ; WO 2014/100079; WO 2013/173223 и WO 2014/55897, содержание каждого источника включено в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает анти-PDL1-антитело, которое содержит по меньшей мере одну последовательность CDR, выбранную из последовательностей CDR (VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3) из последовательностей CDR, приведенных в патенте США № 7943743. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает анти-PDL1-антитело, которое содержит по меньшей мере одну последовательность CDR, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять и/или шесть последовательностей CDR, выбранных из следующих последовательностей, приведенных в патенте США № 7943743: SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает анти-PDL1-антитело, которое содержит по меньшей мере одну последовательность CDR, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять и/или шесть последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает анти-PDL1-антитело, которое содержит по меньшей мере одну последовательность CDR, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять и/или шесть последовательностей CDR, выбранных из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает анти-PDL1-антитело, которое содержит по меньшей мере одну последовательность CDR, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять и/или шесть последовательностей CDR, выбранных из следующих последовательностей, приведенных в патенте США № 7943743: последовательности VH CDR1, содержащей SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23; последовательности VH CDR2, содержащей SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33; последовательности VH CDR3, содержащей SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43; последовательности VL CDR1, содержащей SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 53; последовательности VL CDR2, содержащей SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63; и последовательности VL CDR3, содержащей SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает анти-PDL1-антитело, которое связывается с полипептидом, который содержит или получен из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, приведенных в патенте США № 8460927.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает анти-PDL1-антитело, которое связывается с полипептидом PDL человека, который содержит или получен из SEQ ID NO: 1, приведенной в патенте США № 84 60927.

MRI FAVFI FMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEEDL
 KVQHSSYRQARLLKQDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRI LVVDPVT
 SEHELTCQAEGYPKAEVIWTS SDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTA
 ELVIPELPLAHPPNERHTLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ
 ID NO: 585)

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело включает анти-PDL1-антитело, которое связывается с полипептидом PDL1 мыши, который содержит или получен из SEQ ID NO: 3, приведенной в патенте США № 8460927.

MRI FAGI IFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVYWEKEDEQVIQFVAGEEDL
 KPQHSNFRGRASLPKQDQLKGNAAALQITDVKLQDAGVYCCII SYGGADYKRITLKVNPYRKINQRI SVDPATS
 EHELICQAEGYPEAEVIWTSNDHQVPSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAE
 LIIPELPATHPPQNRTHWVLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET (SEQ
 ID NO: 586)

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело включает анти-PDL1-антитело, которое связывается с полипептидом, который содержит или получен из SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38, приведенных в публикации международной заявки PCT WO 2014/10079.

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело включает анти-PDL1-антитело, которое связывается с полипептидом PDL1 человека, который содержит или получен из SEQ ID NO: 36, приведенной в публикации международной заявки PCT WO 2014/10079.

MRI FAVFI FMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEEDL
 KVQHSSYRQARLLKQDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRI LVVDPVT
 SEHELTCQAEGYPKAEVIWTS SDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTA
 ELVIPELPLAHPPNERHTLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID
 NO: 587)

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело включает анти-PDL1-антитело, которое связывается с полипептидом внеклеточного домена PDL1 человека, который содержит или получен из SEQ ID NO: 38, приведенной в публикации международной заявки PCT WO 2014/10079.

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEEDLKVQHSSYRQARLLKQDQL
 SLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRI LVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVI
 WTS SDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNER
 (SEQ ID NO: 588)

В некоторых вариантах осуществления активированное антитело включает анти-PDL1-антитело, которое представляет или получено из BMS-936559 (MDX-1105). В некоторых вариантах осуществления активированное антитело включает анти-PDL1-антитело, которое представляет или получено из MPDL3280A (RG7446). В некоторых вариантах осуществления активированное антитело включает анти-PDL1-антитело, которое представляет или получено из MEDI4736. В некоторых вариантах осуществления активированное антитело включает анти-PDL1-антитело, которое представляет или получено из AMP224. В некоторых вариантах осуществления активированное антитело включает анти-PDL1-антитело, которое представляет или получено из MSB0010718C.

В некоторых вариантах осуществления активированное анти-PDL1-антитело содержит или получено из антитела, которое синтезируется, секретируется или иным образом продуцируется гибридомой, например, такой как гибридома(ы), раскрытая в патенте США № 8779108 и депонированная в Национальных коллекциях промышленных и морских бактерий (NCIMB) под инвентарным номером 41598, а также гибридома(ы), раскрытая в патенте США № 8741295 и депонированная в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) под инвентарным номером I-4080, I-4081 и/или I-4122.

В некоторых вариантах осуществления активированное анти-PDL1-антитело включает последовательность CDR, показанную в табл.16, комбинацию последовательностей VL CDR (VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3), выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в одной строке в табл.16, комбинацию последовательностей VH CDR (VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3), выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в табл.16, или комбинацию последовательностей VL CDR и VH CDR (VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3), выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в табл. 16.

Таблица 16. Последовательности CDR для антител и активируемых антител,
которые связываются с PDL1

AB Название	VL			VH		
	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
C8	RASQSISSYLN (209)	KASRLQS (210)	RALKPVT (211)	SYAMS (212)	DITASGQRTTYADS (213)	SKAIFDY (214)
C12	RASQSISSYLN (209)	AASSLQS (215)	SYSTPNT (216)	SYAMS (212)	SINKDGHYTSYADS (217)	NLDEFDY (218)
C16	RASQSISSYLN (209)	SASQLQS (219)	ANSRPST (220)	SYAMS (212)	SIMATGAGTLYADS (221)	DGAGFDY (222)
C20	RASQSISSYLN (209)	NASSLQS (223)	YPYGP (224)	SYAMS (212)	TITSSGAATYADS (225)	NYTGFDY (226)

C60	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SIYSTGGATAYADS (229)	SSAGFDY (230)
C1	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIYSTGGATAYADS (231)	SSAGQSRP GFDY (232)
D1	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIYSTGGATAYADS (231)	SSAGQSWP GFDY (233)
G7	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIYSTGGATAYADS (231)	SSAGQSWP GFDY (234)
H9	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIYSTGGATAYADS (231)	WSAAFYD (235)
B10	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIYSTGGATAYADS (231)	WSAGYDY (236)
E10	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIYSTGGATAYADS (231)	WSKGFYD (237)
A05	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIWKQGIVTVYDS (238)	SSAGFDY (230)
C05	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIWRNGIVTVYDS (239)	SSAGFDY (230)
C10	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SIDIWKQGMVTVYDS (240)	SSAGFDY (230)
D08	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIWRQGLATAYDS (241)	SSAGFDY (230)
G09	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SEIVATGILTSYDS (242)	SSAGFDY (230)
G10	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIGRQGLITVYDS (243)	SSAGFDY (230)
G12	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIWYQGLVTVYDS (244)	SSAGFDY (230)
E11	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SIDIWKQGFATADS (245)	SSAGFDY (230)
D01	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIWKQGIVTVYDS (238)	SSAGFDY (230)
H06	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIWRQGLATAYDS (241)	SSAGFDY (230)
C5H9	RASQSISSYLN (209)	YASTLQS (227)	DNGYPST (228)	SYAMS (212)	SSIWRNGIVTVYADS (246)	WSAAFYD (235)

выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в группе М в табл.17.

В некоторых вариантах активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей CDR тяжелой цепи, выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в группе N в табл.17. В некоторых вариантах активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей CDR легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в группе N в табл.17. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей CDR тяжелой цепи, выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в группе N в табл.17, и комбинацию последовательностей CDR легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в группе N в табл.17.

В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей CDR тяжелой цепи, выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в группе O в табл.17. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей CDR легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в группе O в табл.17. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает комбинацию последовательностей CDR тяжелой цепи, выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в группе O в табл.17, и комбинацию последовательностей CDR легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из комбинаций, показанных в группе O в табл.17.

В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело включает последовательность CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, показанных в группе P в табл.17.

Таблица 17. Дополнительные последовательности CDR для антител и активируемых антител, которые связываются с PDL1

Группа А					
VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
RASQSVSSYLV (304)	DASNRAT (293)	QQRSNWPRT (278)	DYGF'S (296)	WITAYNGNTNYAQKLGQ (284)	DYFYGMDV (269)
RASQSVSSYLA (305)	AASSLQS (215)	QQRSNWPRT (279)	TYAIS (297)	GIIPIFGKAHYAQKFGQ (285)	KFHFVSGSPFG MDV (270)

RASQGISSWLA (306)	GASSRAT (294)	QQYNSYPYT (280)	SYDVH (298)	WLHADTGITKFSQKFQG (286)	ERIQLWFDY (271)
RASQSVSSSYLA (307)	DASSLES (295)	QQYGSSPWT (281)	TYAIN (299)	GIIPIFGTANHAQKFQG (287)	DQGIAAALFDY (272)
RASQGISSALA (308)	KASTLES (447)	QQYGSSP (282)	DYVWH (300)	GISGNSGNIGYADSVKG (288)	PFDY (273)
		QQFNSYPFT (283)	SYAIS (301)	GIIPIFGRAHYAQKFQG (289)	KYDYVSGSPFG MDV (274)
		QQSYSTPWT (448)	SYAIN (302)	GIIPIFGSANYAQKFQD (290)	DSSGWSRYYMD V (275)
			DYGMH (303)	GIIPLFGIAHYAQKFQG (291)	KYSYVSGSPFG MDV (276)
				GISWNRGRIEYADSVKG (292)	GRFRYFDWFLD Y (277)
					DYFWSGFSAFD I (446)

Група В

VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
SGDALPQKYVF (312)	EDSKRPS (313)	YSTDRSGNHRV (314)	TYSMN (309)	SISSSGDYIYYADSVK (310)	DLVTSMVAFDY (311)
RASQRVSSSYLA (318)	DASSRAT (319)	QQYGSLPWT (320)	RYWMS (315)	NIKQDGSEKYYVDSVKG (316)	EGGWFGELAFD Y (317)
RASQSVSSNYLA (324)	GTSSRAT (325)	QQYGSSIFT (326)	SYWMS (321)	NIKQDGGEQYYVDSVK (322)	DWNYGYDMDV (323)

Група С

VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)

RASQ (D/V) (V/I) (S/N) T (A/F) (V/L) A (327)	SAS (F/T) L (Y/A) S (328)	QQ (Y/G/F/S) (L/Y/F/W) (Y /N/A/T/G/F/ I) (H/V/P/T/ I) P (A/W/R/P /T) T (329)	GFTFS (D/G) SWIH (330)	AWI (S/L) PYGGS (T/S) YYADSVKG (331)	RHWPGGF DY (332)
RASQDVSTAVA (333)	SASFLYS (334)	QQYLYHPAT (335)	GFTFSDSWIH (336)	AWISPYGGSTYYADSVKG (337)	

Група D

VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
KSSQSL (H/N) (S/T) (R/S) TRKNYL A (584)	WASTRES (589)	(Q/K) QSYDVV T (590)	SYW (I/M) H (591)	YINPSS (D/G) Y (H/N) E Y (S/N) (E/Q) KF (I/M) D (592)	SGWL (I/ V) HGDYY FD (F/Y) (593)
KSSQSLNSRT RKNYLA (594)		QSYDVVT (595)	SYWMH (596)	YINPSSDYNEYSEKEMD (597)	SGWLVHG DYDFD (598)
KSSQSLHTST RKNYLA (599)		KQSYDVVT (600)	GYIFTSYWMH (601)	YINPSSGYHEYNQKFD (602)	SGWLIHG DYDFD (603)
			SYWIH (604)		
			GTTFTSYWIH (605)		

Група E

VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)

TGT(N/S) (T/R/S) DVG(A/G) YNYVS (606)	(E/D)V(I/N/D) (D/H/N) RPS (607)	SS(F/Y)T(N/S) (R/T/S) (G/S) (I/T) RV (608)	(K/R/T/Q/G/A/W/M/I/S) Y(V/R/K/L/M/I)M(H/T/N/Q/A/V/Y/W/F/M) (609)	SIYPSGG(F/I)TFYAD(S/T)VKG (610)	IKLGTVT TV(E/D) Y (611)
TGTSSDVGGYN YVS (612)	DVSNRPS (613)	SSYTSSSTRV (614)	SYIMM (615)	SIYPSGGITFYADTVKG (617)	IKLGTVT TVDY (618)

Группа F					
VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
			MYMMM (619)	SIYPSGGITFYADSVKG (620)	TGTSSDV GAYNYVS (621)

Группа G					
VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
(R/S/K) (A/S) S(R/N/D/Q/E/H/K/M/S) (SLLYSS или отсутствует) (N/D или отсутствует) (A/Q/E/L/K/M/P/S/T/Y/V) X(R/N/S/T) (A/R/N/C/Q/E/H/I/L/K/M/F/S/T/Y/V) (I/L/M/V) (A/R/N	X(A/C/G/S/T/V) (A/C/H/I/L/M/F/S/T/Y/V) (R/N/D/Q/E/K/S/T) (A/R/N/D/Q/E/G/H/K/M/F/P/S/T/Y) (A/N/S/T)	(R/N/Q/E/H) QX(A/R/N/C/Q/E/H/I/L/K/M/F/S/T/Y/V) (N/G/S) (A/R/N/D/C/Q/E/G/H/I/L/K/M/F/R/S/T/W/Y/V) P(A/R/N/D/Q/E/G/H/K/M/P/S/T/Y) T (624)	G(Y/F) (T/S) (I/L/M/F) (A/R/N/D/C/Q/E/H/I/L/K/M/P/S/T) (W/Y/V) (N/D/Q/E/K/P/S/T) (A/R/N/H/I/L/K/M/F/P/S/T/Y/V) (A/R/N/D/C/Q/E/G/H/I/L/K/M/	X(I/L/M/F/V) X(P or Absent) (A/R/N/Q/E/H/K/M/S/T/Y/V) (A/R/N/D/C/Q/E/G/H/K/M/F/P/S/T/Y/V) (N/G/S) (N/G/S) T(A/R/N/Q/E/H/K/M/S/T/Y) (A/R/N/C/Q/E/H/I/L/K/M/F/S/T/W/Y/V) N(A/R/N/D/Q/E/K/P/S/T) (A/R/N/D/C/Q/E/G/H/I/L/K/M/F/S/T/Y/V) (I/L/M/F) K(A/G/S	(A/R/N/Q/E/H/K/M/S/T/Y) (A/R/N/D/C/Q/E/G/H/K/M/F/P/S/T/Y/V) (Q/G/H/T/W) X XXX(F/Y) (AI или отсутствует) (627)

/Q/E/H/I/K/ M/F/S/T/Y) (622)			F/P/S/T/Y/ V) (A/R/C/Q /E/H/I/L/K /M/F/S/T/W /Y/V)N (625)		
RASSSVSYIY (628)	ATFNLAS (629)	HQRSSYPWT (630)	GYTFPDYMN (631)	DIDPNYGGTTYNQKFKG (632)	GAL (633)
SASSSIRYMH (634)	DTSKLTS (635)	QQDSSYPLT (636)	GYTFTSYDIN (637)	WIFPRDNNTKYNENFKG (638)	ENWVGDF (639)
KASQDVGTAVA (640)	WASTRHT (641)	QQYYGYPLT (642)	GYSITSDYWN (643)	YISYTGSTYYNPSLKS (644)	YGGWLSF (645)
KSSQSLLYSSN QKNSL (646)	WASTRES (589)		GYSIISDYWN (647)		RGGWLLP F (648)
			GFSLTTY SIN (649)	VMWAGGGTNSNSVLKS (650)	YYGNSPY YAI (651)

Група H

VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
TRSSGSIGSNY VQ (652)	EDNQRP (653)	QSYDSSTWV (654)	SYAIS (301)	WISPIGGSTNYAQK VQG (655)	GLXXXXXXXXXX XXXXXXXXDV (656)
TRSSGNIASNY VQ (657)	GKNNRPS (658)	QSYDSSNLWV (659)	SYGIS (660)	WISAYNGNTNYAQK LED (661)	ALPSGTILVGG WFDP (662)
QGDSLRSYYAS (663)	SDRDRPS (664)	NSRDSSGNHYV (665)	SYALS (666)	AISGGGGSTYYADS VKD (667)	DVFPETFMSNY GMDV (668)
GGSDIGRKS VH (669)	DVSNRPS (613)	QVWDNNSDHYV (670)	DYAMH (671)	LISGDGGSTYYADS VKD (672)	VLLPCSSTSCY GSVGAFDI (673)
TGTSSDVGGYN YVS (612)	GASSRAT (294)	SSYTSSTLP (674)	NYDMS (675)	RVNWNNGGSTTYADA VKD (676)	EFVGAYDL (677)
RASQSIGNSLA (678)	AASTLQS (679)	QQHTIPTFS (680)	GLYIH (681)	WIIPIFGTANYAQK FED (682)	GLRWGIWGWFD P (683)
RASQGIGSYLA (684)	QDIKRPS (685)	QQLNNYPIT (686)	DNAIS (687)	WIIPIFGKPNYAQK FED (688)	TMVRGFLGMD V (689)

SGDKLGNKYAY (690)	EDYRRPS (691)	QTWDNSVV (692)	SYAMS (212)	AISGSGGSTYYADS VKD (693)	DQFVTIFGVPR YGMDV (694)
TRSSGSIDSNY VQ (695)	DDSDRPS (696)	QSYDSNNRHVI (697)	TYALN (698)	RIVPLIGLVNYAHN FED (699)	GRQMFAGIDF (700)
TRSSGNIGTNY VQ (701)	EDNKRPS (702)	QSYHSSGWE (703)	SHGIT (704)	WISAHNGHASNAQK VED (705)	EVYGGNSDY (706)
GGNNIGSKGVH (707)	YKSDSNKQ QAS (708)	QVWDSSSDHWV (709)	RHGMH (710)	VISHDGSVKYYADS MKD (711)	VHAALYYGMDV (712)
TRSSGSIASNY VQ (713)		QSYDSTTPSV (714)		WTSPHNGLTAFQI LED (715)	GLSYQVSGWFD P (716)
TRSSGSIASHY VQ (717)		QSYDGITVI (718)		RIIPILGIANYAQK FED (719)	VHPVFSYALDV (720)
TLRSGLVGGSY RIY (721)		QSYDSSNRWV (722)	TYAFS (723)	WISAYNGNTNYAQK VED (724)	DGYGSDPVL (725)
		MIWYSSAVV (726)	NYGIS (727)		GDFRKPFDY (728)

Група I

VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
RATESVEYYGT SLVQ (729)	AASSVDS (730)	QQSRVPYPT (731)	SYVMH (732)	YVNPFDGTKYNEMFKG (733)	QAWGYP (734)

Група J

VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
RASQDVSTAVA (333)	SASFLYS (334)	QQYLYHPAT (335)	GFTFSDSWIH (336)	AWISPYGGSTYYADSVKG (337)	RHWPGGF DY (332)

Група K					
VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
QSIWN (781)	KAS (782)	QQYHSYSYT (783)	GFTFSRFW (784)	INQDGTETK (785)	ANTYYDFWGH FDY (786)
QGIRND (787)	TAS (788)	LQHNSYPLT (789)	GFTFSNFG (790)	LWSDGSNK (791)	ARGRGAPGPI FGY (792)
QGIRND (787)	AAS (793)	LQHNNYPYT (794)	GFTFSNAW (795)	IKRKTGGTT (796)	TTDDIVVPAV MREYYFGMDV (797)
QTLVHGDGNTY (798)	KVS (799)	MQATHFPIT (800)	GYSFTGY (801)	INPNSGTK (802)	ARDEDWFGSW FDS (803)
PSLVHSDGNTY (804)	KIS (805)	MQATHFPIT (800)	GYTFTGY (806)	LNPNTGTT (807)	ARDEDWNYGSW FDT (808)
QSINSY (809)	VAS (810)	QQSYSTPPIT (811)	GFTFDDYG (812)	IHWGKRT (813)	VRGGMSTGDF DP (814)
QSISSY (815)	VAS (810)	QQSYSTPPIT (811)	GFTFDDYG (812)	IHWGRST (816)	ARGGMSTGDF DP (817)
QTINIY (818)	AAS (793)	HQSYSTPPIT (819)	GFTVGSNY (820)	IYSGGST (821)	ARGIRGLDV (822)
QSMSSY (1011)	AAS (793)	QQSYSTPPIT (811)	GITVGTNY (1012)	ISSGGNT (1013)	ARGIRGLDV (822)
QSFNFY (823)	GAS (824)	QYESAPWT (825)	GGIFSSST (826)	IIPVFGTV (827)	ARNWGLGSFYI (828)
QSISSY (815)	AAS (793)	QQSYCTPPIT (829)	GFPFDEYA (830)	ISWSNNI (831)	AKSGIFDS (832)
QSISSY (815)	AAS (793)	QQSYSTPPIT (811)	GFTFSSYG (833)	ISYEGRNK (834)	AKDRTLYGMDV (835)
QVISNY (836)	AAS (793)	QKYNAPRT (837)	GFSLSTNRC (838)	IDWDGVK (839)	ARSTSLTFYF DY (840)
QNINNY (841)	AAS (793)	QQSYNTPLT (842)	EFTVGTNH (843)	IYSGGNT (844)	ARGLGGMDV (845)
QTISTY (846)	AAS (793)	LQHNSYPYT (847)	GFTFSKYW (848)	IKGDGSEK (849)	ARDYWGSGYF DF (850)

QSISSY (815)	VVS (851)	QOSYSTPFT (852)	GFTFSSYW (853)	IKQDGSEK (854)	ARDDIVVVPAP MGYYYYYFGMD V (855)
	AAS (793)	QOSYSTPPIT (811)	GFTFDDEFA (856)	ISWTGGNM (857)	VKDIRGIVATG GAFDI (858)
			GFTVGTNY (859)	IYSSGST (821)	ARGIRGFDI (860)
			GFTISTNY (861)	IYSSGST (862)	ARGIRGFDI (860)
			GFTIDDSA (863)	ISWKSGSI (864)	VKDIRGNWNYG GNWFDP (865)
			GFTVGVNH (866)	IFSSGRT (867)	ARGIGGLDI (868)
			GFTFDHYA (869)	ISWTGGTI (870)	TRDIRGNWKYG GWFPD (871)
			GYTFTAYY (872)	ISPNSGFT (873)	AREGSTHNSF DP (874)
			GFTVGTNF (875)	IIPILGAA (876)	ARGGGMDV (877)
			GGTFNTYV (878)	ISPYNGYT (879)	ARDRTSGGFDP (880)
			GYIFTHYG (881)		SRGRGPYWSFD L (882)

Група L

VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
QASESVYSNNY LS (1014)	LASTLAS (1015)	IGGKSSSTDG NA (1016)	SNGLT (1017)	TINKDASAYYASWAK G (1018)	IAFKTGTSTI (1019)

Група M

VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)

RSSKSLHSNG ITYLY (1020)	QMSNLAS (1021)	AQNLEPPLT (1022)	DYYTH (1023)	WIDPENGKTAYAPKF QG (1024)	GGYDVYFLDY (1025)
-------------------------------	-------------------	---------------------	-----------------	------------------------------	----------------------

Группа N					
VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
KASQDVGI VVA (1026)	WASIRHT (1027)	QQYSNYPLYT (1028)	GFSLTSYGVH (1029)	VIWAGGSTNYNSALM S (1030)	AKPYGNSAMDY (1031)
				VIWAGGSTNYVDSVK G (1032)	AKPYGTSAMDY (1033)
				VIWAGGSTNYADSVK G (1034)	

Группа O					
VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
ASQSVSTSSSS FMH (1035)	YASNLES (1036)	QHSWEIPYT (1037)	SYGMS (1038)	SISSGGSTYYPDSVK G (1039)	GYDSGFAY (1040)
RASQSVSTSSS SYMH (1041)	YASNLES (1036)	QHSWEIPYT (1037)	SYGMS (1038)	SISSGGTTYYPDSVK G (1042)	GYDSGFAY (1040)
KASQSVSNDVA (1043)	YAANRYT (1044)	QQDYTSPYT (1045)	TYGVH (1046)	VIWRGVTTDYNAAFM AS (1047)	LGFYAMDY (1048)
KASQSVSNDVG (1049)	YASNRYS (1050)	QQDYTSPYT (1045)	SYGVH (1051)	VIWSSGVTDYNAAFI S (1052)	LGFYAMDY (1048)
RSSQIIVHSNA NTYLE (1053)	KVSNRFS (1054)	FQGSHPYT (1055)	TYWMH (1056)	QINPDSTTINTAPSL KD (1057)	PGDYGYDFDC (1058)
SASSSVSSSYL Y (1059)	NTSNLAS (1060)	HQWRSYPPT (1061)	SGYWN (1062)	YISYSGSTYYNPSLK S (1063)	SLLWFSTGFAY (1064)
SANSSVSYMH (1065)	DTSKLAS (1066)	QQWSSNPWT (1067)	SYGVH (1051)	YIWSGGITDYNAAFK S (1068)	LGFYAMDY (1048)
RASQSVSTSSY SYMH (1069)	YASNLES (1036)	QNSWEIPYT (1070)	STGMS (1071)	SISSGGTTYLGSVQ G (1072)	GYDAGFAY (1073)

039736

KSSQSLLYSSN QKNSLA (1074)	WASNRES (1075)	QQYYSYPLT (1076)	SGYWT (1077)	YIYTGSTYYNPSLKS (1078)	QRDWLGFAY (1079)
RASQSVSTSSY SYVH (1080)	YASNLES (1036)	QHSWEIPYT (1037)	SYGMS (1038)	SISSGGSIYYPDSVK G (1081)	GYDAGFAF (1082)

Група P					
VL			VH		
CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
			GFTFSMYMM (1083)		
			GFTFSAYAMA (1084)		
			GFTFSAYRME (1085)		
			GFTFSAYLMV (1086)		
			GFTFSAYVMF (1087)		
			GFTFSAYVMS (1088)		
			GFTFSGYLMV (1089)		
			GFTFSGYQML (1090)		
			GFTFSGYSMF (1091)		
			GFTFSGYWMA (1092)		
			GFTFSQYLMY (1093)		
			GFTFSQYVMF (1094)		
			GFTFSQYYMY (1095)		
			GFTFSSYLMS (1096)		

			GFTFSSYLMT (1097)		
			GFTFSSYQMV (1098)		
			GFTFSSYSMA (1099)		
			GFTFSSYVMF (1100)		
			GFTFSSYVMS (1101)		
			GFTFSSYVMY (1102)		
			GFTFSSYYMF (1103)		
			GFTFSSYYMV (1104)		
			GFTFSYYSMV (1105)		
			GFTFSWYDMA (1106)		
			GFTFSWYQMS (1107)		

АВ в активируемых антителах по настоящему изобретению специфически связывается с мишенью PDL1, например, такой как PDL1 млекопитающего и/или PDL1 человека. Также в изобретение включены АВ, которые связываются с тем же эпитопом PDL1, что и антитело по изобретению и/или активированное активируемое антитело, описанное здесь. Также в изобретение включены АВ, которые конкурируют с анти-PDL1-антителом и/или активированным активируемым анти-PDL1-антителом, описанными здесь, за связывание с мишенью PDL1, например, PDL1 человека. Также в изобретение включены АВ, которые перекрестно конкурируют с анти-PDL1-антителом и/или активированным активируемым анти-PDL1-антителом, описанными здесь, за связывание с мишенью PDL1, например, PDL1 человека.

Активируемые анти-PDL1-антитела, обеспеченные здесь, включают маскирующий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент представляет аминокислотную последовательность, которая связана или иным образом присоединена к анти-PDL1-антителу, и расположен внутри активируемого анти-PDL1-антитела таким образом, что маскирующий фрагмент снижает способность анти-PDL1-антитела специфически связываться с PDL1. Подходящие маскирующие фрагменты идентифицируют с использованием любого из ряда известных методов. Например, пептидные маскирующие фрагменты идентифицируют с использованием способов, описанных в публикации международной заявки РСТ WO 2009/025846, Daugherty et al., содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей ее полноте.

Активируемые анти-PDL1-антитела, обеспеченные здесь, включают расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент включает аминокислотную последовательность, которая является субстратом для протеазы, обычно внеклеточной протеазы. Подходящие субстраты идентифицируют с использованием любого из ряда известных методов. Например, пептидные субстраты идентифицируют, используя способы, описанные в патенте США № 76666817, Daugherty et al.; в патенте США № 8563269, Stagliano et al.; и в публикации международной заявки РСТ WO 2014/026136, La Porte et al., содержание каждого источника включено в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте (см. также Boulware et al. "Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics", *Biotechnol Bioeng.* 106.3 (2010): 339-46).

Типичные субстраты включают, не ограничиваясь этим, субстраты, расщепляемые одним или несколькими из следующих ферментов или протеаз, приведенных в табл.12.

Таблица 12. Примерные протеазы и/или ферменты

ADAMS, AD	AMTS,	Цистеиновые протеазы,	Сериновые
ADAM8		Крузипаин	активированный белок С
ADAM9		Легумаин	Катепсин А
ADAM 10		Отубаин-2	Катепсин G
ADAM 12			Химаза
ADAM 15		KLKs, например,	протеазы факторов
ADAM 17/T ACE		KLK4	например, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
ADAMDEC1		KLK5	
AD AMTS 1		KLK6	Эластаза
ADAMTS4		KLK7	Гранзим В
ADAMTS 5		KLK8	Гуанидинобензоатаза
		KLK10	HtrA1
Аспартатпротеазы,		KLK11	Нейтрофильная эластаза
BACE		KLK13	Лактоферрин
Ренин		KLK14	Марапсин
			NS 3/4 А
Аспарагиновые катепсины, например: Катепсин D		Металлопротеиназы, например, Меприн	РАСЕ4 Плазмин
Катепсин E		Неприлизин	PSA
		PSMA	tPA
Каспазы, например:		BMP-1	Тромбин
Каспаза 1			Триптаза
Каспаза 2		MMPs, например,	uPA
Каспаза 3		MMP1	
Каспаза 4		MMP2	Трансмембранные сериновые протеазы (TTSPs), например, типа II
Каспаза 5		MMP3	
Каспаза 6		MMP7	DESC1
Каспаза 7		MMP8	DPP-4
Каспаза 8		MMP9	FAP
Каспаза 9		MMP10	Гепсин
Каспаза 10		MMP11	Матриптаза-2
Каспаза 14		MMP12	MT-SP1 /Матриптаза
		MMP13	TMPRSS2
Цистеиновые катепсины,		MMP14	TMPRSS3
Катепсин В		MMP15	TMPRSS4
Катепсин С		MMP16	
Катепсин К		MMP17	
Катепсин L		MMP19	
Катепсин S		MMP20	
Катепсин V/L2		MMP23	
Катепсин X/Z/P		MMP24	
		MMP26	
		MMP27	

Активируемые анти-PDL1-антитела, описанные здесь, преодолевают ограничения для терапевтических средств на основе антител, в частности терапевтических средств на основе антител, о которых известно, что по меньшей мере в некоторой степени они токсичны *in vivo*. Опосредованная мишенью токсичность представляет основное ограничение для разработки таких терапевтических антител. Активируемые анти-PDL1-антитела, обеспеченные здесь, сконструированы с целью устранения токсичности, связанной с ингибированием мишени в нормальных тканях традиционными терапевтическими антителами. Данные активируемые анти-PDL1-антитела остаются маскированными до тех пор, пока они протеолитически не активируются в очаге заболевания. Изначально начав с анти-PDL1-антитела в качестве родительского терапевтического антитела, были сконструированы активируемые анти-PDL1-антитела по

изобретению путем связывания антитела с ингибирующей "маской" через линкер, который включает субстрат для протеазы.

Когда АВ модифицировано ММ и находится в присутствии мишени, то специфическое связывание АВ с его мишенью уменьшается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием АВ, немодифицированным ММ, или специфическим связыванием родительского АВ с мишенью.

Значение K_d АВ, модифицированного ММ, с мишенью по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 раз или более выше или в 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-1000000 или 1000000-10000000 раз выше, чем K_d АВ, немодифицированного ММ, или родительского АВ с мишенью. Напротив, аффинность связывания АВ, модифицированного ММ, с мишенью по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000 раз или более выше или в 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 100000-1000000 или 1000000-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания с мишенью АВ, немодифицированного ММ, или родительского АВ.

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ с АВ обычно выше, чем K_d АВ с мишенью. K_d ММ с АВ по меньшей мере может быть в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 100000, 1000000 или даже в 10000000 раз выше, чем K_d АВ с мишенью. С другой стороны, аффинность связывания ММ с АВ обычно ниже, чем аффинность связывания АВ с мишенью. Аффинность связывания ММ с АВ может быть по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 100000, 1000000 или даже 10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ с АВ примерно равна K_d АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ с АВ не выше, чем константа диссоциации АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ с АВ ниже константы диссоциации АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ с АВ выше константы диссоциации АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет значение K_d для связывания с АВ, которое не выше чем значение K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет значение K_d для связывания с АВ, которое не ниже значения K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет значение K_d для связывания с АВ, которое примерно равно значению K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет значение K_d для связывания с АВ, которое ниже значения K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет значение K_d для связывания с АВ, которое выше значения K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет K_d для связывания с АВ, которая не более чем в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 раз выше, чем K_d для связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет K_d для связывания с АВ, которая в 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1000, 20-100, 20-1000 или 100-1000 раз выше, чем K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность связывания с АВ, которая ниже аффинности связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность связывания с АВ, которая не выше аффинности связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность связывания с АВ, которая примерно равна аффинности связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность связывания с АВ, которая не ниже аффинности связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность связывания с АВ, которая выше аффинности связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность связывания с АВ, которая в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 ниже, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность связывания с АВ, которая в 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1000, 20-100, 20-1000 или 100-1000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность связывания с АВ, которая в 2-20 раз ниже, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ, нековалентно связанный с АВ и в эквимольной концентрации с АВ, не ингибирует связывание АВ с мишенью.

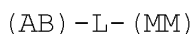
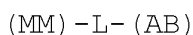
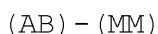
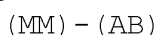
Когда АВ модифицировано ММ и находится в условиях специфического связывания АВ с его ми-

шенью, то оно снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием с мишенью АВ, немодифицированного ММ, или специфическим связыванием родительского АВ. По сравнению со связыванием АВ, немодифицированного ММ, или связыванием родительского АВ, с мишенью, способность АВ связываться с мишенью при модификации ММ может быть снижена по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и даже 100% по меньшей мере в течение 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 ч, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 или 12 месяцев или более, что определено в анализе *in vivo* или *in vitro*.

ММ ингибирует связывание АВ мишенью. ММ связан с антигенсвязывающим участком АВ и ингибирует связывание АВ с мишенью. ММ может стерически ингибировать связывание АВ с мишенью. ММ может аллостерически ингибировать связывание АВ с его мишенью. В этих вариантах осуществления, когда АВ модифицировано или связано с ММ и в присутствии мишени, то связывание отсутствует, или по существу никакого связывания АВ с мишенью не происходит, или имеет место не более чем 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 50% связывания АВ с мишенью, по сравнению со связыванием с мишенью АВ, немодифицированного ММ, родительского АВ или АВ, не связанного с ММ по меньшей мере в течение 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 ч, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 12 месяцев или более, что определено в анализе *in vivo* или *in vitro*.

Когда АВ связано или модифицировано ММ, то ММ "маскирует" или уменьшает или иным образом ингибирует специфическое связывание АВ с мишенью. Когда АВ связано или модифицировано ММ, то такая связь или модификация могут приводить к структурному изменению, которое уменьшает или ингибирует способность АВ специфически связываться со своей мишенью.

АВ, связанное или модифицированное ММ, может быть представлено следующими формулами (в порядке от аминоконцевой (N) области к карбоксиконцевой (C) области):



где ММ представляет маскирующий фрагмент, АВ представляет собой антитело или фрагмент этого антитела и L является линкером. Во многих вариантах осуществления может быть желательно вставить в композицию один или несколько линкеров, например, гибких линкеров, для обеспечения гибкости.

В некоторых вариантах осуществления ММ не является природным партнером по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не имеет или по существу не имеет гомологии с каким-либо природным партнером по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% гомологичен любому природному партнеру по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% идентичен любому природному партнеру по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 25% идентичен любому природному партнеру по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 50% идентичен любому природному партнеру по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 20% любому природному партнеру по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 10% любому природному партнеру по связыванию с АВ.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела включают АВ, которое модифицировано ММ, и также включают один или несколько расщепляемых фрагментов (СМ). Такие активируемые антитела проявляют активируемое/переключаемое связывание с мишенью АВ. Активируемые антитела обычно включают антитело или фрагмент антитела (АВ), модифицированные или связанные с маскирующим фрагментом (ММ), и модифицируемый или расщепляемый фрагмент (СМ). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, которая служит в качестве субстрата по меньшей мере для одной протеазы.

Элементы активируемых антител расставлены таким образом, что ММ и СМ расположены так, что в расщепленном (или относительно активном) состоянии и в присутствии мишени, АВ связывается с мишенью, в то время, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном (или относительно неактивном) состоянии в присутствии мишени, то специфическое связывание АВ с его мишенью уменьшается или ингибируется. Специфическое связывание АВ с его мишенью может быть уменьшено за счет ингибирования или маскирования способности АВ специфически связываться его мишенью под действием ММ.

Значение K_d АВ, модифицированного ММ и СМ, с мишенью, по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 раз или более выше, или в 5-10, 10-100, 10-1000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000 или 100000-10000000 раз выше, чем K_d АВ,

немодифицированного ММ и СМ, или родительского АВ, с мишенью. Напротив, аффинность связывания АВ, модифицированного ММ и СМ, с мишенью по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 раз или более выше или в 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 1000-1000000, 1000-000, 10000-100000 раз ниже, чем аффинность связывания с мишенью АВ, немодифицированного ММ и СМ, или родительского АВ.

Когда АВ модифицировано ММ и СМ и находится в присутствии мишени, но не в присутствии модифицирующего агента (например, по меньшей мере, одной протеазы), то специфическое связывание АВ с его мишенью уменьшается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием с мишенью АВ, немодифицированного ММ и СМ, или родительского АВ. По сравнению со связыванием родительского АВ или связыванием АВ, немодифицированного ММ и СМ, с его мишенью, способность АВ связываться с мишенью при модификации ММ и СМ может быть уменьшена по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и даже 100% по меньшей мере в течение 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 ч, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 суток, или 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или более, что определено в анализе *in vivo* или *in vitro*.

Как здесь используется, термин "расщепленное состояние" относится к состоянию активируемых антител после модификации СМ по меньшей мере одной протеазой. Как здесь используется, термин "нерасщепленное" состояние относится к состоянию активируемых антител в отсутствие расщепления СМ протеазой. Как обсуждалось выше, термин "активируемые антитела" используется здесь для обозначения активируемого антитела как в его нерасщепленном (нативном) состоянии, так и в его расщепленном состоянии. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что в некоторых вариантах осуществления в расщепленном активируемом антителе может отсутствовать ММ в результате расщепления СМ протеазой, что приводит к высвобождению, по меньшей мере, ММ (например, когда ММ не связан с активируемым антителом ковалентной связью (например, дисульфидной связью между остатками цистеина).

Под термином "активируемое или переключаемое" связывание подразумевается, что активируемое антитело имеет первый уровень связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в ингибированном, маскированном или нерасщепленном состоянии (т.е. первая конформация), и второй уровень связывания с мишенью в неингибированном, немаскированном или расщепленном состоянии (т.е. вторая конформация), где второй уровень связывания с мишенью выше, чем первый уровень связывания. В общем, доступ мишени к АВ активируемого антитела больше в присутствии расщепляющего агента, способного расщеплять СМ, т.е. протеазы, чем в отсутствие такого расщепляющего агента. Таким образом, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, то АВ ингибируется в отношении связывания с мишенью и может маскироваться для связывания с мишенью (т.е. первая конформация такова, что АВ не может связываться с мишенью), и в расщепленном состоянии АВ не ингибируется или не маскируется для связывания с мишенью.

СМ и АВ активируемых антител выбраны таким образом, что АВ представляет связывающий участок для данной мишени, и СМ представляет субстрат для протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза локализуется совместно с мишенью в очаге, предназначенном для лечения или диагностики, у субъекта. Как здесь используется, совместная локализация относится к ситуации, когда они находятся в одном и том же месте или относительно близко рядом. В некоторых вариантах осуществления протеаза расщепляет СМ, с образованием активированного антитела, которое связывается с мишенью, расположенной рядом с сайтом расщепления. Активируемые антитела, описанные здесь, находят свое конкретное применение, когда, например, протеаза, способная расщеплять сайт в СМ, т.е. протеаза, присутствует на относительно более высоких уровнях или в непосредственной близости от мишень-содержащей ткани очага, предназначенного для лечения или диагностики, чем в тканях участков, не подлежащих лечению (например, в здоровой ткани). В некоторых вариантах осуществления СМ по изобретению также расщепляется одной или более разными протеазами. В некоторых вариантах осуществления это одна или более разных протеаз, которые локализируются совместно с мишенью и которые ответственны за расщепление СМ *in vivo*.

В некоторых вариантах активируемые антитела обеспечивают пониженную токсичность и/или пониженное проявление неблагоприятных побочных эффектов, которые в противном случае могли бы быть результатом связывания АВ с участками, не подлежащими лечению, если бы АВ не были маскированы или иным образом ингибированы для связывания с мишенью.

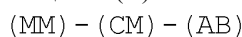
В общем, активируемое антитело может быть сконструировано путем выбора интересующего АВ и конструирования остальной части активируемого антитела таким образом, что когда они конформационно ограничены, то ММ обеспечивает маскирование АВ или снижение связывания АВ с его мишенью. Для обеспечения такой функциональной характеристики могут быть приняты во внимание критерии структурного дизайна.

Обеспечиваются активируемые антитела, обладающие переключаемым фенотипом в желаемом динамическом диапазоне для связывания мишени в ингибированной по сравнению с неингибированной конформацией. Динамический диапазон обычно относится к отношению (а) максимального детектированного уровня параметра при первом ряде условий к (б) минимальному детектированному значению

этого параметра при втором ряде условий. Например, в контексте активируемого антитела динамический диапазон относится к отношению (а) максимального детектированного уровня связывания белка-мишени с активируемым антителом в присутствии по меньшей мере одной протеазы, способной расщеплять СМ активируемого антитела, к (b) минимальному детектированному уровню связывания белка-мишени с активируемым антителом в отсутствие протеазы. Динамический диапазон активируемого антитела можно рассчитать как отношение константы диссоциации при обработке активируемого антитела расщепляющим агентом (например, ферментом) к константе диссоциации при обработке активируемых антител расщепляющим агентом. Чем больше динамический диапазон активируемого антитела, тем лучше переключаемый фенотип активируемого антитела. Активируемые антитела, имеющие относительно более высокие значения динамического диапазона (например, выше 1), демонстрируют более желательные переключающие фенотипы так, что связывание белка-мишени активируемыми антителами происходит в большей степени (например, имеет место преимущественно) в присутствии расщепляющего агента (например, фермента), способного расщеплять СМ активируемых антител, чем в отсутствие расщепляющего агента.

Активируемые антитела могут быть обеспечены в различных структурных конфигурациях. Примерные формулы активируемых антител приведены ниже. В частности, предусматривается, что порядок расположения АВ, ММ и СМ от N-конца к С-концу внутри активируемого антитела может быть изменен на обратное расположение. Также, в частности, предусматривается, что СМ и ММ могут перекрываться по аминокислотной последовательности, например так, чтобы СМ находился внутри ММ.

Например, активируемые антитела могут быть представлены следующими формулами (в порядке от аминоконцевой (N) области к карбоксиконцевой (C) области):

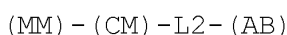
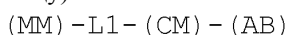


где ММ представляет маскирующий фрагмент, СМ представляет собой расщепляемый фрагмент, и АВ представляет антитело или его фрагмент. Следует отметить, что, хотя ММ и СМ обозначены как отдельные компоненты в приведенных выше формулах, во всех примерных вариантах осуществления (включая формулы), раскрытых здесь, предполагается, что аминокислотные последовательности ММ и СМ могут перекрываться, например, за счет того, что СМ полностью или частично входит в состав в ММ. Кроме того, приведенные выше формулы обеспечивают дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть расположены как N-концевые или C-концевые к элементам активируемых антител.

В некоторых вариантах осуществления ММ не является природным партнером по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не имеет или по существу не имеет гомологии с каким-либо природным партнером по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% аналогичен любому природному партнеру по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% идентичен любому природному партнеру по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 50% идентичен любому природному партнеру по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 25% идентичен любому природному партнеру по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 20% идентичен любому природному партнеру по связыванию с АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 10% идентичен любому природному партнеру по связыванию с АВ.

Во многих вариантах осуществления может быть желательным вставить один или несколько линкеров, например, гибких линкеров, в конструкцию активируемого антитела, чтобы обеспечить гибкость в одном или более из соединений ММ-СМ, соединений СМ-АВ или в обоих соединениях. Например, АВ, ММ и/или СМ могут не содержать достаточного количества остатков (например, Gly, Ser, Asp, Asn, особенно Gly и Ser, особенно Gly), чтобы обеспечить требуемую гибкость. В таком случае переключаемый фенотип конструкций таких активируемых антител может приобрести преимущество от введения одной или более аминокислот для обеспечения гибкого линкера. Кроме того, как описано ниже, где активируемое антитело обеспечивается как конформационно ограниченная конструкция, то гибкий линкер может быть вставлен функционально для облегчения образования и поддержания циклической структуры в нерасщепленном активируемом антителе.

Например, в некоторых вариантах осуществления активируемое антитело имеет одну из следующих формул (где приведенные ниже формулы представляют аминокислотную последовательность в направлении от N- к С-концу или от С- к N-концу):



где ММ, СМ и АВ имеют значения, определенные выше; где L1 и L2 каждый независимо и необязательно

зательно присутствует или отсутствует, будучи одинаковыми или различными гибкими линкерами, которые включают по меньшей мере 1 гибкую аминокислоту (например, Gly). Кроме того, приведенные выше формулы обеспечивают дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут располагаться как N-концевые или C-концевые по отношению к элементам активируемых антител. Примеры включают, не ограничиваясь этим, нацеливающие фрагменты (например, лиганд для рецептора клетки, находящейся в ткани-мишени) и фрагменты, увеличивающие периоды полураспада в сыворотке крови (например, полипептиды, которые связывают белки сыворотки, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточный альбумин (например, сывороточный альбумин человека (HAS))).

СМ специфически расщепляется по меньшей мере одной протеазой со скоростью примерно $0,001-1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или по меньшей мере 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250 или $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления СМ специфически расщепляется со скоростью примерно $100000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления СМ специфически расщепляется со скоростью примерно от 1×10^2 до примерно 1×10^6 (т.е. примерно от 1×10^2 до примерно $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Для специфического расщепления ферментом обеспечивают контакт между ферментом и СМ. Когда активируемое антитело, содержащее АВ, связанное с ММ и СМ, находится в присутствии мишени и при наличии достаточной активности фермента, то СМ может быть расщеплен. Достаточная активность ферментов может относиться к способности фермента контактировать с СМ и обеспечивать расщепление. Можно легко предположить, что фермент может находиться вблизи СМ, но будет не способен расщеплять его за счет других клеточных факторов или модификации белка фермента.

Линкеры, подходящие для применения в композициях, описанных здесь, как правило, представляют собой линкеры, которые обеспечивают гибкость модифицированного АВ или активируемых антител для облегчения ингибирования связывания АВ с мишенью. Такие линкеры обычно называются гибкими линкерами. Подходящие линкеры можно легко подобрать, и они могут иметь любую из подходящих различных длин, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот кислоты, включая от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот, и их длина может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

Типичные гибкие линкеры включают глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 191) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 192), где n представляет собой целое число, по меньшей мере один), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Полимеры на основе глицина и глицина-серина являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут служить нейтральным соединением между компонентами. Глицин получает значительно больше фи-пси пространства, чем даже аланин, и значительно менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem., 11173-142 (1992)). Примеры гибких линкеров включают, не ограничиваясь этим, Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 193), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 194), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 195), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 196), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 197), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 198) и тому подобное. Специалист с обычной квалификацией в данной области понимает, что конструкция активируемых антител может включать линкеры, которые все или частично являются гибкими, так что линкер может включать гибкий линкер, а также один или более участков, которые придадут менее гибкую структуру, для обеспечения требуемой структуры активируемых антител.

Настоящее изобретение также обеспечивает композиции и способы, которые включают активируемое анти-PDL1-антитело, которое включает антитело или фрагмент антитела (АВ), которые специфически связываются с PDL1, где АВ связано с маскирующим фрагментом (ММ), который уменьшает способность АВ связываться с его мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое анти-PDL1-антитело также включает расщепляемый фрагмент (СМ), который является субстратом для протеазы. Композиции и способы, обеспеченные здесь, позволяют присоединить один или более агентов к одному или нескольким остаткам цистеина в АВ, не оказывая отрицательного влияния на активность (например, маскирующую, активирующую или связывающую активность) активируемого анти-PDL1-антитела. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, обеспеченные здесь, позволяют присоединить один или более агентов к одному или нескольким остаткам цистеина в АВ, без восстановления или иного разрушения одной или нескольких дисульфидных связей в ММ. Композиции и способы, обеспеченные здесь, дают возможность получить активируемое анти-PDL1-антитело, которое конъюгировано с одним или несколькими агентами, например, с любым из различных терапевтических, диагностических и/или профилактических агентов, например, в некоторых вариантах осуществления, без какого-либо агента(ов), который конъюгирован с ММ активируемого анти-PDL1-антитела. Композиции и способы, обеспеченные здесь, дают возможность получить конъюгированные активируемые анти-PDL1-антитела, в которых ММ сохраняет способность эффективно и оптимально маскировать АВ активируе-

мого антитела в нерасщепленном состоянии. Композиции и способы, обеспеченные здесь, дают возможность получить конъюгированные активируемые анти-PDL1-антитела, где активируемое антитело по-прежнему активируется, т.е. расщепляется в присутствии протеазы, которая может расщеплять СМ.

Активируемые анти-PDL1-антитела имеют по меньшей мере одну точку конъюгации для агента, но в способах и композициях, обеспеченных здесь, почти все возможные точки конъюгации, доступны для конъюгации с агентом. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы, участвующие в образовании дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы, участвующие в образовании межцепочечных дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы, участвующие в образовании внутривещечных дисульфидных связей, но не атомы серы, участвующие в образовании внутривещечных дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют атомы серы цистеина или другие аминокислотные остатки, содержащие атом серы. Такие остатки могут встречаться в природе в структуре антитела или могут быть включены в антитело сайтнонаправленным мутагенезом, химическим превращением или ошибочным включением неприродных аминокислот.

Также обеспечиваются способы получения конъюгата активируемого анти-PDL1-антитела, содержащего одну или несколько межцепочечных дисульфидных связей в АВ и одну или несколько внутривещечных дисульфидных связей в ММ, и лекарственное средство, реагирующее со свободными тиолами. Способ обычно включает частичное восстановление межцепочечных дисульфидных связей в активируемом антителе с использованием восстанавливающего агента, например, такого как ТСЕР; и конъюгацию лекарственного средства, реагирующего со свободными тиолами, с частично восстановленным активируемым антителом. Как здесь используется, термин "частичное восстановление" относится к ситуациям, когда активируемое анти-PDL1-антитело контактирует с восстанавливающим агентом и восстанавливается меньше, чем по всем дисульфидным связям, например, меньше, чем по всем возможным сайтам конъюгации. В некоторых вариантах осуществления восстановлению подвергается менее 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или менее 5% всех возможных сайтов конъюгации.

В еще одних вариантах осуществления обеспечивается способ восстановления и конъюгации агента, например лекарственного средства, с активируемым анти-PDL1-антителом, приводящий к избирательности при размещении агента. Способ обычно включает частичное восстановление активируемого анти-PDL1-антитела восстанавливающим агентом таким образом, чтобы любые сайты конъюгации в маскирующем фрагменте или другом фрагменте, отличном от АВ, активируемого антитела не восстанавливались, и конъюгировали агент с межцепочечными тиолами в АВ. Сайт(ы) конъюгации выбраны таким образом, чтобы обеспечить желаемое размещение агента для того, чтобы конъюгация имела место в желаемом сайте. Восстанавливающим агентом является, например, ТСЕР. Условия реакции восстановления, например, такие как отношение восстанавливающего агента к активируемому антителу, продолжительность инкубации, температура во время инкубации, рН восстанавливающего реакционного раствора и т.д., определяются идентификацией условий, при которых получают конъюгированное активируемое антитело, в котором ММ сохраняет способность эффективно и оптимально маскировать АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии. Отношение восстанавливающего агента к активируемому анти-PDL1-антителу будет варьироваться в зависимости от активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления отношение восстанавливающего агента к активируемому анти-PDL1-антителу будет находиться в диапазоне от примерно 20:1 до 1:1, примерно от 10:1 до 1:1, примерно от 9:1 до 1:1, примерно от 8:1 до 1:1, примерно от 7:1 до 1:1, примерно от 6:1 до 1:1, примерно от 5:1 до 1:1, примерно от 4:1 до 1:1, примерно от 3:1 до 1:1, примерно от 2:1 до 1:1, примерно от 20:1 до 1:1,5, примерно от 10:1 до 1:1,5, примерно от 9:1 до 1:1,5, примерно от 8:1 до 1:1,5, примерно от 7:1 до 1:1,5, примерно от 6:1 до 1:1,5, примерно от 5:1 до 1:1,5, примерно от 4:1 до 1:1,5, примерно от 3:1 до 1:1,5, примерно от 2:1 до 1:1,5, примерно от 1,5:1 до 1:1,5 или примерно от 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне примерно от 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне примерно от 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне примерно от 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне примерно от 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне примерно от 8:1 до примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне примерно от 2,5:1 до 1:1.

В некоторых вариантах осуществления обеспечивается способ восстановления межцепочечных дисульфидных связей в АВ активируемого анти-PDL1-антитела и конъюгации агента, например тиолсодержащего агента, такого как лекарственное средство, с полученными межцепочечными тиолами для селективного определения расположения агента(ов) в АВ. Способ обычно включает частичное восстановление АВ восстанавливающим агентом с образованием по меньшей мере двух межцепочечных тиолов без образования всех возможных межцепочечных тиолов в активируемом антителе; и конъюгацию агента с межцепочечными тиолами частично восстановленного АВ. Например, АВ активируемого анти-

тела частично восстанавливают в течение примерно 1 ч при температуре примерно 37°C при желательном отношении восстанавливающего агента:активируемое антитело. В некоторых вариантах осуществления отношение восстанавливающего агента к активируемому антителу будет находиться в диапазоне примерно от 20:1 до 1:1, примерно от 10:1 до 1:1, примерно от 9:1 до 1:1, примерно от 8:1 до 1:1, примерно от 7:1 до 1:1, примерно от 6:1 до 1:1, примерно от 5:1 до 1:1, примерно от 4:1 до 1:1, примерно от 3:1 до 1:1, примерно от 2:1 до 1:1, примерно от 20:1 до 1:1,5, примерно от 10:1 до 1:1,5, примерно от 9:1 до 1:1,5, примерно от 8:1 до 1:1,5, примерно от 7:1 до 1:1,5, примерно от 6:1 до 1:1,5, примерно от 5:1 до 1:1,5, примерно от 4:1 до 1:1,5, примерно от 3:1 до 1:1,5, примерно от 2:1 до 1:1,5, примерно от 1,5:1 до 1:1,5 или примерно от 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне примерно от 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне примерно от 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне примерно от 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится в диапазоне примерно от 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне примерно от 8:1 до примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение находится в диапазоне примерно от 2,5:1 до 1:1.

Тиолсодержащим реагентом может быть, например, цистеин или N-ацетилцистеин. Восстанавливающим агентом может быть, например, ТСЕР. В некоторых вариантах осуществления восстановленное активируемое антитело может быть очищено до конъюгации, используя, например, колоночную хроматографию, диализ или диафильтрацию. Альтернативно восстановленное антитело не подвергается очистке после частичного восстановления и до конъюгации.

Изобретение также относится к частично восстановленным активируемым анти-PDL1-антителам, в которых по меньшей мере одна межцепочечная дисульфидная связь в активируемом антителе была восстановлена восстанавливающим агентом без разрушения каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей в активируемом антителе, где активируемое антитело включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которые специфически связываются с PDL1, маскирующий фрагмент (ММ), который ингибирует связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью PDL1, и расщепляемый фрагмент (СМ), соединенный с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы. В некоторых вариантах осуществления ММ соединен с АВ через СМ. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько внутрицепочечных дисульфидных связей активируемого антитела не разрушаются под действием восстанавливающего агента. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько внутрицепочечных дисульфидных связей (ММ) в активируемом антителе не разрушаются под действием восстанавливающего агента. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающим агентом является ТСЕР.

Настоящее изобретение также обеспечивает частично восстановленные активируемые антитела, в которых по меньшей мере одна межцепочечная дисульфидная связь в активируемом антителе была восстановлена восстанавливающим агентом без разрушения каких-либо внутрицепочечных дисульфидных связей в активируемом антителе, где активируемое антитело включает антитело или антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которые специфически связываются с мишенью, например, PDL1, маскирующий фрагмент (ММ), который ингибирует связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, где СМ представляет полипептид, который функционирует в качестве субстрата по меньшей мере для одной протеазы. В некоторых вариантах осуществления ММ соединен с АВ через СМ. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько внутрицепочечных дисульфидных связей активируемого антитела не разрушаются под действием восстанавливающего агента. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько внутрицепочечных дисульфидных связей (ММ) в активируемом антителе не разрушаются под действием восстанавливающего агента. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающим агентом является ТСЕР.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела, описанные здесь, также включают агент, конъюгированный с активируемым антителом. В некоторых вариантах осуществления конъюгированный агент представляет терапевтический агент, такой как противовоспалительный и/или противоопухолевый препарат. В таких вариантах осуществления агент конъюгирован с углеводным фрагментом активируемого антитела, например, в некоторых вариантах осуществления, где углеводный фрагмент расположен вне антигенсвязывающего участка антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с сульфгидрильной группой антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе.

В некоторых вариантах осуществления агент представляет цитотоксическое средство, такое как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагмент) или радиоактивный изотоп (то есть радиоконоъюгат).

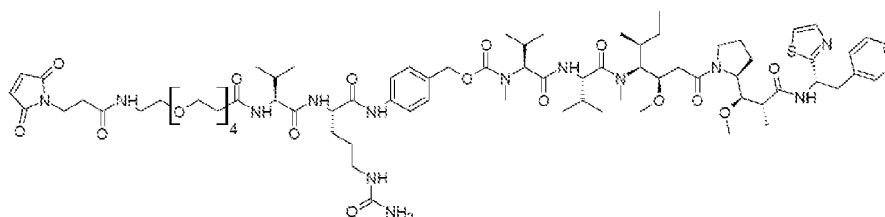
В некоторых вариантах осуществления агент представляет детектируемую группу, например, такую

как метка или другой маркер. Например, агент представляет или включает меченную радиоактивным изотопом аминокислоту, одну или несколько биотинильных групп, которые могут детектироваться с помощью меченного авидина (например, стрептавидин, содержащий флуоресцентную метку или имеющий ферментативную активность, которые могут детектироваться оптическими или калориметрическими методами), один или несколько радиоизотопов или радионуклидов, одну или несколько флуоресцентных меток, одну или несколько ферментативных меток и/или один или несколько хемилюминесцентных агентов. В некоторых вариантах осуществления детектируемые группы присоединяются посредством спейсерных молекул.

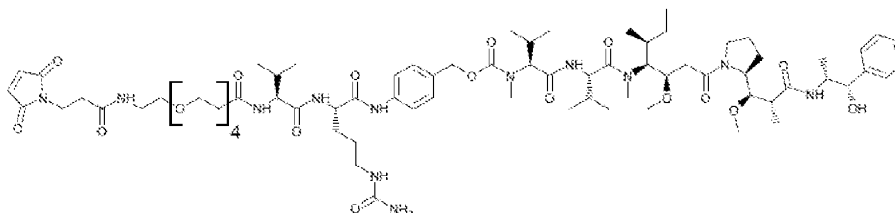
Изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат). Подходящие цитотоксические агенты включают, например, доластатин и их производные (например, ауристин E, AFP, MMAF, MMAE, MMAD, DMAF, DMAE). Например, агент представляет монометилауристин E (MMAE) или монометилауристин D (MMAD). В некоторых вариантах осуществления агент представляет агент, выбранный из группы, представленной в табл.11. В некоторых вариантах осуществления агент представляет доластатин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет ауристин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет ауристин E или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет монометилауристин E (MMAE). В некоторых вариантах осуществления агент представляет монометилауристин D (MMAD). В некоторых вариантах осуществления агент представляет майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления агент представляет DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления агент представляет дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет димер пирролобензодиазепина.

В некоторых вариантах осуществления агент связывается с АВ с использованием малеимидного линкера капроил-валин-цитруллин или малеимидного линкера ПЭГ-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления агент связывается с АВ с использованием малеимидного линкера капроил-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления агент связывается с АВ с использованием малеимидного линкера ПЭГ-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристин D (MMAD), связанный с АВ, с использованием малеимидного линкера ПЭГ-валин-цитруллин-аминобензилоксикарбонил, и данная линкерная конструкция с полезной нагрузкой относится здесь к "vc-MMAD". В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой монометилауристин E (MMAE), связанный с АВ, с использованием малеимидного линкера ПЭГ-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил, и данная линкерная конструкция с полезной нагрузкой относится здесь к "vc-MMAE". Структуры vc-MMAD и vc-MMAE показаны ниже:

vc-MMAD



vc-MMAE



Изобретение также обеспечивает конъюгированные активируемые антитела, которые включают активируемое антитело, связанное с полезной нагрузкой монометилауристином D (MMAD), где активируемое антитело включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которые специфически связываются с мишенью, маскирующий (MM), который ингибирует связывание AB активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, и CM представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата по меньшей мере для одной MMP протеазы.

В некоторых вариантах осуществления MMAD-конъюгированное активируемое антитело может

быть конъюгировано с использованием любого из нескольких способов присоединения агентов к АВ: (а) присоединение к углеводным фрагментам АВ, или (b) присоединение к сульфгидрильным группам АВ, или (с) присоединение к аминогруппам АВ или (d) присоединение к карбоксилатным группам АВ.

В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка MMAD конъюгирована с АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка MMAD конъюгирована с цистеином в АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка MMAD конъюгирована с лизином в АВ через линкер. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка MMAD конъюгирована с другим остатком АВ через линкер, такой как те остатки, которые описаны здесь. В некоторых вариантах осуществления линкер является тиолсодержащим линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер является нерасщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из группы, состоящей из линкеров, представленных в табл.13 и 14. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и полезная нагрузка MMAD связаны посредством малеимидного линкера капроил-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и полезная нагрузка MMAD связаны с помощью малеимидного линкера ПЭГ-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и полезная нагрузка MMAD связаны посредством малеимидного линкера капроил-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и полезная нагрузка MMAD связаны через малеимидный линкер ПЭГ-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка MMAD конъюгирована с АВ с использованием технологии частичного восстановления и конъюгации, раскрытой здесь.

В некоторых вариантах осуществления компонент полиэтиленгликоля (ПЭГ) линкера по настоящему изобретению получен из 2 мономеров этиленгликоля, 3 мономеров этиленгликоля, 4 мономеров этиленгликоля, 5 мономеров этиленгликоля, 6 мономеров этиленгликоля, 7 этиленгликолевые мономеры 8 мономеров этиленгликоля, 9 мономеров этиленгликоля или по меньшей мере 10 мономеров этиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ-компонент представляет собой разветвленный полимер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ПЭГ-компонент представляет собой неразветвленный полимер. В некоторых вариантах осуществления полимерный ПЭГ-компонент функционализирован аминогруппой или ее производным, карбоксильной группой или ее производным, или аминогруппой или ее производным, и карбоксильной группой или ее производным.

В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-компонент линкера по настоящему изобретению представляет аминотетра-этиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-компонент линкера по настоящему изобретению представляет аминотриэтиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-компонент линкера по настоящему изобретению представляет собой amino-диэтиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления aminoпроизводное представляет собой образование амидной связи между аминогруппой и карбоксильной группой, с которой она конъюгирована. В некоторых вариантах осуществления карбоксильное производное представляет собой образование амидной связи между карбоксильной группой и аминогруппой, с которой она конъюгирована. В некоторых вариантах осуществления карбоксильное производное представляет собой образование сложноэфирной связи между карбоксильной группой и гидроксильной группой, с которой она конъюгирована.

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут быть использованы, включают цепь А дифтерийного токсина, не связывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (*Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из китайской горькой тыквы (*Momordica charantia*), курцин, кротин, ингибитор из мыльнянки лекарственной (*Saponaia officinalis*), гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотечены. Имеется много доступных радионуклидов для получения радиоconъюгированных антител. Примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают с использованием разнообразных бифункциональных связывающих агентов для белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-соединения активного фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин можно получить, как описано в Vitetta et al., (1987) Science, 238:1098. Иллюстративным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклида с антителом является меченная по углероду-14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) (см. международную заявку WO 94/11026).

В табл.11 приведены некоторые из примерных фармацевтических агентов, которые могут быть ис-

пользованы в описанном здесь раскрытии, но никоим образом они не являются исчерпывающим списком.

Таблица 11. Примерные фармацевтические агенты для конъюгации

<p><u>Цитотоксические агенты</u> Ауристатины Ауристин Е Монометилауристин D (MMAD) Монометилауристин Е (MMAE) Десметилауристин Е (DMAE) Ауристин F Монометилауристин F (MMAF) Десметилауристин F (DMAF) Производные ауристатина, например, его амиды Ауристин тирамин</p>	<p>Турбостатин Фенстатины Гидроксибенфенстатин Спонгистатин 5 Спонгистатин 7 Галистатин 1 Галистатин 2 Галистатин 3 Модифицированные бриостатины Галокомстатины</p>
<p>Ауристин хинолин Доластатины Производные доластатина Доластатин 16 DmJ Доластатин 16 Dpv Майтанзиноиды, например, DM-1; DM-4 Производные майтанзиноида Дуокармицин Производные дуокармицина Альфа-аманитин Антрациклины Доксорубин Даунорубин Бриостатины Камптотедин Производные камптотецина 7-замещенный камптотедин 10,11-дифторметилендиоксикамптотедин Комбретастатины Дебромонаплизин Кагалаид-Ф Дискотермолит Эктейнацидин <u>Противовирусные препараты</u> Ацикловир Вира А Симметрел <u>Противогрибковые препараты</u> Нистатин <u>Дополнительные противоопухолевые препараты</u> Адриамин Церубидин Блеомицин Алкеран Велбан Онковин Фторурацил Метотрексат Тиотепан Бизантрин Новантрон Тиогуанин Прокарбазин Цитарабин <u>Антибактериальные препараты</u> Аминогликозиды Стрептомицин Неомин Канамицин Амикацин Гентамицин</p>	<p>Пирролобензимидазолы (PBI) Цибростатин 6 Доксалиформ Аналоги антрациклина Аналог цемадотина (CemCH2-SH) Вариант токсина А Pseudomonas (PE38) Вариант токсина А Pseudomonas (ZZ-PE38) ZJ-101 OSW-1 4-нитробензилоксикарбонильные производные Об-бензилгуанина Ингибиторы топоизомеразы Гемистерлин Цефалотаксин Гомогаррингтонин Димеры пирролобензодиазепина (PBD) Пирролобензодиазепены Функционизированные пирролобензодиазепены Димеры функционизированных пирролобензодиазепенов Калихеамицины Подофилотоксины Таксаны Алкалоиды барвинка <u>Конъюгированные реагенты для детектирования</u> Флуоресцеин и его производные Флуоресцеин изотиоцианат (FITC) <u>Радиофармацевтические препараты</u> ¹²⁵I ¹³¹I ⁸⁹Zr ¹¹¹In ¹²³I ¹³¹I ^{90m}Tc ²⁰¹Tl ¹³³Xe ¹¹C ⁶²Cu ¹⁸F ⁶⁸Ga ¹³N ¹⁵O ³⁸K ⁸²Rb ^{99m}Tc (технеций)</p>

Тобрамицин	Тяжелые металлы
Стрептомицин В	Барий
Спектиномицин	Золото
Ампициллин	Платина
Сульфаниламид	Антимикоплазменные препараты
Полимиксин	Тилозин
Хлорамфеникол	Спектиномицин

Специалисты в данной области техники понимают, что большое количество возможных молекул может быть связано с полученными антителами по изобретению (см., например, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York (1989), содержание данного источника в полном объеме включено здесь посредством ссылки).

Связывание может быть выполнено любой химической реакцией, которая будет связывать две молекулы, при условии, что антитело и другая молекула сохраняют свою соответствующую активность. Данное связывание может включать множество химических механизмов, например ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. В некоторых вариантах осуществления предпочтительным связыванием, однако, является ковалентное связывание. Ковалентное связывание может быть достигнуто прямой конденсацией имеющихся боковых цепей или введением внешних мостиковых молекул. Многие двухвалентные или поливалентные связывающие агенты пригодны для связывания белковых молекул, таких как антитела по настоящему изобретению, с другими молекулами. Например, типичные связывающие агенты могут включать органические соединения, такие как тиоэфиры, карбодиимиды, сложные эфиры сукцинимиды, диизоцианаты, глутаровый альдегид, диазбензолы и гексаметилендиамины. Данный перечень не предназначен для того, чтобы быть исчерпывающим для различных классов связывающих агентов, известных в данной области, и скорее является примером чаще всего используемых связывающих агентов (см. Killen and Lindstrom, Jour. Immun., 133: 1335-2549 (1984), Jansen et al., Immunological Reviews, 62: 185-216 (1982) и Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987)).

В некоторых вариантах осуществления в дополнение к композициям и способам, обеспеченным здесь, конъюгированное активируемое антитело также может быть модифицировано для сайт-специфической конъюгации посредством модифицированных аминокислотных последовательностей, вставленных или иным образом включенных в последовательность активируемого антитела. Такие модифицированные аминокислотные последовательности конструируют для обеспечения контролируемого размещения и/или дозирования конъюгированного агента в конъюгированном активируемом антителе. Например, активируемое антитело может быть сконструировано таким образом, чтобы включать цистеиновые замены в положениях легких и тяжелых цепей, которые обеспечивают реакционноспособные тиольные группы и не влияют отрицательно на фолдинг и сборку белка, а также не изменяют связывание антигена. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело может быть сконструировано для включения или введения иным образом одного или нескольких остатков неприродных аминокислот в активируемое антитело для обеспечения подходящих сайтов для конъюгации. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело может быть сконструировано для включения или введения иным образом ферментативно активируемых пептидных последовательностей в последовательность активируемого антитела.

Соответствующие линкеры описаны в литературе (см., например, публикацию Ramakrishnan S. et al., Cancer Res., 44: 201-208 (1984), в которой описано использование MBS (m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидного эфира). См. также патент США № 5030719, в котором описано использование галогенированного производного ацетилгидразида, связанного с антителом посредством олигопептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления подходящие линкеры включают: (i) EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид, (ii) SMPT (4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-придилдитио)толуол (Pierce Chem. Co., Cat (21558G), (iii) SPDP (сукцинимидил-6-[3-(2-придилдитио)пропионамидо]гексаноат (Pierce Chem. Co., Cat # 21651G); (iv) сульфо-LC-SPDP (сульфо-сукцинимидил 6-[альфа-метил-альфа-(2-придилдитио)толуамидо]гексаноат (Pierce Chem. Co., # 2165-G) и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид: Pierce Chem Co., № 24510), конъюгированный с EDC. Дополнительные линкеры включают, не ограничиваясь этим, SMCC, сульфо-SMCC, SPDB или сульфо-SPDB.

Линкеры, описанные выше, содержат компоненты, которые имеют различные характеристики, что приводит к получению конъюгатов с различными физико-химическими свойствами. Например, сульфо-NHS-сложные эфиры алкилкарбоксилатов более стабильны, чем сульфо-NHS-сложные эфиры ароматических карбоксилатов. NHS-сложные эфиры, содержащие линкеры, менее растворимы, чем сульфо-NHS-сложные эфиры. Кроме того, линкер SMPT содержит стерически затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с повышенной стабильностью. Дисульфидные связи, как правило, менее стабильны, чем другие связи, поскольку дисульфидная связь расщепляется *in vitro*, что приводит к меньшему выходу конъюгата. Сульфо-NHS, в частности, может повысить стабильность карбодиимидных соединений. Карбодиимидные соединения (такие как EDC) при использовании в сочетании с сульфо-NHS образуют сложные эфиры, которые более устойчивы к гидролизу, чем одна реакция сочетания кар-

бодимидов.

В некоторых вариантах осуществления линкеры являются расщепляемыми. В некоторых вариантах осуществления линкеры являются нерасщепляемыми. В некоторых вариантах осуществления присутствуют два или более линкера. Два или более линкера являются одинаковыми, то есть расщепляемыми или нерасщепляемыми, или два или более линкеров отличаются друг от друга, то есть по меньшей мере один является расщепляемым и по меньшей мере один нерасщепляемым.

В настоящем изобретении используется несколько способов присоединения агентов к АВ: (а) присоединение к углеводным фрагментам АВ, или (b) присоединение к сульфгидрильным группам АВ, или (в) присоединение к аминогруппам АВ, или (d) присоединение к карбоксилатным группам АВ. Согласно настоящему изобретению АВ могут быть ковалентно присоединены к агенту через промежуточный линкер, содержащий по меньшей мере две реакционноспособные группы, одна из которых реагирует с АВ и одна реагирует с агентом. Линкер, который может включать любое совместимое органическое соединение, может быть выбран таким образом, чтобы реакция с АВ (или агентом) не оказывала отрицательного влияния на реакционную способность и избирательность АВ. Кроме того, присоединение линкера к агенту должно не нарушать активность агента. Подходящие линкеры для реакции с окисленными антигенами или фрагментами окисленного антигена включают линкеры, которые содержат амин, выбранный из группы, состоящей из групп первичного амина, вторичного амина, гидразина, гидразида, гидроксилamina, фенилгидразина, семикарбазида и тиосемикарбазида. Такие реакционноспособные функциональные группы могут существовать как часть структуры линкера или могут быть введены подходящей химической модификацией линкеров, которые не содержат такие группы.

Согласно настоящему изобретению подходящие линкеры для присоединения к восстановленным АВ включают линкеры, которые имеют определенные реакционноспособные группы, способные взаимодействовать с сульфгидрильной группой восстановленного антигена или его фрагмента. Такие реакционноспособные группы включают, не ограничиваясь этим: реакционноспособные галогеналкильные группы (включая, например, галогенацетильные группы), п-меркурбензоатные группы и группы, способные к реакциям присоединения по Михаэлю (включая, например, малеимиды и группы типа, описанного Mitra and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc., 101: 3097-3110).

Согласно настоящему изобретению подходящие линкеры для присоединения к АВ, которые не являются ни окисленными, ни восстановленными, включают линкеры, которые имеют определенные функциональные группы, способные взаимодействовать с первичными аминогруппами, присутствующими в немодифицированных лизиновых остатках в АВ. Такие реакционноспособные группы включают, не ограничиваясь этим, NHS-эфиры карбоновых кислот или карбоновые эфиры, сульфо-NHS-эфиры карбоновых кислот или карбоновые эфиры, эфиры 4-нитрофенилкарбоновой кислоты или карбоновые эфиры, эфиры пентафторфенилкарбоновой кислоты или карбоновые эфиры, ацилимидазолы, изоцианаты и изотиоцианаты.

Согласно настоящему изобретению подходящие линкеры для присоединения к АВ, которые не являются ни окисленными, ни восстановленными, включают линкеры, которые имеют определенные функциональные группы, способные взаимодействовать с карбоксильными группами, присутствующими в остатках аспартата или глутамата в АВ, которые были активированы подходящими реагентами. Подходящие активирующие реагенты включают EDC, с добавлением или без добавления NHS или сульфо-NHS и других дегидратирующих агентов, используемых для образования карбоксиамида. В этих случаях функциональные группы, присутствующие в подходящих линкерах, включают первичные и вторичные амины, гидразины, гидроксиламины и гидразида.

Агент может быть присоединен к линкеру до или после присоединения линкера к АВ. В некоторых применениях может быть желательным вначале получить промежуточное соединение АВ-линкер, в котором линкером не содержит связанного агента. В зависимости от конкретного применения затем конкретный агент может быть ковалентно присоединен к линкеру. В некоторых вариантах осуществления АВ сначала присоединяют к MM, CM и связанным линкерам и затем присоединяют к линкеру в целях конъюгации.

Разветвленные линкеры.

В конкретных вариантах осуществления используются разветвленные линкеры, которые имеют многочисленные сайты для присоединения агентов. Для линкеров с многочисленными сайтами единственное ковалентное присоединение к АВ приведет к получению промежуточного соединения АВ-линкер, способного связывать агент в нескольких сайтах. Сайты могут представлять альдегидные или сульфгидрильные группы или любой химический сайт, к которому могут быть присоединены агенты.

В некоторых вариантах осуществления более высокая специфическая активность (или более высокое отношение агентов к АВ) может быть достигнута присоединением односайтового линкера к множеству сайтов в АВ. Это множество сайтов может быть введено в АВ одним из двух способов. В первом способе, можно получить несколько альдегидных групп и/или сульфгидрильных групп в одном и том же АВ. Во втором способе, к альдегиду или сульфгидрилу АВ можно присоединить "разветвленный линкер", имеющий несколько функциональных сайтов для последующего присоединения к линкерам. Функциональные сайты разветвленного линкера или линкера с множеством сайтов могут представлять альде-

гидные или сульфгидрильные группы или могут быть любым химическим сайтом, к которому могут быть присоединены линкеры. Еще более высокие специфические активности могут быть получены объединением этих двух подходов, то есть присоединением линкеров с многочисленными сайтами в несколько сайтов в АВ.

Расщепляемые линкеры.

Пептидные линкеры, чувствительные к расщеплению ферментами системы комплемента, такие как, не ограничиваясь этим, урокиназный активатор плазминогена, тканевой активатор плазминогена, трипсин, плазмин или другой фермент, обладающий протеолитической активностью, могут быть использованы в одном варианте осуществления настоящего раскрытия. Согласно одному из способов по настоящему изобретению агент присоединяют через линкер, чувствительный к расщеплению комплементом. Антитело выбирают из класса, который может активировать комплемент. Конъюгат антитело-агент, таким образом, активирует каскад комплемента и высвобождает агент в месте-мишени. Согласно другому способу по настоящему изобретению агент присоединяется через линкер, чувствительный к расщеплению ферментами, обладающими протеолитической активностью, такими как урокиназный активатор плазминогена, тканевой активатор плазминогена, плазмин или трипсин. Данные расщепляемые линкеры пригодны в конъюгированных активируемых антителах, которые включают внеклеточный токсин, например, в качестве неограничивающего примера любой из внеклеточных токсинов, приведенных в табл.11.

Неограничивающие примеры расщепляемых линкерных последовательностей приведены в табл.13.

Таблица 13. Примерные последовательности линкеров для конъюгации

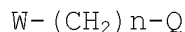
Типы последовательностей	расщепляемых	Аминокислотная последовательность
<u>Последовательности, расщепляемые плазмином</u>		
Проурокиназа		PRFKIIGG (SEQ ID NO: 396)
TGFβ		PRFRIIGG (SEQ ID NO: 397)
		SSRRRRALD (SEQ ID NO: 398)
Плазминоген		RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 399)
Стафилокиназа		SSSFDKGYKKGDDA (SEQ ID NO: 400)
		SSSFDKGYKRGDDA (SEQ ID NO: 401)
<u>Последовательности, расщепляемые фактором Ха</u>		
		IEGR (SEQ ID NO: 402)
		IDGR (SEQ ID NO: 403)
		GGSIDGR (SEQ ID NO: 404)
<u>Последовательности, расщепляемые MMP</u>		
Желатиназа А		PLGLWA (SEQ ID NO: 405)
<u>Последовательности, расщепляемые коллагеназой</u>		
Коллаген кожи телят (цепь α1(I))		GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 406)
Коллаген кожи телят (цепь α2(I))		GPQGLLGA (SEQ ID NO: 407)
Коллаген хряща телят (цепь α1(II))		GIAGQ (SEQ ID NO: 408)
Коллаген печени человека (цепь α1(II))		GPLGIAGI (SEQ ID NO: 409)
Человеческий α ₂ M		GPEGLRVG (SEQ ID NO: 410)
Человеческий PZP		YGAGLGVV (SEQ ID NO: 411)
		AGLGVVER (SEQ ID NO: 412)
		AGLGISST (SEQ ID NO: 413)
Крысиный α ₁ M		EPQALAMS (SEQ ID NO: 414)
		QALAMSAI (SEQ ID NO: 415)
Крысиный α ₂ M		AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 416)
		MDAFLESS (SEQ ID NO: 417)
Крысиный α ₁ I ₃ (2J)		ESLPVVAV (SEQ ID NO: 418)
Крысиный α ₁ I ₃ (27J)		SAPAVESE (SEQ ID NO: 419)
Коллагеназа человеческих фибробластов		DVAQFVLT (SEQ ID NO: 420)
(аутолитическое расщепление)		VAQFVLTE (SEQ ID NO: 421)
		AQFVLTEG (SEQ ID NO: 422)
		PVQPIGFQ (SEQ ID NO: 423)

Кроме того, агенты могут быть присоединены через дисульфидные связи (например, дисульфидные связи в молекуле цистеина) к АВ. Поскольку многие опухоли естественным образом выделяют высокие уровни глутатиона (восстанавливающего агента), то это может привести к восстановлению дисульфид-

ных связей с последующим высвобождением агента в месте доставки. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий агент, который будет модифицировать СМ, также будет модифицировать линкер конъюгированного активируемого антитела.

Спейсеры и расщепляемые элементы.

В некоторых вариантах осуществления может потребоваться сконструировать линкер таким образом, чтобы оптимизировать расстояние между агентом и АВ в активируемом антителе. Это может быть достигнуто применением линкера следующей общей структуры:



где

W представляет --NH-CH₂-- или --CH₂--;

Q представляет аминокислоту, пептид; или

n представляет целое число от 0 до 20.

В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать спейсерный элемент и расщепляемый элемент. Спейсерный элемент служит для размещения расщепляемого элемента от ядра АВ так, чтобы расщепляемый элемент был более доступен для фермента, ответственного за его расщепление. Некоторые из разветвленных линкеров, описанных выше, могут служить в качестве спейсерных элементов.

Из данного обсуждения должно быть понятно, что присоединение линкера к агенту (или спейсерного элемента к расщепляемому элементу или расщепляемого элемента к агенту) не обязательно должно представлять определенный способ присоединения или реакцию. Любая реакция, обеспечивающая продукт с подходящей стабильностью и биологической совместимостью, является пригодной.

Сывороточный комплемент и выбор линкеров.

Согласно одному из способов по настоящему изобретению, когда требуется высвобождение агента, то используется АВ, которое является антителом класса, который может активировать комплемент. Полученный конъюгат сохраняет способность связывать антиген и активировать каскад комплемента. Таким образом, согласно этому варианту осуществления настоящего изобретения агент соединяется с одним концом расщепляемого линкера или расщепляемого элемента, и другой конец линкерной группы присоединяется к определенному сайту в АВ. Например, если агент содержит гидроксигруппу или аминогруппу, то он может быть присоединен к карбоксильному концу пептида, аминокислоте или другому соответственно выбранному линкеру через сложноэфирную или амидную связь соответственно. Например, такие агенты могут быть присоединены к линкерному пептиду посредством карбодимидной реакции. Если агент содержит функциональные группы, которые будут мешать присоединению к линкеру, то эти интерферирующие функциональные группы могут быть блокированы до присоединения и деблокированы после того, как образовался продукт, конъюгат или промежуточное соединение. Противоположный или аминоконец линкера затем используют либо непосредственно, либо после дальнейшей модификации для связывания с АВ, которое способно активировать комплемент.

Линкеры (или спейсерные элементы линкеров) могут иметь любую желаемую длину, один конец которой может быть ковалентно присоединен к определенным сайтам в АВ активируемого антитела. Другой конец линкерного или спейсерного элемента может быть присоединен к аминокислоте или пептидному линкеру.

Таким образом, когда данные конъюгаты связываются с антигеном в присутствии комплемента, то амидная или сложноэфирная связь, которая присоединяет агент к линкеру, будет расщепляться, что приведет к высвобождению агента в его активной форме. Данные конъюгаты при введении субъекту будут выполнять доставку и высвобождение агента в месте-мишени, и они особенно эффективны для доставки *in vivo* фармацевтических агентов, антибиотиков, антиметаболитов, антипролиферативных агентов и т.п., как представлено, не ограничиваясь приведенными в табл.11.

Линкеры для высвобождения без активации комплемента.

В еще одном применении целенаправленной доставки желательна высвобождение агента без активации комплемента, поскольку активация каскада комплемента в конечном итоге будет лизировать клетку-мишень. Следовательно, такой подход пригоден, когда доставка и высвобождение агента должны выполняться без смерти клетки-мишени. Такова цель, когда желательна доставка клеточных медиаторов, таких как гормоны, ферменты, кортикостероиды, нейромедиаторы, гены или ферменты в клетки-мишени. Данные конъюгаты можно получить присоединением агента к АВ, которое не способно активировать комплемент, через линкер, который обладает слабой чувствительностью к расщеплению сывороточными протеазами. Когда данный конъюгат вводится индивидууму, то будут быстро образовываться комплексы антиген-антитело, в то время как расщепление агента будет происходить медленно, что приведет к высвобождению соединения в месте-мишени.

Биохимические кросс-линкеры.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело может быть конъюгировано с одним или несколькими терапевтическими агентами с использованием определенных биохимических кросс-линкеров. Кросс-линкеры образуют молекулярные мостики, которые связывают функциональные группы двух разных молекул. Для постадийного связывания двух разных белков можно использовать гетеро-

бифункциональные кросс-линкеры, которые устраняют нежелательное образование гомополимера.

Также пригодны пептидные линкеры, расщепляемые лизосомальными протеазами, например Val-Cit, Val-Ala или другие дипептиды. Кроме того, можно использовать кислотно-лабильные линкеры, расщепляемые в среде лизосом с низким pH, например бис-сиалиловый эфир. Другие подходящие линкеры включают катепсин-лабильные субстраты, особенно те, которые проявляют оптимальную функцию при кислотном значении pH.

Примерные гетеробифункциональные кросс-линкеры приведены в табл. 14.

Таблица 14. Примерные гетеробифункциональные кросс-линкеры

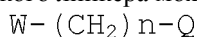
Гетеробифункциональные кросс-линкеры			
Линкер	Реагирует с	Преимущества и применения	Длина плеча спейсера после поперечного сшивания (ангстремы)
SMPT	Первичные амины Сульфидрилы	Более высокая стабильность	11,2 Å
SPDP	Первичные амины Сульфидрилы	Тиолирование Расщепляемое поперечное сшивание	6,8 Å
LC-SPDP	Первичные амины Сульфидрилы	Удлиненное плечо спейсера	15,6 Å
Сульфо-LC-SPDP	Первичные амины Сульфидрилы	Удлиненное плечо спейсера Водорастворимый	15,6 Å
SMCC	Первичные амины Сульфидрилы	Стабильная реакционноспособная малеимидная группа Конъюгация фермент-антитело Конъюгация гаптен-носитель белка	11,6 Å
Sulfo-SMCC	Первичные амины Сульфидрилы	Стабильная реакционноспособная группа Водорастворимый Конъюгация фермент-антитело	11,6 Å
MBS	Первичные амины Сульфидрилы	Конъюгация фермент-антитело Конъюгация гаптен-носитель белка	9,9 Å
Сульфо-MBS	Первичные амины Сульфидрилы	Водорастворимый	9,9 Å
SIAB	Первичные амины Сульфидрилы	Конъюгация фермент-антитело	10,6 Å
Сульфо-SIAB	Первичные амины Сульфидрилы	Водорастворимый	10,6 Å
SMPB	Первичные амины Сульфидрилы	Удлиненное плечо спейсера Конъюгация фермент-антитело	14,5 Å
Сульфо-SMPB	Первичные амины Сульфидрилы	Удлиненное плечо спейсера Водорастворимый	14,5 Å
EDE/Сульфо-NHS	Первичные амины Карбоксильные группы	Конъюгация гаптен-носитель белка	0
ABN	Углеводы Неселективные	Реагирует с сахарными группами	11,9 Å

Нерасщепляемые линкеры или прямое присоединение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат может быть сконструирован таким образом, чтобы агент доставлялся к мишени, но не высвобождался. Это может быть достигнуто присоединением агента к АВ непосредственно или через нерасщепляемый линкер.

Данные нерасщепляемые линкеры могут включать аминокислоты, пептиды, D-аминокислоты или другие органические соединения, которые могут быть модифицированы с включением функциональных групп, которые затем могут быть использованы для присоединения к АВ с помощью описанных здесь

способов. Общая формула такого органического линкера может представлять следующее:



где

W представляет --NH-CH₂-- или --CH₂--;

Q представляет аминокислоту, пептид; или

n представляет целое число от 0 до 20.

Нерасщепляемые конъюгаты.

В некоторых вариантах осуществления соединение может быть присоединено к АВ, которые не активируют комплемент. При использовании АВ, которые не способны активировать комплемент, такое присоединение может быть выполнено с использованием линкеров, которые чувствительны к расщеплению активированным комплементом, или с использованием линкеров, которые не чувствительны к расщеплению активированным комплементом.

Антитела, раскрытые здесь, также можно формулировать в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, получают способами, известными в данной области, такими как описано в публикации Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. США, 77: 4030 (1980); и патентах США № 4485045 и 4544545. Липосомы с повышенным временем циркуляции описаны в патенте США № 5013556.

Особенно пригодные липосомы могут быть получены методом обратнофазового выпаривания с липидной композицией, включающей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-derivатизированный фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ПЭ). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы с требуемым диаметром. Fab-фрагменты антитела по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с липосомами, как описано Martin et al., J. Biol. Chem, 257: 286-288 (1982), посредством реакции дисульфидного обмена.

Определения

Если не указано иное, то научные и технические термины, используемые в настоящем раскрытии, имеют значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области. Термин "a" или "an" относится к одному или нескольким из данных объектов. Например, соединение относится к одному или нескольким соединениям. Таким образом, термины "a", "an", "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться взаимозаменяемо. Кроме того, если иное не требуется по контексту, то термины в единственном числе включают термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают термины в единственном числе. Как правило, номенклатуры и методы, используемые в связи с культивированием клеток и тканей, молекулярной биологией и химией белков, олигонуклеотидов или полинуклеотидов и гибридизацией, описанных здесь, являются хорошо известными и обычно используются в данной области. Стандартные методы используются для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культивирования и трансформации тканей (например, электропорация, липофекция). Ферментативные реакции и способы очистки выполняются в соответствии со спецификациями изготовителя, или как они обычно выполняются в данной области техники, или как здесь описано. Вышеуказанные методы и процедуры обычно выполняются в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. См., например, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Номенклатуры, используемые в связи с, и лабораторные процедуры и методы аналитической химии, синтетической органической химии и лекарственной и фармацевтической химии являются хорошо известными и обычно используются в данной области. Стандартные методы используются для химического синтеза, химического анализа, приготовления фармацевтического препарата, формуляции и доставки, и для лечения пациентов.

Как здесь используется в соответствии с настоящим изобретением, следующие термины, если не указано иное, понимаются как имеющие следующие значения.

Как здесь используется, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным фрагментам молекул иммуноглобулина (Ig), т.е. молекулам, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается (иммунореагирует) с антигеном. Под выражениями "специфически связывается", или "иммунореагирует с", или "иммуноспецифически связывается" подразумевается, что антитело реагирует с одним или несколькими антигенными детерминантами желаемого антигена и не реагирует с другими полипептидами, или связывается со значительно более низкой аффинностью ($K_d > 10^{-6}$). Антитела включают, не ограничиваясь этим, поликлональные, моноклональные, химерные, доменные антитела, одноцепочечные антитела, Fab- и F(ab')₂ фрагменты, scFvs и библиотеку экспрессии Fab.

Известно, что основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных частей полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кД) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кД). Аминоконцевая область каждой цепи включает вариабельную область длиной примерно от 100 до 110 или больше аминокислот, главным образом ответственную за распозна-

вание антигена.

Карбоксиконцевая область каждой цепи определяет константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию. В общем, молекулы антител, полученные от человека, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга по характеру тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Некоторые классы также имеют подклассы, такие как IgG₁, IgG₂ и другие. Кроме того, у людей легкая цепь может быть каппа-цепью или ламбда-цепью.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) или "композиция моноклональных антител", как здесь используется, относится к популяции молекул антител, которые содержат только один молекулярный вид молекулы антитела, состоящий из уникального продукта гена легкой цепи и уникального продукта гена тяжелой цепи. В частности, участки, определяющие комплементарность (CDR) моноклонального антитела, идентичны во всех молекулах популяции. MAbs содержат антигенсвязывающий сайт, способный к иммунореакции с определенным эпитопом антигена, характеризующийся уникальной аффинностью связывания с ним.

Термин "антигенсвязывающий сайт" или "связывающий фрагмент" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий сайт образован аминокислотными остатками N-концевых варибельных ("V") областей тяжелых ("H") и легких ("L") цепей.

Три высокодивергентных участка в V областях тяжелых и легких цепей называются "гиперварибельными участками", которые находятся между более консервативными фланкирующими участками, известными как "каркасные области" (FR). Как здесь используется, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые обнаруживаются в природе между и смежно к гиперварибельным областям в иммуноглобулинах. В молекуле антитела три гиперварибельных участка легкой цепи и три гиперварибельных участка тяжелой цепи расположены по отношению друг к другу в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности связанного антигена, и три гиперварибельных участка каждой из тяжелой и легкой цепей называются "участками, определяющими комплементарность" или "CDR". Приписывание аминокислот к каждому домену осуществляется в соответствии с определениями Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), или Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

Как здесь используется, термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином, scFv или рецептором Т-клеток. Термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или рецептором Т-клеток. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики и также специфические зарядные характеристики. Например, антитела могут продуцироваться против N-концевых или C-концевых пептидов полипептида. Полагают, что антитело специфически связывается с антигеном, когда константа диссоциации составляет <1 мкМ; в некоторых вариантах осуществления <100 нМ и в некоторых вариантах осуществления <10 нМ.

Как здесь используется, термины "специфическое связывание", "иммунологическое связывание" и "иммунологические связывающие свойства" относятся к нековалентным взаимодействиям типа, который имеет место между молекулой иммуноглобулина и антигеном, для которого иммуноглобулин является специфическим. Силу или аффинность иммунологических связывающих взаимодействий можно выразить в значениях константы диссоциации (Kd) взаимодействия, где более низкое значение Kd представляет собой более высокую аффинность. Иммунологические связывающие свойства выбранных полипептидов могут быть количественно определены с использованием способов, хорошо известных в данной области. Один из таких способов предполагает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий сайт/антиген, где эти скорости зависят от концентраций партнеров комплекса, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые одинаково влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, "константа скорости ассоциации" (K_{on}) и "константа скорости диссоциации" (K_{off}) могут быть определены путем расчета концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации (см. Nature, 361: 186-87 (1993)). Отношение K_{off}/K_{on} позволяет не учитывать все параметры, не связанные с аффинностью, и равно константе диссоциации Kd (см., в общем, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem, 59: 439-473). Полагают, что антитело по настоящему изобретению специфически связывается с мишенью, когда константа связывания (Kd) составляет <1 пМ, в некоторых вариантах осуществления <100 нМ, в некоторых вариантах осуществления <10 нМ, и в некоторых вариантах осуществления от <100 пМ до примерно 1 пМ, что определено с помощью анализов, таких как анализы связывания радиолиганда или аналогичные анализы, известные специалистам в данной области.

Как здесь используется, термин "выделенный полинуклеотид" означает полинуклеотид геномной, кДНК или полинуклеотид синтетического происхождения, или их комбинацию, и в силу своего происхождения, "выделенный полипептид": 1) не ассоциирован со всем или частью полинуклеотида, с которым он связан в природе; 2) оперативно связан с полинуклеотидом, отличным от того, с которым он связан в природе; 3) не встречается в природе в качестве части большей последовательности. Полину-

леотиды по изобретению включают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие тяжелые цепи молекул иммуноглобулина, показанные здесь, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие легкие цепи молекул иммуноглобулина, показанные здесь.

Термин "выделенный белок", как здесь используется, означает белок из кДНК, рекомбинантной РНК или нуклеиновых кислот синтетического происхождения, или некоторой их комбинации, и в силу своего происхождения или источника происхождения "выделенный белок": (1) не ассоциирован с белками, найденными в природе; (2) не содержит других белков из того же источника, например не содержит мышинных белков; (3) экспрессируется клеткой другого вида; или (4) не встречается в природе.

Термин "полипептид" используется здесь как общий термин для обозначения нативного белка, фрагментов или аналогов полипептидной последовательности. Следовательно, нативные белковые фрагменты и аналоги представляют собой виды полипептидного рода. Полипептиды по изобретению включают тяжелые цепи молекул иммуноглобулина, показанные здесь, и легкие цепи молекул иммуноглобулина, показанные здесь, а также молекулы антител, образованные комбинациями, включающими тяжелые цепи молекул иммуноглобулина с легкими цепями молекул иммуноглобулина, такими как легкая цепь каппа молекул иммуноглобулина и наоборот, а также их фрагменты и аналоги.

Термин "встречающийся в природе", как здесь используется по отношению к объекту, относится к тому факту, что объект можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории или иным образом, является встречающейся в природе.

Термин "операбельно связанный", как здесь используется, относится к положениям описанных компонентов, которые находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать по своему назначению. Контрольная последовательность, "операбельно связанная" с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

Как здесь используется, термин "контрольная последовательность" относится к полинуклеотидным последовательностям, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Природа таких контрольных последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина, у прокариот такие контрольные последовательности обычно включают промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции, как правило, у эукариот такие контрольные последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин "контрольные последовательности" предназначен для включения, как минимум, всех компонентов, присутствие которых является существенным для экспрессии и процессинга, и может включать дополнительные компоненты, присутствие которых преимущественно, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров по слиянию. Как здесь используется, термин "полинуклеотид" означает нуклеотиды длиной по меньшей мере из 10 оснований, либо рибонуклеотиды, либо дезоксирибонуклеотиды, либо модифицированную форму любого типа нуклеотида. Термин включает одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК.

Термин "олигонуклеотид", упоминаемый здесь, включает встречающиеся в природе и модифицированные нуклеотиды, связанные вместе встречающимися в природе и неприродными олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды представляют собой полинуклеотиды, обычно имеющие длину из 200 оснований или меньше. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину от 10 до 60 оснований и в некоторых вариантах осуществления 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или от 20 до 40 оснований. Олигонуклеотиды обычно являются одноцепочечными, например для зондов, хотя, олигонуклеотиды могут быть двухцепочечными, например, для применения в конструировании гена-мутанта. Олигонуклеотиды по изобретению представляют смысловые или антисмысловые олигонуклеотиды.

Термин "встречающиеся в природе нуклеотиды", упоминаемый здесь, включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Как здесь используется, термин "модифицированные нуклеотиды" включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и тому подобное. Как здесь используется, термин "олигонуклеотидные связи" включает олигонуклеотидные связи, такие как фосфотиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноаты, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфороанилидат, фосфороамидат и тому подобное. Смотри, например, LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stscetal. J., Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al., Anti Cancer Drug Design, 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., патент США № 5151510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Олигонуклеотид может включать метку для детектирования, если необходимо.

Как здесь используется, двадцать обычных аминокислот и их аббревиатуры используются согласно их традиционному применению. См. "Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass (1991)). Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати обычных аминокислот, неприродных аминокислот, таких как α -, α -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нетрадиционные аминокислоты, также могут быть под-

ходящими компонентами для полипептидов по настоящему изобретению. Примеры необычных аминокислот включают: 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, О-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие аналогичные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). Как здесь используется в отношении полипептида, то левое направление представляет собой аминоконцевое направление, и правое направление является карбоксиконцевым направлением в соответствии со стандартным использованием и соглашением.

Аналогично, если не указано иначе, то левый конец одноцепочечных полинуклеотидных последовательностей представляет собой 5'-конец, левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей обозначается 5'-направлением. Направление 5' к 3' при добавлении появляющихся транскриптов РНК относится к областям направления последовательности транскрипции в цепочке ДНК, имеющей ту же последовательность, что и РНК, и которые представляют 5' к 5'-концу транскрипта РНК, относятся к "апстрим последовательностям", участки последовательности в цепочке ДНК, имеющие ту же последовательность, что и РНК, и которые являются 3' к 3'-концу транскрипта РНК, называются "даунстрим последовательностями".

Применительно к полипептидам термин "существенная идентичность" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием массы гэпов по умолчанию, обладают по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления положения остатков, которые не идентичны, отличаются консервативными аминокислотными заменами.

Как здесь обсуждалось, минорные вариации в аминокислотных последовательностях антител или молекул иммуноглобулина входят в объем настоящего изобретения, при условии, что изменения в аминокислотной последовательности составляют по меньшей мере 75%, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80, 90, 95%, и в некоторых вариантах 99%. В частности, предусматриваются консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены представляют замены, которые имеют место в семействе аминокислот, которые близки по их боковым цепям. Генетически кодированные аминокислоты обычно делятся на семейства: (1) кислые аминокислоты, к которым относятся аспарат, глутамат; (2) основные аминокислоты, к которым относятся лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты, к которым относятся аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные аминокислоты, к которым относятся глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспарат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают (i) серин и треонин, которые представляют семейство с алифатической гидроксигруппой; (ii) аспарагин и глутамин, которые представляют семейство, содержащее амид; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые являются алифатическим семейством; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые являются ароматическим семейством. Например, разумно ожидать, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин, или аналогичная замена аминокислоты на структурно близкую аминокислоту, не будут оказывать большого влияния на связывание или свойства полученной молекулы, особенно если замена не включает аминокислоту в сайте каркасной области. То, насколько изменение аминокислоты приведет к получению функционального пептида, можно легко определить анализом специфической активности производного полипептида. Такие анализы подробно описаны здесь. Фрагменты или аналоги антител или молекул иммуноглобулина могут быть легко получены специалистами в данной области. Подходящие аминоконцы и карбоксиконцы фрагментов или аналогов имеют место около границ функциональных областей. Структурные и функциональные области могут быть установлены сравнением данных по нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с известными или запатентованными базами последовательностей. В некоторых вариантах осуществления компьютерные методы сравнения используются для идентификации мотивов последовательности или прогнозируемых доменов конформации белка, которые встречаются в других белках с известной структурой и/или функцией. Известны способы идентификации белковых последовательностей, которые укладываются в известную трехмерную структуру. Bowie et al. Science 253: 164 (1991). Таким образом, приведенные выше примеры демонстрируют, что специалисты в данной области могут определить последовательности мотивов и структурные конформации, которые можно использовать для определения структурных и функциональных доменов по изобретению.

Подходящими аминокислотными заменами являются такие, которые (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) снижают чувствительность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания для образования белковых комплексов, (4) изменяют аффинность связывания и (5) или модифицируют другие

физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать различные мутации последовательности, отличной от встречающейся в природе пептидной последовательности. Например, одна или несколько аминокислотных замен (например, консервативные аминокислотные замены) могут быть сделаны во встречающейся в природе последовательности (например, во фрагменте полипептида вне домена(ов), образующих межмолекулярные контакты). Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, аминокислота, подвергаясь замене, не должна нарушать спираль, которая имеет место в исходной последовательности, или нарушать другие виды вторичной структуры, характерные для исходной последовательности). Примеры известных в данной области вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991).

Как здесь используется, термин "полипептидный фрагмент" относится к полипептиду, содержащему делецию в аминоконцевой или карбоксиконцевой области, но у которого остальная аминокислотная последовательность идентична соответствующим областям встречающейся в природе последовательности, полученной, например, из полноразмерной последовательности кДНК. Длина фрагментов, как правило, составляет по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 14 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот, как правило, по меньшей мере 50 аминокислот и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70 аминокислот. Как здесь используется, термин "аналог" относится к полипептидам, которые состоят из сегмента по меньшей мере из 25 аминокислот, который имеет существенную идентичность с фрагментом выведенной аминокислотной последовательности и который обладает специфическим связыванием с мишенью в подходящих условиях связывания. Как правило, полипептидные аналоги включают консервативную аминокислотную замену (или добавление или делецию) по отношению к встречающейся в природе последовательности. Аналоги обычно имеют длину по меньшей мере из 20 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления, длину по меньшей мере из 50 аминокислот или более, и часто могут иметь длину полноразмерного встречающегося в природе полипептида.

Термин "агент" используется здесь для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических веществ.

Как здесь используется, термины "метка" или "меченые" относятся к включению детектируемой метки, например введением радиоактивно меченой аминокислоты или присоединением к полипептиду биотинильных групп, которые могут детектироваться меченым авидином (например, стрептавидин, содержащий флуоресцентную метку или имеющий ферментативную активность, которые могут детектироваться оптическими или калориметрическими методами). В определенных ситуациях метка или маркер также могут быть терапевтическими. В данной области известны и могут быть использованы различные методы меченая полипептидов и гликопротеинов. Примеры меток для полипептидов включают, не ограничиваясь этим, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантанидные фосфоры), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, п-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные метки, биотинильные группы, заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности лейциновой молнии, сайты связывания вторичных антител, области связывания металлов, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метки присоединены с помощью плеч спейсера различной длины для снижения потенциальных пространственных затруднений. Как здесь используется, термин "фармацевтический агент или лекарственное средство" относится к химическому соединению или композиции, способным индуцировать желаемый терапевтический эффект при правильном введении пациенту.

Другие химические термины используются здесь в соответствии с их обычным применением в данной области техники, как показано в "McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms" (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Как здесь используется, термин "по существу чистый" означает, что молекула объекта является преобладающей молекулой, которая присутствует (т.е. на молярной основе она более избыточна, чем любые другие отдельные молекулы в композиции), и в некоторых вариантах осуществления по существу очищенная фракция представляет собой композицию, в которой молекула объекта составляет по меньшей мере примерно 50% (на молярной основе) от всех присутствующих видов макромолекул.

Как правило, по существу чистая композиция будет содержать более 80% всех видов макромолекул, присутствующих в композиции, в некоторых вариантах осуществления более 85, 90, 95 и 99%. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула объекта очищена до необходимой гомогенности (молекулы загрязняющих веществ не могут быть обнаружены в композиции обычными методами анализа), где композиция состоит в основном из одного вида макромолекул.

Термин "пациент" включает человека и субъектов ветеринарии.

Антитела и/или активируемые антитела по настоящему изобретению специфически связываются с конкретной мишенью, например человеческим белком-мишенью, таким как человеческий PDL1. Также

изобретение включает антитела и/или активируемые антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитела и/или активируемые антитела, описанные здесь. Также изобретение включает антитела и/или активируемые антитела, которые конкурируют с анти-PDL1-антителом и/или активируемым анти-PDL1-антителом, описанными здесь, за связывание с PDL1, например человеческим PDL1. Также изобретение включает антитела и/или активируемые антитела, которые перекрестно конкурируют с анти-PDL1-антителом и/или активируемым анти-PDL1-антителом, описанными здесь, за связывание с PDL1, например человеческим PDL1.

Специалистам в данной области должно быть понятно, что без излишнего экспериментирования можно определить, обладает ли моноклональное антитело (например, мышинное моноклональное или гуманизированное антитело) такой же специфичностью, как моноклональное антитело, используемое в способах, описанных здесь, определением того, насколько первое антитело препятствует последнему связываться с мишенью. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом по изобретению, что показано по снижению связывания моноклональным антителом по данному изобретению, то тогда два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или близким эпитопом. Альтернативный способ определения того, обладает ли моноклональное антитело специфичностью моноклонального антитела по данному изобретению, состоит в том, чтобы предварительно инкубировать моноклональное антитело по данному изобретению с мишенью и затем добавить тестируемое моноклональное антитело для определения того, ингибируется способность тестируемого моноклонального антитела связываться с мишенью. Если тестируемое моноклональное антитело ингибируется, то, по всей вероятности, оно обладает той же или функционально эквивалентной эпитопической специфичностью, что и моноклональное антитело по данному изобретению.

Полиспецифические активируемые антитела.

Изобретение также обеспечивает полиспецифические активируемые анти-PDL1-антитела. Полиспецифические активируемые антитела, обеспеченные здесь, представляют полиспецифические антитела, которые распознают PDL1 и по меньшей мере один или несколько других антигенов или эпитопов и которые включают по меньшей мере один маскирующий фрагмент (ММ), связанный по меньшей мере с одним антигенсвязывающим или эпитопсвязывающим участком полиспецифического антитела, таким образом, связывание ММ снижает способность антигенсвязывающего или эпитопсвязывающего участка связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ связан с антигенсвязывающим или эпитопсвязывающим участком полиспецифического антитела посредством расщепляемого фрагмента (СМ), который функционирует в качестве субстрата по меньшей мере для одной протеазы. Активируемые полиспецифические антитела, обеспеченные здесь, являются стабильными в системе кровообращения, активируются в предполагаемых местах лечения и/или диагностики, но не в нормальной, т.е. здоровой ткани, и при активации проявляют связывание с мишенью, которое, по меньшей мере, сравнимо со связыванием соответствующего немодифицированного полиспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела сконструированы для активации иммунных эффекторных клеток, также относятся здесь к полиспецифическим активируемым антителам, активаторам иммунных эффекторных клеток. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела сконструированы для активации лейкоцитов, также относятся здесь к полиспецифическим активируемым антителам, активаторам лейкоцитов. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела сконструированы для активации Т-клеток, также относятся здесь к полиспецифическим активируемым антителам, активаторам Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела взаимодействуют с поверхностным антигеном на лейкоците, таком как Т-клетка, на природной киллерной клетке (NK), на миелоидной мононуклеарной клетке, на макрофаге и/или на другой иммунной эффекторной клетке. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой лейкоцит. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой мононуклеарную клетку, такую как миелоидная мононуклеарная клетка. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела сконструированы для связывания или иного взаимодействия с более чем одной мишенью и или более чем одним эпитопом, также относятся здесь к активируемым антителам, нацеленным на многие антигены. Как здесь используется, термины "мишень" и "антиген" используются взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела, активаторы иммунных эффекторных клеток, включают нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PDL1, и антитело или его антигенсвязывающий участок, активаторы иммунной эффекторной клетки, где по меньшей мере одно из нацеливающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и/или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, активатора иммунной эффекторной клетки, маскированы. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активатор иммунных эффекторных клеток, включают первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которые связываются с первой мишенью иммунной эффекторной

клетки, где АВ1 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ1) таким образом, что связывание ММ1 уменьшает способность АВ1 связываться с первой мишенью. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают второе антитело или его фрагмент, которые включают второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), которые связываются с PDL1, где АВ2 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ2) таким образом, что связывание ММ2 уменьшает способность АВ2 связываться с PDL1. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активаторы иммунной эффекторной клетки, включают первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), которые связываются с первой мишенью иммунной эффекторной клетки, где АВ1 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ1) таким образом, что связывание ММ1 уменьшает способность АВ1 связываться с первой мишенью, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которые включают второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), которые связываются с PDL1, где АВ2 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ2), таким образом, что связывание ММ2 уменьшает способность АВ2 связываться с PDL1. В некоторых вариантах осуществления антитело, активирующее неиммунную эффекторную клетку, представляет собой антитело, нацеливающее на злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления неиммунное клеточное эффекторное антитело представляет IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело, активирующее иммунную эффекторную клетку, представляет scFv. В некоторых вариантах осуществления PDL1-нацеливающее антитело (например, неиммунное клеточное эффекторное антитело) представляет IgG, и антитело, активирующее иммунную эффекторную клетку, представляет scFv. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет лейкоцит. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет миелоидную мононуклеарную клетку.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические активируемые антитела, активаторы Т-клеток по изобретению, включают антитело, нацеливающее на PDL1, или его антигенсвязывающий фрагмент, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активаторы Т-клетки, где по меньшей мере одно из антитела, нацеливающего на PDL1, или его антигенсвязывающего фрагмента, и/или антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, активатора Т-клетки, маскированы. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активатор Т-клетки, включают первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), которые связываются с первой мишенью Т-клетки, где АВ1 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ1) таким образом, что соединение ММ1 уменьшает способность АВ1 связываться с первой мишенью. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают второе антитело или его фрагмент, которые включают второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), которые связываются с PDL1, где АВ2 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ2) таким образом, что соединение ММ2 уменьшает способность АВ2 связываться с PDL1. В некоторых вариантах осуществления антитело, активирующее Т-клетку, или его антигенсвязывающий фрагмент, включают первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), которые связываются с первой мишенью Т-клетки, где АВ1 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ1) таким образом, что соединение ММ1 уменьшает способность АВ1 связываться с первой мишенью, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают второе антитело или его фрагмент, которые включают второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), которые связываются с PDL1, где АВ2 присоединено к маскирующему фрагменту (ММ2) таким образом, что соединение ММ2 уменьшает способность АВ2 связываться с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифического активируемого антитела, активатора иммунных эффекторных клеток, одним антигеном является PDL1, и другой антиген обычно представляет стимуляторный или ингибиторный рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки, природной киллерной клетки (НК), миелоидной мононуклеарной клетки, макрофага и/или другой иммунной эффекторной клетки, такой как, не ограничиваясь этим, В7-Н4, ВТLА, CD3, CD4, CD8, CD16а, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, СТLА-4, GИTR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD1, TIGIT, TIM3 или VISTA. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой стимуляторный рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки или НК-клетки; примеры таких стимуляторных рецепторов включают, не ограничиваясь этим, CD3, CD27, CD28, CD137 (также называемые 4-1BB), GИTR, HVEM, ICOS, NKG2D и OX40. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет ингибиторный рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки; примеры таких ингибиторных рецепторов включают, не ограничиваясь этим, ВТLА, СТLА-4, LAG3, PD1, TIGIT, TIM3 и НК-экспрессируемые KIR. Область антитела, придающая специфичность к поверхностному антигену Т-клеток, также может быть замещена лигандом или доменом лиганда, которые связываются с рецептором Т-клеток, рецептором НК-клетки, рецептором макрофага и/или рецептором других иммунных эффекторных клеток, таким как, не ограничиваясь этим, В7-1, В7-2, В7Н3, PDL1, PDL2 или TNFSF9.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антителл, активатор Т-клеток, включает анти-CD3-эпсилон (CD3ε, также относится здесь к CD3ε и CD3) scFv, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно из анти-CD3ε scFv и/или нацеливающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента маскировано. В некоторых вариантах осуществления scFv CD3ε включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которые связываются с CD3ε, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1) таким образом, что соединение MM1 уменьшает способность AB1 связываться с CD3ε. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, которые включают второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которые связываются с PDL1, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2) таким образом, что соединение MM2 уменьшает способность AB2 связываться с PDL1. В некоторых вариантах осуществления CD3s scFv включает первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), которые связываются с CD3ε, где AB1 присоединено к маскирующему фрагменту (MM1) таким образом, что соединение MM1 уменьшает способность AB1 связываться с CD3ε, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает второе антитело или его фрагмент, который включает второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), которые связываются с PDL1, где AB2 присоединено к маскирующему фрагменту (MM2), так что соединение MM2 уменьшает способность AB2 связываться с PDL1.

В некоторых вариантах осуществления мультиантигенные нацеливающие антитела и/или мультиантигенные нацеливающие активируемые антитела включают, по меньшей мере, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с первой мишенью и/или первым эпитопом, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются со второй мишенью и/или вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления мультиантигенные нацеливающие антитела и/или мультиантигенные нацеливающие активируемые антитела связываются с двумя или более различными мишенями. В некоторых вариантах осуществления мультиантигенные нацеливающие антитела и/или мультиантигенные нацеливающие активируемые антитела связываются с двумя или более разными эпитопами на одной и той же мишени. В некоторых вариантах осуществления мультиантигенные нацеливающие антитела и/или мультиантигенные нацеливающие активируемые антитела связываются с комбинацией двух или более различных мишеней и двух или более различных эпитопов на одной и той же мишени.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело, включающее IgG, содержит маскированные переменные области IgG. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело, включающее scFv, содержит маскированные области scFv. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело включает переменные области IgG и области scFv, где по меньшей мере одна из переменных областей IgG связана с маскирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело включает переменные области IgG и области scFv, где по меньшей мере одна из областей scFv связана с маскирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело включает переменные области IgG и области scFv, где по меньшей мере одна из переменных областей IgG связана с маскирующим фрагментом и по меньшей мере одна из областей scFv связана с маскирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело включает переменные области IgG и области scFv, где каждая из переменных областей IgG и каждая из областей scFv связаны с их собственным маскирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления одна область полиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью для антигена-мишени и другая область антитела обладает специфичностью для поверхностного антигена Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления одна область полиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью для антигена-мишени и другая область антитела обладает специфичностью для другого антигена-мишени. В некоторых вариантах осуществления одна область полиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью для эпитопа антигена-мишени и другая область антитела обладает специфичностью для другого эпитопа антигена-мишени.

В полиспецифическом активируемом антителе scFv может быть слито с карбоксильным концом тяжелой цепи активируемого IgG антитела, с карбоксильным концом легкой цепи активируемого IgG антитела или с карбоксильными концами обеих тяжелых и легких цепей активируемого IgG антитела. В полиспецифическом активируемом антителе scFv может быть слито с аминоконцом тяжелой цепи активируемого IgG антитела, с аминоконцом легкой цепи активируемого IgG антитела или с аминоконцами как тяжелых, так и легких цепей активируемого IgG антитела. В полиспецифическом активируемом антителе scFv может быть слито с любой комбинацией одного или нескольких карбоксильных концов и одного или нескольких аминоконцов активируемого IgG антитела. В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент (MM), связанный с расщепляемым фрагментом (CM), присоединен и маскирует антигенсвязывающий участок IgG. В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент (MM), связанный с расщепляемым фрагментом (CM), присоединен и маскирует антигенсвязывающий участок по меньшей мере одного scFv. В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент

(ММ), связанный с расщепляемым фрагментом (СМ), присоединен и маскирует антигенсвязывающий участок IgG, и маскирующий фрагмент (ММ), связанный с расщепляемым фрагментом (СМ), присоединен и маскирует антигенсвязывающий участок по меньшей мере одного scFv.

В изобретении обеспечиваются примеры структур полиспецифических активируемых антител, которые включают, не ограничиваясь этим, следующее:

$$(VL-CL)_2: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2; (VL-CL)_2: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH^*-L3-VL^*)_2; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL^*-L3-VH^*)_2; (VL-CL)_2: (MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL)_2: (MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2: (VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2: (VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2: (VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2: (VH-CH1-CH2-CH3)_2; (MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VL-CL)_2: (VH-CH1-CH2-CH3)_2; (MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VL-CL)_2: (VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2: (MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2: (MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2: (MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2: (MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2: (MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*)_2: (MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*)_2: (MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*)_2: (MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*)_2: (MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2: (VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2: (VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; (VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2: (VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2; или (VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2: (VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$$

где VL и VH представляют переменные области легкой и тяжелой цепи первой специфичности, входящие в состав IgG; VL* и VH* представляют переменные области легкой и тяжелой цепи второй специфичности, входящие в состав scFv; L1 представляет собой линкерный пептид, соединяющий маскирующий фрагмент (ММ) и расщепляемый фрагмент (СМ); L2 представляет собой линкерный пептид, соединяющий расщепляемый фрагмент (СМ) и антитело; L3 представляет собой линкерный пептид, соединяющий переменные области scFv; L4 представляет собой линкерный пептид, соединяющий антитело первой специфичности с антителом второй специфичности; CL представляет константную область легкой цепи; и CH1, CH2, CH3 являются константными областями тяжелой цепи. Первая и вторая специфичности могут относиться к любому антигену или эпитопу.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифического активируемого антитела, активатора Т-клеток, один антиген представляет PDL1, и другой антиген обычно является стимуляторным (также называемым здесь активирующим) или ингибиторным рецептором, присутствующим на поверхности Т-клетки, природной киллерной клетки (NK), миелоидной мононуклеарной клетки, макрофага и/или другой иммунной эффекторной клетки, такой как, не ограничиваясь этим, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137 (также относится здесь к TNFRSF9), CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD1, TIGIT, TIM3 или VISTA. Область антитела, придающая специфичность по отношению к поверхностному антигену Т-клеток, также может быть замещена лигандом или областью лиганда, которые связываются с рецептором Т-клетки, рецептором NK-клетки, рецептором макрофага и/или рецептором другой иммунной эффекторной клетки, таким как, не ограничиваясь этим,

PDL1.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело представляет анти-PDL1-антитело, раскрытое здесь. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело может находиться в форме активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления scFv(s) может находиться в форме про-scFv (см., например, международные заявки WO 2009/025846, WO 2010/081173).

В некоторых вариантах осуществления scFv специфично для связывания CD3ε, и содержит или получено из антитела или его фрагмента, которые связываются с CD3ε, например, CH2527, FN18, H2C, OKT3, 2C11, UCHL1 или V9. В некоторых вариантах осуществления scFv специфично для связывания CTLA-4 (также относится здесь к CTLA и CTLA4).

В некоторых вариантах осуществления scFv против CTLA-4 включает аминокислотную последовательность:

```
GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA
PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKEIKRSG
GSTITSYINVYYTKLSSSGTQVQLVQTTGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV
SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTV
VSSAS (SEQ ID NO: 424)
```

В некоторых вариантах осуществления scFv против CTLA-4 включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 424.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3ε включает аминокислотную последовательность:

```
GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQ
LEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQ
GTTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSIIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPK
RWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSLTISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR
(SEQ ID NO: 425)
```

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3ε включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 425.

В некоторых вариантах осуществления scFv специфично для связывания с одной или более Т-клетками, одной или более NK-клетками и/или одним или более макрофагами. В некоторых вариантах осуществления scFv специфично для связывания с мишенью, выбранной из группы, состоящей из B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD1, TIGIT, TIM3 или VISTA.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело также включает агент, конъюгированный с АВ. В некоторых вариантах осуществления агент является терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления агент является противоопухолевым средством. В некоторых вариантах осуществления агент представляет токсин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с полиспецифическим активируемым антителом через линкер. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ через расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент, повреждающий нуклеиновую кислоту, такой как алкилятор ДНК или интеркалятор ДНК, или другой агент, повреждающий ДНК. В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент, выбранный из группы, приведенной в табл.11. В некоторых вариантах осуществления агент представляет доластатин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет ауристатин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет ауристатин Е или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет монометилауристатин Е (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления агент представляет монометилауристатин D (ММАД). В некоторых вариантах осуществления агент представляет майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления агент представляет DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления агент представляет дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления агент представляет пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления агент представляет димер пирролобензодиазепина.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело также включает детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка является диагностическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело естественно содержит одну или несколько дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело может быть сконструировано таким образом, чтобы включать одну или несколько дисульфидных связей.

Настоящее изобретение также обеспечивает выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полиспецифическое активируемое антитело, описанное здесь, а также векторы, которые включают данные выделенные последовательности нуклеиновой кислоты. В настоящем раскрытии представлены способы получения полиспецифического активируемого антитела путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где клетка содержит такую молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит такой вектор.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения полиспецифических активируемых антител по настоящему раскрытию путем (а) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует полиспецифическое активируемое антитело в условиях, которые приводят к экспрессии полиспецифического активируемого, и (b) выделения полиспецифического активируемого антитела. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любой из АВ, ММ и/или СМ, раскрытых здесь.

Настоящее изобретение также обеспечивает полиспецифические активируемые антитела и/или композиции полиспецифических активируемых антител, которые включают, по меньшей мере, первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), которые специфически связываются с первой мишенью или первым эпитопом, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), которые связываются со второй мишенью или вторым эпитопом, где, по меньшей мере, АВ1 соединено или иным образом присоединено к маскирующему фрагменту (ММ1) таким образом, что соединение ММ1 уменьшает способность АВ1 связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ1 связан с АВ1 посредством первой последовательности расщепляемого фрагмента (СМ1), которая включает субстрат для протеазы, например протеазы, которая локализована совместно с мишенью АВ1 в месте, подвергающемся лечению или в диагностике, у субъекта. Полиспецифические активируемые антитела, обеспеченные здесь, являются стабильными в системе кровообращения, активируются в предполагаемых местах лечения и/или диагностики, но не в нормальной, т.е. здоровой ткани, и, когда они активируются, то проявляют связывание с мишенью АВ1, которое, по меньшей мере, сравнимо со связыванием соответствующего, немодифицированного полиспецифического антитела. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любой из АВ, ММ и/или СМ, раскрытых здесь.

Настоящее изобретение также обеспечивает композиции и способы, которые включают полиспецифическое активируемое антитело, которое включает, по меньшей мере, первое антитело или фрагмент антитела (АВ1), которые специфически связываются с мишенью, и второе антитело или фрагмент антитела (АВ2), где, по меньшей мере, первое АВ в полиспецифическом активируемом антителе соединено с маскирующим фрагментом (ММ1), который уменьшает способность АВ1 связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления каждое АВ связано с ММ, который уменьшает способность его соответствующего АВ связываться с каждой мишенью. Например, в вариантах осуществления биспецифического активируемого антитела АВ1 соединено с первым маскирующим фрагментом (ММ1), который уменьшает способность АВ1 связываться со своей мишенью, и АВ2 связано со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), который уменьшает способность АВ2 связываться с его мишенью. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит более двух областей АВ; в таких вариантах осуществления АВ1 связано с первым маскирующим фрагментом (ММ1), который уменьшает способность АВ1 связываться со своей мишенью, АВ2 соединено со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), который уменьшает способность АВ2 связываться со своей мишенью, АВ3 связано с третьим маскирующим фрагментом (ММ3), который уменьшает способность АВ3 связываться со своей мишенью, и так далее для каждого АВ в полиспецифическом активируемом антителе. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любой из АВ, ММ и/или СМ, раскрытых здесь.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело дополнительно включает по меньшей мере один расщепляемый фрагмент (СМ), который является субстратом для протеазы, где СМ связывает ММ с АВ. Например, в некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело включает, по меньшей мере, первое антитело или фрагмент антитела (АВ1), которые специфически связываются с мишенью, и второе антитело или фрагмент антитела (АВ2), где, по меньшей мере, первое АВ в полиспецифическом активируемом антителе соединено посредством первого расщепляемого фрагмента (СМ1) с маскирующим фрагментом (ММ1), который уменьшает способность АВ1 связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления биспецифических активируемых антител АВ1 связано через СМ1 с ММ1, и АВ2 связано через второй расщепляемый фрагмент (СМ2) со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), который уменьшает способность АВ2 связываться со своей мишенью. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое активируемое антитело содержит более двух областей АВ; в некоторых из этих вариантов осуществления АВ1 связано через

СМ1 с ММ1, АВ2 соединено через СМ2 с ММ2, и АВ3 соединено через третий расщепляемый фрагмент (СМ3) с третьим маскирующим фрагментом (ММ3), который уменьшает способность АВ3 связываться со своей мишенью, и т.д. для каждого АВ в полиспецифическом активируемом антителе. Подходящие АВ, ММ и/или СМ включают любой из АВ, ММ и/или СМ, раскрытых здесь.

Активируемые антитела, имеющие несвязывающиеся стерические группы или партнеры по связыванию для несвязывающихся стерических групп.

Настоящее изобретение также обеспечивает активируемые антитела, которые включают несвязывающиеся стерические группы (NB) или партнеры по связыванию (BP) для несвязывающихся стерических групп, где BP вызывает рекрутинг или иным образом привлекает NB к активируемому антителу. Активируемые антитела, обеспеченные здесь, включают, например, активируемое антитело, которое содержит несвязывающуюся стерическую группу (NB), расщепляемый линкер (CL) и антитело или фрагмент антитела (AB), которые связываются с мишенью; активируемое антитело, которое включает связывающий партнер для несвязывающейся стерической группы (BP), CL и AB; и активируемое антитело, которое включает BP, к которой рекрутирован NB, CL и AB, которое связывается с мишенью. Активируемые антитела, в которых NB ковалентно связаны с CL и AB активируемого антитела или связаны взаимодействием с BP, который ковалентно связан с CL и AB активируемого антитела, в настоящем документе называются "NB-содержащими активируемыми антителами". "Активируемое или переключаемое" означает, что активируемое антитело проявляет первый уровень связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в состоянии ингибирования, маскирования или нерасщепления (т.е. первая конформация), и второй уровень связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в неингибированном, немаскированном и/или расщепленном состоянии (т.е. вторая конформация, т.е. активированное антитело), где второй уровень связывания с мишенями выше, чем первый уровень связывания с мишенью. Композиции активируемых антител могут проявлять повышенную биодоступность и более благоприятное биораспределение по сравнению с традиционными терапевтическими антителами.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела обеспечивают пониженную токсичность и/или пониженные неблагоприятные побочные эффекты, которые в противном случае могли бы быть результатом связывания в местах, не требующих лечения и/или диагностики, если бы АВ не было маскировано или иным образом не ингибировано в отношении связывания с таким местом.

Активируемые анти-PDL1-антитела, которые включают несвязывающуюся стерическую группу (NB), могут быть получены с использованием способов, описанных в публикации международной заявки PCT WO 2013/192546, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей ее полноте.

Применение антител, конъюгированных антител, активируемых антител и конъюгированных активируемых антител.

Очевидно понятно, что введение терапевтических средств по настоящему изобретению будет проводиться с подходящими носителями, эксципиентами и другими агентами, которые включаются в композиции для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и тому подобное. Множество подходящих композиций можно найти в фармацевтическом справочнике, известном всем химикам, работающим в области фармации: Remington's Pharmaceutical Sciences (15-е изд., Издательство Mack Publishing, Easton, PA (1975)), в частности, в главе 87, Blaug, Seymour. Такие композиции включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, везикулы, содержащие липиды (катионные или анионные) (такие как липофектин), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовоска (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовоск. Любая из вышеуказанных смесей может быть подходящей в способах лечения и препаратах согласно настоящему изобретению при условии, что активный ингредиент в композиции не инактивируется композицией, и композиция является физиологически совместимой и переносимой при определенном способе введения. Смотри также Baldrick P., "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance", Regul. Toxicol Pharmacol., 32(2):210-8 (2000), Wang W., "Lyophilization and development of solid protein Pharmaceuticals", Int. J. Pharm., 203(1-2): 1-60 (2000), Charman W.N., "Lipids, lipophilic drugs and oral drug delivery-some emerging concepts" J. Pharm. Sci., 89(8):967-78 (2000), Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA J. Pharm. Sci. Technol., 52:238-311 (1998), и ссылки на них для дополнительной информации, относящейся к композициям, эксципиентам и носителям, хорошо известным химикам, работающим в области фармации.

Терапевтические композиции по настоящему изобретению, которые включают анти-PDL1-антитело и/или активируемое анти-PDL1-антитело, например, в качестве неограничивающего примера, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, применяются для профилактики, лечения или иного ослабления заболевания или расстройства, связанного с aberrантной экспрессией и/или активностью мишени. Например, терапевтические композиции по настоящему изобретению, которые включают антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, применяются для лечения или иного ослабления рака или другого неопластического заболевания, воспаления, воспалительного расстройства и/или ауто-

иммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное заболевание, при которых экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль, в которой экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание, при котором экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется в паренхиме (например, при раке, в участке органа или ткани, который часто выполняет функцию(и) органа или ткани). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется в клетке, ткани или органе. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется в строме (т.е. соединительном поддерживающем каркасе клетки, ткани или органа). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется в остеобласте. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется в эндотелии (сосудистой сети). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессируется в раковой стволовой клетке. В некоторых вариантах осуществления агент, к которому конъюгировано антитело и/или активируемое антитело, является ингибитором микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления агент, к которому конъюгировано антитело и/или активируемое антитело, является агентом, повреждающим нуклеиновую кислоту.

Эффективность профилактики, ослабления или лечения определяется с использованием любого известного способа диагностики или лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью мишени, например такой как аберрантная экспрессия и/или активность мишени. Пролонгация выживаемости субъекта или иначе замедление прогрессирования заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью мишени, например, аберрантной экспрессией и/или активностью мишени, у субъекта, свидетельствует о том, что антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, дает клиническое преимущество.

Антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело можно вводить в форме фармацевтических композиций. Принципы и обсуждение, связанные с приготовлением таких композиций, а также руководство по выбору компонентов детально предоставлены, например, в Remington:

The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; and Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

В некоторых вариантах осуществления, где используются фрагменты антител, выбирают самый маленький фрагмент, который специфически связывается со связывающим доменом белка-мишени. Например, на основе последовательностей варибельной области антитела можно сконструировать молекулы пептида, которые сохраняют способность связываться с последовательностью белка-мишени. Такие пептиды можно синтезировать химически и/или получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК (смотри, например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). Композиция также может содержать более чем одно активное соединение, если это необходимо, для конкретного показания, которое подвергается лечению, например, в некоторых вариантах осуществления, с дополнительными видами активности, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. В некоторых вариантах осуществления или в дополнении композиция может содержать агент, который усиливает ее функцию, например, такой как цитотоксический агент, цитокин, химиотерапевтический препарат или агент, ингибирующий рост. Такие молекулы соответственно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для намеченной цели.

Активные ингредиенты также могут быть включены в микрокапсулы, приготовленные, например, методами коацервации или межфазной полимеризацией, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы, или желатиновые микрокапсулы и микрокапсулы из поли(метилметакрилата) соответственно, и в коллоидных системах доставки лекарств (для например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсиях.

Композиции, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через стерильные мембранные фильтры.

Можно приготовить композиции с замедленным высвобождением. Подходящие примеры композиций с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, где матрицы находятся в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США № 3777919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, не подвергающийся деградации этиленвинилацетат, деградируемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LU-

PRON DEPORT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Хотя, полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, позволяют высвобождать молекулы в течение более 100 суток, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело содержит детектируемую метку. Используют интактное антитело или его фрагмент (например, Fab, scFv или F(ab)₂). Термин "меченный" в отношении зонда или антитела предназначен для включения прямого мечения зонда или антитела путем соединения (т.е. физического соединения) детектируемого вещества с зондом или антителом, а также опосредованного мечения зонда или антитела по реакции с другим реагентом, в который непосредственно введена метка. Примеры опосредованного мечения включают детектирование первичного антитела с использованием флуоресцентно меченного вторичного антитела и концевое мечение ДНК зонда биотином, так чтобы его можно обнаружить с использованием флуоресцентно меченного стрептавидина. Термин "биологический образец" предназначен для включения тканей, клеток и биологических жидкостей, выделенных из организма субъекта, а также тканей, клеток и жидкостей, присутствующих в организме субъекта. Таким образом, в термин "биологический образец" включается кровь и фракция, или компонент крови, в том числе, сыворотка крови, плазма крови или лимфа. Т.е., способ детектирования по настоящему изобретению может быть использован для детектирования аналита мРНК, белка или геномной ДНК в биологическом образце *in vitro*, а также *in vivo*. Например, методы *in vitro* для детектирования аналита мРНК включают нозерн-блоттинг и гибридизацию *in situ*. Методы *in vitro* для детектирования аналита белка включают анализы на основе иммуноферментного анализа (ELISA), вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммунохимическое окрашивание и иммунофлуоресценцию. Методы *in vitro* для детектирования аналита геномной ДНК включают саузерн-блоттинг. Процедуры проведения иммунологических анализов описаны, например, в "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; and "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Кроме того, методы *in vivo* для детектирования аналита белка включают введение субъекту меченого антитела к анализируемому белку. Например, антитело может быть помечено радиоактивной меткой, присутствие и местоположение которой у субъекта может быть обнаружено стандартными методами визуализации.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по настоящему изобретению также пригодны для различных диагностических и профилактических композиций. В одном варианте осуществления пациентам, имеющим риск развития одного или более из вышеуказанных расстройств, вводят антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело. Предрасположенность пациента или органа к одному или более вышеуказанных расстройств может быть определена с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят людям, с диагнозом клинического показания, связанного с одним или более из вышеуказанных расстройств. При постановке диагноза вводят антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело для ослабления или отмены эффектов клинического показания.

Антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело по изобретению также пригодны для детектирования мишени в образцах пациентов, и соответственно они пригодны для применения в качестве диагностикумов. Например, антитела и/или активируемые антитела и их конъюгированные варианты по настоящему изобретению применяются в анализах *in vitro*, например ELISA, для определения уровней мишени в образце пациента.

В одном варианте осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело по настоящему изобретению иммобилизуют на твердой подложке (например, в лунке(ах) микротитрационного планшета). Иммобилизованное антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело служит в качестве захватывающего антитела для любой мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед контактированием иммобилизованного антитела и/или активируемого антитела и/или их конъюгированных вариантов с образцом пациента твердую подложку промывают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как молочный белок или альбумин, для предупреждения неспецифической адсорбции аналита.

Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, предположительно содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки крови от субъекта с подозрением на наличие уровней циркулирующего антигена, которые считаются диагностическими для патологии. После отмывания тестируемого образца или стандарта твердый носитель обрабатывают вторым антителом, которое содержит детектируемую метку. Меченое второе антитело служит в качестве детектирующего антитела. Измеряют уровень детектируемой

метки и определяют концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце сравнением со стандартной кривой, построенной по стандартным образцам.

Очевидно понятно, что на основе результатов, полученных с использованием антител и активируемых антител по настоящему изобретению, и их конъюгированных вариантов, в диагностическом анализе *in vitro*, можно определить стадию заболевания у субъекта на основе уровней экспрессии антигена-мишени. Для определенного заболевания образцы крови отбирают от субъектов, диагностированных как находящиеся на разных стадиях прогрессирования заболевания, и/или на разных точках терапевтического лечения заболевания. Используя популяцию образцов, которая обеспечивает статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или лечения, составляется диапазон концентраций антигена, который можно считать характерным для каждой стадии.

Антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело также можно использовать в диагностических и/или визуализирующих методах. В некоторых вариантах осуществления такие способы являются способами *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления такие способы являются способами *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такими способами являются способы *ex vivo*. Например, активируемые антитела, содержащие ферментативно расщепляемый СМ, могут быть использованы для детектирования присутствия или отсутствия фермента, который способен расщеплять СМ. Такие активируемые антитела могут использоваться в диагностике, которая может включать детектирование *in vivo* (например, качественное или количественное) активности фермента (или, в некоторых вариантах осуществления среды с повышенным потенциалом восстановления, такой как среда, которая может обеспечить восстановление дисульфидной связи) посредством измеренного накопления активированных антител (т.е. антител, образующихся в результате расщепления активируемого антитела) в данной клетке или ткани данного организма-хозяина. Такое накопление активированных антител указывает не только на то, что ткань экспрессирует ферментативную активность (или повышенный потенциал восстановления в зависимости от природы СМ), но также и то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

Например, СМ можно выбрать в качестве субстрата, по меньшей мере, для одной протеазы, обнаруженной в месте опухоли, в месте вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченном месте (например, таком как абсцесс, орган и т.п.) и тому подобное. АВ может представлять молекулу, которая связывается с антигеном-мишенью. Используя способы, раскрытые здесь или, когда это необходимо, способы, известные специалисту в данной области, детектируемая метка (например, флуоресцентная метка или радиоактивная метка, или радиоактивный индикатор) могут быть конъюгированы с АВ или другой областью антитела и/или активируемого антитела. Подходящие детектируемые метки обсуждаются в контексте вышеуказанных методов скрининга, и ниже приводятся их дополнительные конкретные примеры. Используя АВ, специфичное к белку или пептиду, показателю болезненного состояния, вместе по меньшей мере с одной протеазой, активность которой повышена в интересующей больной ткани, активируемые антитела будут демонстрировать повышенную скорость связывания с большими тканями по сравнению с тканями, где отсутствует фермент на детектируемом уровне или присутствует на более низком уровне, чем в больной ткани заболевания, или неактивен (например, находится в виде зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку низкомолекулярные белки и пептиды быстро выделяются из крови системой почечной фильтрации, и потому, что фермент, специфичный для СМ, отсутствует на детектируемом уровне (или присутствует на более низких уровнях в здоровых тканях или присутствует в неактивной конформации), то накопление активированных антител в больной ткани усиливается по сравнению со здоровыми тканями.

В еще одном примере активируемые антитела могут быть использованы для детектирования присутствия или отсутствия расщепляющегося агента в образце. Например, когда активируемые антитела содержат СМ, чувствительный к расщеплению ферментом, то активируемые антитела можно использовать для определения (качественно или количественно) присутствия фермента в образце. В еще одном примере, когда активируемые антитела содержат СМ, чувствительный к расщеплению восстанавливающим агентом, то активируемые антитела можно использовать для определения (качественно или количественно) наличия восстанавливающих условий в образце. Для облегчения анализа в этих способах активируемые антитела могут быть помечены детектируемой меткой и могут быть связаны с носителем (например, твердой подложкой, такой как стекло или шарик). Детектируемую метку можно расположить в области активируемого антитела, которая не высвобождается после расщепления, например, детектируемая метка может представлять собой погашенную флуоресцентную метку или другую метку, которая не обнаруживается до тех пор, пока не произойдет расщепление. Анализ можно проводить, например, контактированием иммобилизованных, детектируемых меченых активируемых антител с образцом, предположительно содержащим фермент и/или восстанавливающий агент, в течение времени, достаточного для расщепления, затем промыванием для удаления избытка образца и загрязняющих веществ. Присутствие или отсутствие расщепляющегося агента (например, фермента или восстанавливающего агента) в образце затем оценивают по изменению детектируемого сигнала активируемых антител до контактирования с образцом, например, по наличию и/или увеличению детектируемого сигнала за счет расщепления

активируемого антитела под действием расщепляющего агента в образце.

Такие способы детектирования также могут быть адаптированы для детектирования присутствия или отсутствия мишени, которая способна связываться с АВ активируемых антител при расщеплении. Таким образом, анализы могут быть адаптированы для оценки присутствия или отсутствия расщепляющего агента и присутствия или отсутствия интересующей мишени. Присутствие или отсутствие расщепляющего агента может быть обнаружено по наличию и/или увеличению детектируемой метки активируемых антител, как описано выше, и присутствие или отсутствие мишени может быть обнаружено по детектированию комплекса мишень-АВ, например, с использованием детектируемого меченого антитела к мишени.

Активируемые антитела также применимы для визуализации *in situ* для подтверждения активации активируемого антитела, например, по расщеплению протеазой и связыванию с конкретной мишенью. Визуализация *in situ* представляет метод, который позволяет определить локализацию протеолитической активности и мишени в биологических образцах, таких как клеточные культуры или срезы тканей. Используя эту методику, можно подтвердить связывание с данной мишенью и протеолитическую активность на основе присутствия детектируемой метки (например, флуоресцентной метки).

Данные способы пригодны для применения с любыми замороженными клетками или тканями, полученными из пораженного места (например, опухолевой ткани) или здоровых тканей. Такие способы также пригодны для свежих образцов клеток или тканей.

В данных способах активируемое антитело метят детектируемой меткой. Детектируемая метка может представлять собой флуоресцентный краситель (например, флуорофор, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), метку Alexa Fluor®), краситель, детектируемый в ближней инфракрасной области (NIR) (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и реагент для амплификации, такой как стрептавидин или фермент (например, пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза).

Детектирование метки в образце, который был инкубирован с меченым активируемым антителом, указывает на то, что образец содержит мишень и содержит протеазу, которая специфична для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие протеазы может быть подтверждено с использованием ингибиторов протеаз широкого спектра, таких как описанные здесь, и/или с использованием агента, специфичного для протеазы, например, антитела, такого как А11, которое специфично для протеазы матрипазы и ингибирует протеолитическую активность матрипазы; см., например, публикацию международной заявки WO 2010/129609, опубликованную 11 ноября 2010 г. Аналогичный подход с применением ингибиторов протеаз широкого спектра, таких как описанные здесь, и/или с использованием более селективного ингибирующего агента, может быть использован для идентификации протеазы, которая является специфичной для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени может быть подтверждено с использованием агента, специфичного для мишени, например другого антитела, или детектируемая метка может конкурировать с немеченой мишенью. В некоторых вариантах осуществления может быть использовано немеченое активируемое антитело с детектированием меченым вторичным антителом или с использованием более сложной системы детектирования.

Подобные способы также пригодны для визуализации *in vivo*, где детектирование флуоресцентного сигнала у субъекта, например млекопитающего, включая человека, указывает, что больное место содержит мишень и содержит протеазу, которая специфична для СМ активируемого антитела.

Данные способы также пригодны в наборах и/или в качестве реагентов для детектирования, идентификации или характеристики протеазной активности в различных клетках, тканях и организмах на основе специфичного к протеазе СМ в активируемом антителе.

Настоящее изобретение обеспечивает способы применения антител и/или активируемых антител при различных диагностических и/или профилактических показаниях. Например, настоящее изобретение обеспечивает способы детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени, представляющей интерес, у субъекта или в образце, посредством (i) контактирования субъекта или образца с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (например, ММ), расщепляющий фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, например протеазой, и антигенсвязывающий участок или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с интересующей мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном, неактивном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) где ММ представляет пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не имеет аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию с АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию с АВ; и (b) где в нерасщепленном неактивном состоянии ММ препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном активированном состоянии ММ не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью; и (ii) измерение уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце указывает, что расщеп-

ляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в образце, и где недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце указывает, что расщепляющий агент, мишень или оба расщепляющий агент и мишень отсутствуют и/или недостаточно присутствуют у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является активируемым антителом, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка расположена в АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активированного антитела у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

Настоящее изобретение также обеспечивает способы детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце путем (i) контактирования субъекта или образца с активируемым антителом в присутствии интересующей мишени, например мишени, где активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, например протеазой, и антигенсвязывающий участок или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с интересующей мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном неактивированном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (a) где ММ представляет пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не имеет аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию с АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию с АВ; и (b) где в нерасщепленном неактивированном состоянии ММ препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном активированном состоянии ММ не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью; и (ii) измерение уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце указывает, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в образце, и недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце указывает, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является активируемым антителом, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка расположена в АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активированного антитела у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

Настоящее изобретение также обеспечивает наборы для применения в способах детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, где наборы включают, по меньшей мере, активируемое антитело, которое содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, например протеазой, и антигенсвязывающий участок или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с интересующей мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном неактивированном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (a) где ММ представляет пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не имеет аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию с АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию с АВ; и (b) где в нерасщепленном неактивированном состоянии ММ препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном активированном состоянии ММ не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью; и (ii) измерение уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце указывает, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в образце, и где недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце указывает, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является активируемым антителом, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка расположена в АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активированного антитела у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

Настоящее изобретение также обеспечивает способы детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце путем (i) контактирования субъекта или образца с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, например протеазой, антигенсвязывающий участок (АВ), который специфически связывается с мишенью, и детектируемую метку, где активируемое антитело в нерасщепленном неактивированном состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-конца: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; где ММ представляет собой пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью, и где ММ не имеет аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию с АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию с АВ; где в нерасщепленном неактивированном состоянии ММ препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью, а в расщепленном активированном состоянии ММ не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью; и где детектируемая метка расположена в участке активируемого антитела, которое высвобождается после расщепления СМ; и (ii) измерение уровня детектируемой метки у субъекта или в образце, где детектируемый уровень детектируемой метки у субъекта или в образце указывает, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в образце, и где недетектируемый уровень детектируемой метки у субъекта или в образце указывает, что расщепляющий агент присутствует в субъекте или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является активируемым антителом, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка расположена в АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

Настоящее изобретение также обеспечивает наборы для применения в способах детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, где наборы включают, по меньшей мере, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело (например, активируемое антитело, с которым конъюгирован терапевтический агент), описанные здесь, для применения при контактировании субъекта или биологического образца и средства для детектирования уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце, и где недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент, мишень или оба расщепляющий агент и мишень отсутствуют и/или недостаточно присутствуют у субъекта или в биологическом образце, так что связывание с мишенью и/или расщепление протеазой активируемого антитела не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце.

Настоящее изобретение также обеспечивает способы детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце путем (i) контактирования субъекта или биологического образца с активируемым антителом в присутствии мишени, и (ii) измерение уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце, и где недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в биологическом образце на детектируемом уровне, так, что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце. Такое активируемое антитело включает маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, например протеазой, и антигенсвязывающий участок или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (a) где ММ представляет пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью и где ММ не имеет аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию с АВ; и (b) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является активируемым антителом, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка прикрепляется к маскирующему фрагменту. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка присоединена к N-концу расщепляемого фрагмента к сайту расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления один антигенсвязывающий сайт АВ мас-

кирован. В некоторых вариантах осуществления, где антитело по настоящему раскрытию имеет по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, по меньшей мере один сайт связывания антигена маскирован и по меньшей мере один сайт связывания антигена не маскирован. В некоторых вариантах осуществления все антигенсвязывающие сайты маскируются. В некоторых вариантах осуществления стадия измерения включает применение вторичного реагента, содержащего детектируемую метку.

Настоящее изобретение также обеспечивает наборы для применения в способах детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, где наборы включают, по меньшей мере, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанные здесь, для применения при контактировании субъекта или биологического образца с активируемым антителом в присутствии мишени и измерении уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце и где недетектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в биологическом образце на детектируемом уровне, так что расщепление протеазой активируемого антитела не может быть детектировано у субъекта или в биологическом образце. Такое активируемое антитело включает маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, например протеазой, и антигенсвязывающий участок или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) где ММ представляет пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью и где ММ не имеет аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию с АВ; и (b) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является активируемым антителом, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка присоединена к маскирующему фрагменту. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка присоединена к N-концу расщепляемого фрагмента к сайту расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления один антигенсвязывающий сайт АВ маскирован. В некоторых вариантах осуществления, где антитело по настоящему раскрытию имеет по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт маскируется и по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт не маскируется. В некоторых вариантах осуществления все антигенсвязывающие сайты маскируются. В некоторых вариантах осуществления стадия измерения включает применение вторичного реагента, содержащего детектируемую метку.

Настоящее изобретение также обеспечивает наборы для применения в способах детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце, где наборы включают, по меньшей мере, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанные здесь, для применения при контактировании субъекта или биологического образца и средства для детектирования уровня активируемого активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где активируемое антитело включает детектируемую метку, которая расположена на участке активируемого антитела, который высвобождается после расщепления СМ, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в биологическом образце, так что связывание с мишенью и/или расщепление протеазой активируемого антитела не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и где не детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент присутствует у субъекте или в биологическом образце на детектируемом уровне.

Настоящее изобретение обеспечивает способы детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце путем (i) контактирования субъекта или биологического образца с активируемым антителом, где активируемое антитело включает детектируемую метку, которая расположена в участке активируемого антитела, который высвобождается после расщепления СМ, и (ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент, мишень или оба расщепляющий агент и мишень отсутствуют и/или недостаточно присутствуют у субъекта или в биологическом образце, так что связывание с мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и где пониженный детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Пониженным уровнем детекти-

руемой метки является, например, снижение примерно на 5%, примерно на 10%, примерно на 15%, примерно на 20%, примерно на 25%, примерно на 30%, примерно на 35%, примерно на 40%, примерно на 45%, примерно на 50%, примерно на 55%, примерно на 60%, примерно на 65%, примерно на 70%, примерно на 75%, примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95% и/или примерно на 100%. Такое активируемое антитело включает маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий участок или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) где ММ представляет пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью и где ММ не имеет аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию с АВ; и (б) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является активируемым антителом, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка расположена в АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

Настоящее изобретение также обеспечивает наборы для применения в способах детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента и мишени у субъекта или в образце, где наборы включают, по меньшей мере, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанные здесь, для применения в контактировании субъекта или биологического образца и средства для детектирования уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент, мишень или оба расщепляющий агент и мишень отсутствуют и/или недостаточно присутствуют у субъекта или в биологическом образце, так что связывание с мишенью и/или расщепление протеазой активируемого антитела не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и где пониженный детектируемый уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце указывает на то, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Пониженным уровнем детектируемой метки является, например, уменьшение примерно на 5%, примерно на 10%, примерно на 15%, примерно на 20%, примерно на 25%, примерно на 30%, примерно на 35%, примерно на 40%, примерно на 45%, примерно на 50%, примерно на 55%, примерно на 60%, примерно на 65%, примерно на 70%, примерно на 75%, примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95% и/или примерно на 100%.

Настоящее изобретение также обеспечивает способы детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента у субъекта или в образце путем (i) контактирования субъекта или биологического образца с активируемым антителом, где активируемое антитело включает детектируемую метку, которая расположена в участке активируемого антитела, который высвобождается после расщепления СМ; и (ii) измерение уровня детектируемой метки у субъекта или в биологическом образце, где детектируемый уровень детектируемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент отсутствует и/или недостаточно присутствует у субъекта или в биологическом образце на детектируемом уровне, так что расщепление протеазой активируемого антитела не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и где пониженный детектируемый уровень детектируемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент присутствует у субъекта или в биологическом образце. Пониженным уровнем детектируемой метки является, например, снижение примерно на 5%, примерно на 10%, примерно на 15%, примерно на 20%, примерно на 25%, примерно на 30%, примерно на 35%, примерно на 40%, примерно на 45%, примерно на 50%, примерно на 55%, примерно на 60%, примерно на 65%, примерно на 70%, примерно на 75%, примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95% и/или примерно на 100%. Такое активируемое антитело включает маскирующий фрагмент (ММ), расщепляемый фрагмент (СМ), который расщепляется расщепляющим агентом, и антигенсвязывающий участок или его фрагмент (АВ), который специфически связывается с мишенью, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е. неактивированном) состоянии имеет следующую структурную организацию от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) где ММ представляет пептид, который ингибирует связывание АВ с мишенью и где ММ не имеет аминокислотной последовательности природного партнера по связыванию с АВ; и (б) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии препятствует специфическому связыванию АВ с мишенью и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е. активированном) состоянии не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления

активируемое антитело является активируемым антителом, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка расположена в АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет антитело, содержащее детектируемую метку.

Настоящее изобретение также обеспечивает наборы для применения в способах детектирования присутствия или отсутствия расщепляющего агента, представляющего интерес, у субъекта или в образце, где наборы включают, по меньшей мере, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанные здесь, для применения при контактировании субъекта или биологического образца и средства для определения уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где активируемое антитело включает детектируемую метку, которая расположена в участке активируемого антитела, который высвобождается после расщепления СМ, где детектируемый уровень детектируемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент, мишень или оба расщепляющий агент и мишень отсутствуют и/или недостаточно присутствуют у субъекта или в биологическом образце, так что связывание с мишенью и/или расщепление протеазой активируемого антитела не может быть обнаружено у субъекта или в биологическом образце, и где пониженный детектируемый уровень детектируемой метки у субъекта или в биологическом образце указывает, что расщепляющий агент и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Пониженным уровнем детектируемой метки является, например, снижение примерно на 5%, примерно на 10%, примерно на 15%, примерно на 20%, примерно на 25%, примерно на 30%, примерно на 35%, примерно на 40%, примерно на 45%, примерно на 50%, примерно на 55%, примерно на 60%, примерно на 65%, примерно на 70%, примерно на 75%, примерно на 80%, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95% и/или примерно на 100%.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело включает детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов детектируемая метка включает визуализирующий агент, контрастный агент, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или несколько ионов металлов или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов визуализирующий агент включает радиоизотоп. В некоторых вариантах осуществления этих методов и наборов радиоизотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов контрастный агент включает йод, гадолиний или оксид железа. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов фермент включает пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу или β -галактозидазу. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов флуоресцентная метка включает желтый флуоресцентный белок (YFP), циановый флуоресцентный белок (CFP), зеленый флуоресцентный белок (GFP), модифицированный красный флуоресцентный белок (mRFP), красный димерный флуоресцентный белок (RFP dimer2), HCREG или производное европия. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов люминесцентная метка включает производное N-метилакридия. В некоторых вариантах осуществления этих способов метка включает Alexa Fluor®, такой как Alex Fluor® 680 или Alexa Fluor® 750. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов метка на основе лиганда включает биотин, авидин, стрептавидин или один или несколько гаптеннов.

В некоторых вариантах осуществления этих методов и наборов субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления этих методов и наборов субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека, такое как примат, отличный от человека, домашнее животное (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или зоопарковое животное. В некоторых вариантах осуществления субъект является грызуном.

В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ является способом *in situ*. В некоторых вариантах осуществления этих способов этот способ представляет собой способ *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* и/или визуализация *in vivo* пригодна в способах идентификации пациентов, которые подлежат лечению. Например, при визуализации *in situ* активируемые антитела используются для скрининга образцов пациентов, чтобы идентифицировать пациентов, имеющих подходящую протеазу(ы) и мишень(и), в соответствующем месте, например в участке опухоли.

В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* используется для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активированным антителом по настоящему раскрытию. Например, пациенты, которые дают при тестировании положительный результат одно-

временно на мишень (например, мишень) и на протеазу, которая расщепляет субстрат в расщепляемом фрагменте (СМ) активируемого антитела, которое тестируется (например, накапливают активированные антитела в месте заболевания), идентифицируются в качестве подходящих кандидатов для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой СМ. Аналогично пациенты, которые дают при тестировании отрицательный результат на одно или оба из мишени (например, мишени) и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ в активируемом антителе, которое тестируется с использованием этих способов, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другого вида терапии. В некоторых вариантах осуществления такие пациенты, которые при тестировании дают отрицательный результат по отношению к первому активируемому антителу, могут быть тестированы с другими активируемыми антителами, содержащими различные СМ, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, который расщепляется пациентом в месте заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела, на которое пациент дал положительный результат.

В некоторых вариантах осуществления визуализация *in vivo* используется для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активируемым антителом по настоящему изобретению. Например, пациенты, которые дают положительный результат одновременно на мишень (например, мишень) и на протеазу, которая расщепляет субстрат в расщепляемом фрагменте (СМ) активируемого антитела, которое тестируется (например, накапливают активированные антитела в участке заболевания), идентифицируются в качестве подходящих кандидатов для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой СМ. Аналогично пациенты, которые дают отрицательный результат, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другого вида терапии. В некоторых вариантах осуществления такие пациенты, которые при тестировании дают отрицательный результат по отношению к первому активируемому антителу, могут быть тестированы с другими активируемыми антителами, содержащими различные СМ, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, который расщепляется пациентом в месте заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела, на которое пациент дал положительный результат.

В некоторых вариантах осуществления способов и наборов, способ или набор используют для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активируемым антителом по настоящему изобретению. Например, пациенты, которые дают при тестировании положительный результат одновременно на мишень (например, мишень) и на протеазу, которая расщепляет субстрат в расщепляемом фрагменте (СМ) активируемого антитела, которое тестируется в данных способах, идентифицируются в качестве подходящих кандидатов для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой СМ. Аналогично пациенты, которые дают при тестировании отрицательный результат одновременно на мишени (например, мишень) и протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ в активируемом антителе, которое тестируется с использованием этих способов, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другого вида терапии. В некоторых вариантах осуществления такие пациенты могут быть тестированы с другими активируемыми антителами до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, который расщепляется пациентом в месте заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенты, которые при тестировании дают отрицательный результат на любую мишень (например, мишень), идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой СМ. В некоторых вариантах осуществления пациенты, которые при тестировании дают отрицательный результат на любую мишень (например, мишень), идентифицируются как неподходящие кандидаты для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой СМ. В некоторых вариантах осуществления такие пациенты могут быть тестированы с другими активируемыми антителами до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, которое расщепляется пациентом в месте заболевания). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является активируемым антителом, с которым конъюгирован терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка расположена в АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляется с использованием вторичного реагента, который специфически связывается с активированным антителом, где реагент содержит детектируемую метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее детектируемую метку.

В некоторых вариантах осуществления способ или набор применяют для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активируемым антителом и/или конъюгированным активируемым антителом к мишени (например, активируемым антителом, с которым конъюгирован терапевтический агент) по настоящему изобретению, с последующим лечением введением этого

активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела субъекту, нуждающемуся в этом. Например, пациенты, которые при тестировании дают положительный результат одновременно на мишени (например, мишень) и на протеазу, которая расщепляет субстрат в расщепляемом фрагменте (СМ) активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, которое тестируется в данных способах, идентифицируются как подходящие кандидаты для лечения таким антителом и/или таким конъюгированным активируемым антителом, содержащим такой СМ, и пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, которое было протестировано. Аналогично пациенты, которые при тестировании дают отрицательный результат на одно или оба мишени (например, мишень) и протеазу, которая расщепляет субстрат в СМ в активируемом антителе, которое тестируется с использованием этих способов, могут быть идентифицированы как подходящие кандидаты для другого вида терапии. В некоторых вариантах осуществления такие пациенты могут быть протестированы с другим антителом и/или конъюгированным активируемым антителом до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее антитело и/или конъюгированное активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, содержащее СМ, который расщепляется пациентом в месте заболелания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, на которое пациент дал положительный результат.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов ММ представляет пептид, имеющий длину от примерно 4 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело содержит линкерный пептид, где линкерный пептид располагается между ММ и СМ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело содержит линкерный пептид, где линкерный пептид располагается между АВ и СМ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело содержит первый линкерный пептид (L1) и второй линкерный пептид (L2), где первый линкерный пептид расположен между ММ и СМ и второй линкерный пептид расположен между АВ и СМ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов каждый из L1 и L2 представляет пептид длиной от 1 до 20 аминокислот, и где каждый из L1 и L2 необязательно должен быть одним и тем же линкером. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов один или оба L1 и L2 содержат глицин-сериновый полимер. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из L1 и L2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 191) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 192), где n представляет целое число, по меньшей мере один. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из L1 и L2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую формулу (GGS)_n, где n представляет целое число, по меньшей мере один. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из L1 и L2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 193), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 194), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 195), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 196), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 197), and Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 198).

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов АВ включает антитело или фрагмент антитела, выбранные из последовательностей перекрестно реагирующих антител, представленных здесь. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов АВ включает Fab-фрагмент, scFv или одноцепочечное антитело (scAb).

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов расщепляющий агент представляет собой протеазу, которая локализуется совместно с мишенью у субъекта или в образце, и СМ представляет полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы, где протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергается воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ представляет полипептид длиной до 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления этих методов и наборов СМ связан с N-концом АВ. В некоторых вариантах осуществления этих методов и наборов СМ связан с C-концом АВ. В некоторых вариантах осуществления этих методов и наборов СМ связан с N-концом цепи VL АВ.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по настоящему изобретению применяются в диагностических и профилактических композициях. В одном варианте осуществления активируемое антитело вводят пациентам, которые подвержены риску развития одного или более из вышеуказанного воспаления, воспалительных заболеваний, рака или других расстройств.

Предрасположенность пациента или органа к одному или более из вышеуказанных расстройств может быть определена с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, конъюгированное антитело, активи-

руемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят человеку с диагнозом клинического симптома, связанного с одним или более из вышеуказанных расстройств. После постановки диагноза антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят для облегчения или отмены эффектов клинического расстройства.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по изобретению также пригодны для детектирования мишени в образцах пациентов, и соответственно они пригодны для применения в качестве диагностикомов. Например, антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и конъюгированные активируемые антитела по настоящему изобретению применяются в анализах *in vitro*, например ELISA, для определения уровней мишени в образце пациента.

В одном варианте осуществления антитело и/или активируемое антитело по изобретению иммобилизуют на твердой подложке (например, в лунке(ах) микротитрационного планшета). Иммобилизованное антитело и/или активируемое антитело служит в качестве захватывающего антитела для любой мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед контактированием иммобилизованного антитела и/или активируемого антитела с образцом пациента твердую подложку промывают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как молочный белок или альбумин, для предупреждения неспецифической адсорбции аналита.

Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, предположительно содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки крови от субъекта, с подозрением на наличие уровней циркулирующего антигена, которые считаются диагностическими для патологии. После отмывания тестируемого образца или стандарта твердый носитель обрабатывают вторым антителом, которое содержит детектируемую метку. Меченое второе антитело служит в качестве детектирующего антитела. Измеряют уровень детектируемой метки и определяют концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце сравнением со стандартной кривой, построенной по стандартным образцам.

Очевидно понятно, что на основе результатов, полученных с использованием антител и активируемых антител по настоящему изобретению в диагностическом анализе *in vitro*, можно определить стадию заболевания у субъекта, основываясь на уровнях экспрессии антигена-мишени. Для данного заболевания образцы крови отбирают от субъектов, диагностированных как находящиеся на разных стадиях прогрессирования заболевания, и/или на разных точках терапевтического лечения заболевания. Используя популяцию образцов, которая обеспечивает статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или лечения, составляют диапазон концентраций антигена, который можно считать характерным для каждой стадии.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела также можно использовать в диагностических и/или визуализирующих методах. В некоторых вариантах осуществления такие способы являются способами *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления такие способы являются способами *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такими способами являются способы *ex vivo*. Например, активируемые антитела, имеющие ферментативно расщепляемый СМ, могут быть использованы для детектирования присутствия или отсутствия фермента, который способен расщеплять СМ. Такие активируемые антитела могут использоваться в диагностике, которая может включать детектирование *in vivo* (например, качественно или количественно) активности фермента (или, в некоторых вариантах осуществления, среду с повышенным потенциалом восстановления, такую как среда, которая может обеспечить восстановление дисульфидной связи) посредством измеренного накопления активированных антител (т.е. антител, образующихся в результате расщепления активируемого антитела) в данной клетке или ткани данного организма-хозяина. Такое накопление активированных антител указывает не только на то, что ткань экспрессирует ферментативную активность (или повышенный потенциал восстановления в зависимости от природы СМ), но также и то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

Например, СМ можно выбрать в качестве субстрата для протеазы, обнаруженной в месте опухоли, в месте вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченном месте (например, таком как абсцесс, орган и т.п.) и тому подобное. АВ может представлять молекулу, которая связывается с антигеном-мишенью. Используя способы, известные специалисту в данной области, детектируемая метка (например, флуоресцентная метка, или радиоактивная метка, или радиоактивный индикатор) может быть конъюгирована с АВ или другой областью антитела и/или активируемого антитела. Подходящие детектируемые метки обсуждаются в контексте вышеуказанных методов скрининга, и ниже приводятся их дополнительные конкретные примеры. Используя АВ, специфичное к белку или пептиду, показателю болезненного состояния, вместе по меньшей мере с одной протеазой, активность которой повышена в интересующей большой ткани, активируемые антитела будут демонстрировать повышенную скорость связывания с большими тканями по сравнению с тканями, где отсутствует фермент на детектируемом уровне или присутствует на более низком уровне, чем в большой ткани заболевания, или неактивен (например, находится в виде зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку низкомолекулярные

белки и пептиды быстро выделяются из крови системой почечной фильтрации, и потому, что фермент, специфичный для СМ, отсутствует на детектируемом уровне (или присутствует на более низких уровнях в здоровых тканях или присутствует в неактивной конформации), то накопление активированных антител в больной ткани усиливается по сравнению со здоровыми тканями.

В еще одном примере активируемые антитела могут быть использованы для детектирования присутствия или отсутствия расщепляющегося агента в образце. Например, когда активируемые антитела содержат СМ, чувствительный к расщеплению ферментом, то активируемые антитела можно использовать для определения (качественно или количественно) присутствия фермента в образце. В еще одном примере, когда активируемые антитела содержат СМ, чувствительный к расщеплению восстанавливающим агентом, то активируемые антитела можно использовать для определения (качественно или количественно) наличия восстанавливающих условий в образце. Для облегчения анализа в этих способах активируемые антитела могут быть помечены детектируемой меткой и могут быть связаны с носителем (например, твердой подложкой, такой как стекло или шарик). Детектируемую метку можно расположить в области активируемого антитела, которая не высвобождается после расщепления, например детектируемая метка может представлять собой погашенную флуоресцентную метку или другую метку, которая не обнаруживается до тех пор, пока не произойдет расщепление. Анализ можно проводить, например, контактированием иммобилизованных, детектируемых меченых активируемых антител с образцом, предположительно содержащим фермент и/или восстанавливающий агент, в течение времени, достаточного для расщепления, затем промыванием для удаления избытка образца и загрязняющих веществ. Присутствие или отсутствие расщепляющегося агента (например, фермента или восстанавливающего агента) в образце затем оценивают по изменению детектируемого сигнала активируемых антител до контактирования с образцом, например по наличию и/или увеличению детектируемого сигнала за счет расщепления активируемого антитела под действием расщепляющегося агента в образце.

Такие способы детектирования также могут быть адаптированы для детектирования присутствия или отсутствия мишени, которая способна связываться с АВ активируемых антител при расщеплении. Таким образом, анализы могут быть адаптированы для оценки присутствия или отсутствия расщепляющегося агента и присутствия или отсутствия интересующей мишени. Присутствие или отсутствие расщепляющегося агента может быть обнаружено по наличию и/или увеличению детектируемой метки активируемых антител, как описано выше, и присутствие или отсутствие мишени может быть обнаружено по детектированию комплекса мишень-АВ, например с использованием детектируемого меченого антитела к мишени.

Активируемые антитела также применимы для визуализации *in situ* для подтверждения активации активируемого антитела, например по расщеплению протеазой и связыванию с конкретной мишенью. Визуализация *in situ* представляет метод, который позволяет определить локализацию протеолитической активности и мишени в биологических образцах, таких как клеточные культуры или срезы тканей. Используя эту методику, можно подтвердить связывание с данной мишенью и протеолитическую активность на основе присутствия детектируемой метки (например, флуоресцентной метки).

Данные способы пригодны для применения с любыми замороженными клетками или тканями, полученными из места заболевания (например, опухолевой ткани) или здоровых тканей. Такие способы также пригодны для свежих образцов клеток или тканей.

В данных способах активируемое антитело метят детектируемой меткой. Детектируемая метка может представлять собой флуоресцентный краситель (например, флуорофор, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), метку Alexa Fluor®), краситель, детектируемый в ближней инфракрасной области (NIR) (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и реагент для амплификации, такой как стрептавидин или фермент (например, пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза).

Детектирование метки в образце, который был инкубирован с меченым активируемым антителом, указывает на то, что образец содержит мишень и содержит протеазу, которая специфична для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие протеазы может быть подтверждено с использованием ингибиторов протеаз широкого спектра, таких как описанные здесь, и/или с использованием агента, специфичного для протеазы, например антитела, такого как All, которое специфично для протеазы матрипазы и ингибирует протеолитическую активность матрипазы; см., например, публикацию международной заявки WO 2010/129609, опубликованную 11 ноября 2010 г. Аналогичный подход с применением ингибиторов протеаз широкого спектра, таких как описанные здесь, и/или с использованием более селективного ингибирующего агента может быть использован для идентификации протеазы, которая является специфичной для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени может быть подтверждено с использованием агента, специфичного для мишени, например другого антитела, или детектируемая метка может конкурировать с немеченой мишенью. В некоторых вариантах осуществления может быть использовано немеченое активируемое антитело с детектированием меченым вторичным антителом или с использованием более сложной системы детектирования.

Подобные способы также пригодны для визуализации *in vivo*, где детектирование флуоресцентного сигнала у субъекта, например млекопитающего, включая человека, указывает, что больное место содержит мишень и содержит протеазу, которая специфична для СМ активируемого антитела.

Данные способы также пригодны в наборах и/или в качестве реагентов для детектирования, идентификации или характеристики протеазной активности в различных клетках, тканях и организмах на основе специфичного к протеазе СМ в активируемом антителе.

В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* и/или визуализация *in vivo* пригодна в способах идентификации пациентов, которые подлежат лечению. Например, при визуализации *in situ* активируемые антитела используются для скрининга образцов пациентов, чтобы идентифицировать пациентов, имеющих подходящую протеазу(ы) и мишень(и), в соответствующем месте, например в участке опухоли.

В некоторых вариантах осуществления визуализация *in situ* используется для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активируемым антителом по настоящему раскрытию. Например, пациенты, которые дают при тестировании положительный результат одновременно на мишень и на протеазу, которая расщепляет субстрат в расщепляемом фрагменте (СМ) активируемого антитела, которое тестируется (например, накапливают активированные антитела в месте заболевания), идентифицируются в качестве подходящих кандидатов для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой СМ. Аналогично пациенты, которые дают при тестировании отрицательный результат на одно или оба из мишени и протеазы, которая расщепляет субстрат в СМ в активируемом антителе, которое тестируется с использованием этих способов, идентифицируются как подходящие кандидаты для другого вида терапии (т.е. неподходящие для лечения активируемым антителом, которое тестируется). В некоторых вариантах осуществления такие пациенты, которые при тестировании дают отрицательный результат по отношению к первому активируемому антителу, могут быть протестированы с другими активируемыми антителами, содержащими различные СМ, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, который расщепляется пациентом в месте заболевания).

В некоторых вариантах осуществления визуализация *in vivo* используется для идентификации или иного уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения активируемым антителом по настоящему изобретению. Например, пациенты, которые дают положительный результат одновременно на мишень и на протеазу, которая расщепляет субстрат в расщепляемом фрагменте (СМ) активируемого антитела, которое тестируется (например, накапливают активированные антитела в месте заболевания), идентифицируются в качестве подходящих кандидатов для лечения таким активируемым антителом, содержащим такой СМ. Аналогично пациенты, которые дают отрицательный результат, идентифицируются как подходящие кандидаты для другого вида терапии (т.е. неподходящие для лечения активируемым антителом, которое тестируется). В некоторых вариантах осуществления такие пациенты, которые при тестировании дают отрицательный результат по отношению к первому активируемому антителу, могут быть протестированы с другими активируемыми антителами, содержащими различные СМ, до тех пор, пока не будет идентифицировано подходящее активируемое антитело для лечения (т.е. активируемое антитело, содержащее СМ, который расщепляется пациентом в месте заболевания).

Фармацевтические композиции

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по настоящему изобретению (также называемые здесь "активными соединениями") и их производные, фрагменты, аналоги и гомологи могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции обычно включают антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и фармацевтически приемлемый носитель. Как здесь используется, термин "фармацевтически приемлемый носитель" предназначен для включения любых и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических агентов и агентов, замедляющих всасывание, и т.п., совместимых с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартного справочного руководства в данной области, который включен здесь в качестве ссылки. Подходящие примеры таких носителей или разбавителей включают, не ограничиваясь этим, воду, физиологические растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Также могут использоваться липосомы и неводные носители, такие как нелетучие масла. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением того, когда любые обычные среды или агент несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению формулируется таким образом, чтобы быть совместимой с ее предполагаемым способом введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутрискожное, подкожное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (то есть местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрискожного или подкожного применения, могут включать сле-

дующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регуляции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH можно доводить кислотами или основаниями, такими как хлористоводородная кислота или гидроксид натрия. Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, пригодные для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (когда они растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления их *tempore* стерильных растворов или дисперсии для инъекций. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть текучей в той степени, чтобы ее можно было легко набрать в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна храниться без обсеменения микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель может служить растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. В некоторых вариантах осуществления будет желательно включить изотонические агенты, например сахара, полиспирты, такие как маннитол, сорбит, хлорид натрия в композиции. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто включением в состав агента, который задерживает абсорбцию, например моностеарат алюминия и желатин.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены включением активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или несколькими ингредиентами, перечисленными выше, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают включением активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способы получения представляют собой вакуумную сушку и лиофильную сушку, что дает порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из ранее стерильного фильтрованного раствора.

Композиции для перорального введения обычно включают инертный разбавитель или съедобный носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. Для целей перорального терапевтического введения активное соединение можно вводить с эксципиентами и использовать в форме таблеток, пастилок или капсул. Пероральные композиции также можно приготовить с использованием жидкого носителя для применения в виде жидкости для полоскания ротовой полости, где соединение в жидком носителе наносят орально и полощут рот, выплевывают или проглатывают. В состав композиции могут быть включены фармацевтически совместимые связывающие агенты и/или вспомогательные материалы. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и тому подобное могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений аналогичного характера: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза, дезинтегрирующий агент, такой как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; скользящее вещество, такое как коллоидный диоксид кремния; подслащивающий агент, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

Для ингаляционного введения соединения доставляются в виде аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или распылитель.

Системное введение также можно осуществлять с использованием трансмукозальных или трансдермальных средств. Для трансмукозального или чрескожного введения в композиции используют пенетранты, соответствующие проницаемому барьеру. Такие пенетранты обычно известны в данной области и включают, например для введения через слизистую оболочку детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Трансмукозальное введение может быть осуществлено с использованием назальных спреев или суппозитория. Для чрескожного введения активные соединения формулируют в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как это известно в данной области.

Соединения также могут быть формулированы в виде суппозитория (например, с обычными основами для суппозитория, такими как масло какао и другие глицериды) или удерживающих клизм для

ректальной доставки.

В одном варианте осуществления активные соединения формулируют с носителями, которые защищают соединение от быстрой элиминации из организма, такими как композиция с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут использоваться биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Специалистам в данной области техники будут очевидны способы получения таких составов. Материалы также могут быть получены коммерчески от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомные суспензии (включая липосомы, направленные к инфицированным клеткам с моноклональными антителами к вирусным антигенам) также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4522811.

Особенно преимущественно формулировать пероральные или парентеральные композиции в разовой лекарственной форме для удобства введения и однородности дозировки. Как здесь используется, разовая лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве разовых доз для субъекта, подлежащего лечению; где каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация для разовых лекарственных форм раскрывается и непосредственно зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и ограничений, имеющих в области формуляции такого активного соединения для лечения пациентов.

Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями для введения.

Изобретение будет дополнительно описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, представленного в формуле изобретения.

Примеры

Пример 1. Отбор вариантов осуществления человеческих scFvs, которые связываются с PDL1 человека и/или мыши.

В данном примере показано, что могут быть отобраны варианты осуществления scFvs (одноцепочечные переменные фрагменты), которые связываются с PDL1, из библиотеки фагового дисплея scFv с различными последовательностями CDR, и что такое связывание может ингибировать связывание PDL1 с PD1 и B7-1.

scFvs были отобраны из библиотеки полностью человеческих ScFv, экспонированной на бактериофаге M13; отбор фагов, несущих scFv, проводили по контракту с Creative Biolabs, Shirley, NY. Слитый белок, состоящий из внеклеточного домена (ECD) человеческого PDL1 или мышинового PDL1 с карбокси-концевой меткой His6 (Sino Biological, Cat. No. 10084-H02H-200) использовали в качестве антигена в трех чередующихся раундах отбора для scFvs, экспонированных на бактериофаге M13, которые связываются с PDL1. В первом раунде связанный фаг высвобождали расщеплением трипсином, и в последующих раундах фаг элюировали с помощью гибридного белка PD1 человека (R&D Systems, Cat. No. 1080-PD-050). Было выделено пять (5) уникальных scFvs, которые связываются с PDL1. В табл.1 приведены 5 scFvs и SEQ ID NO их соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислотных последовательностей.

Таблица 1. SEQ ID NO отобранных scFv

scFv	Последовательность нуклеиновой кислоты	Аминокислотная последовательность
PDL1 c8	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
PDL1 c12	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
PDL1 c16	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
PDL1 c20	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
PDL1 c60	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10

Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности каждого из scFvs к PDL1 (с подчеркнутыми CDR) показаны ниже.

SEQ ID NO: 1

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTCTCAGATATTACTGCGTGGGTTAGAGGACAACGTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
 TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
 ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGATCGAAGATTGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
 CACCGTCTCGAGCGGTGGAGGGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTTCGACGGACATC
 CAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG
 CAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCT
 GATCTATAAGGCATCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACA
 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCGTG
 CGCTTAAGCCTGTGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO: 2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDITASGQRTTYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSKIAFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD
 I QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYKASRLQSGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQRALKPVTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 3

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTATCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTCTCAAGTATTAATAAGGATGGTCATTATACAAGTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
 TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
 ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAATCTTGATGAGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
 CACCGTCTCGAGCGGTGGAGGGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTTCGACGGACATC
 CAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG
 CAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCT
 GATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACA
 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTT
 ACAGTACCCCTAATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO: 4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSSINKDGHYTSYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNLDEFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD
 I QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPNTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 5

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCATCTATTATGGCTACTGGTGTGGTACATTGTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGATGGTGCAGGGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTTCGACGGACATC
CAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG
CAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTCCT
GATCTATTCTGCATCCCAGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACA
GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGGCGA
ATTCGCGGCCCTTCTACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO: 6

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIMATGAGTLYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGAGFDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSTDI
QMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYSASQLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQANSRPSTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 7

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GTAGTGGGTCTCAACTATTACTTCTTCTGGTGTCTACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAATTATACTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTTCGACGGACATC
CAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG
CAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTCCT
GATCTATAATGCATCCTCCTTGC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACA
GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGTATA
CTTATGGTCTGTGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO: 8

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLQWVSTITSSGAATYYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNYTGFDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSTDI
QMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYNASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQYTYPGTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 9

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTG

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTCTCAAGTATTTATTCTACTGGTGGTGTACAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
 TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
 ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
 CACCGTCTCGAGCGGTGGAGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTTCGACGGACATC
 CAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG
 CAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCT
 GATCTATTATGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACA
 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGGATA
 ATGGTTATCCTTCTACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO: 10

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIYSTGGATAYADSVKGR
 FTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKSSAGFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSTDI
 QMTQSPSSLSASVGRVITICRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYYASTLQSGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGQGTKEVIKR

На фиг. 1 приведены результаты анализа связывания на основе ELISA, показывающие, что PDL1 с60 scFv-фаг связывается специфически с PDL1 человека и мыши. Вкратце, человеческий PDL1, мышинный PDL1, человеческий PD1, мышинный PD1, человеческие 41BBLig или Notchl (R&D Systems) адсорбировали в отдельных лунках 96-луночного планшета для постановки ELISA. Фаг вносили в лунки планшета и оставляли для связывания. Связанный фаг визуализировали с использованием конъюгата анти-M13-HRP (GE Healthcare, Piscataway, NY) и развивали с использованием хромогенного субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) (Thermo Scientific, Rockford, IL).

На фиг. 2 показано, что включение PD1 может ингибировать связывание PDL1 scFv-фага с PDL1 в анализе связывания на основе ELISA. Вкратце, человеческий PDL1 или мышинный PDL1 (R&D Systems) адсорбировали в отдельных лунках 96-луночного планшета для постановки ELISA. Фаг вносили в лунки планшета в присутствии и отсутствии человеческого и мышинного PD1-Fc (R&D Systems) и оставляли для связывания. Связанный фаг визуализировали с использованием конъюгата анти-M13-HRP (GE Healthcare, Piscataway, NY) и развивали с использованием хромогенного субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) (Thermo Scientific, Rockford, IL). Связывание фага снижалось в присутствии PD1-Fc, демонстрируя, что связывающий эпитоп фага перекрывается с таковым для связывания PD1.

Пример 2. Получение и тестирование полностью человеческих с60 IgG антител к PDL1.

В данном примере показано, что PDL1 с60 scFv-фаг, который связывается с PDL1 человека и мыши, может быть превращен в полностью человеческие IgG антитела, которые сохраняют способность связываться с PDL1 человека и мыши.

Получение полностью человеческих IgG, содержащих переменные области PDL1 с60, осуществляли с использованием методов, аналогичных способам, описанным в публикации международной заявки РСТ WO 2010/081173. Молекулы ДНК, кодирующие переменные области PDL1 с60 scFv-фага, клонировали в экспрессионные векторы для экспрессии полностью человеческих IgG. Переменные области легкой цепи (Lc) амплифицировали из матриц scFv. Вектор (LcpOP (модифицированный из pCDNA3, Invitrogen, Carlsbad, CA)) и амплифицированную ДНК расщепляли с использованием BsiWI и EcoRI в течение ночи, объединяли лигированием и трансформировали в клетки MC1061 E. coli. Переменные области тяжелой цепи (Hc) амплифицировали из матриц scFv. Полностью человеческие IgG анти-PDL1 с60 экспрессировали из транзистентно трансфицированных клеток HEK-293 и очищали из супернатанта культуры хроматографией на протеине А.

На фиг. 3 показано, что полностью человеческий анти-PDL1 с60 IgG связывается с PDL1 человека и мыши с аффинностью для PDL1 человека, равной 1 нМ, и для PDL1 мыши, равной 30 нМ. Вкратце, человеческий PDL1-Fc или мышинный PDL1-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN) адсорбировали в лунках 96-луночного планшета для постановки ELISA. Очищенный анти-PDL1 с60 вносили в лунки планшета и оставляли для связывания. Связанное антитело визуализировали с использованием античеловеческого конъюгата IgG-HRP, специфичного к Fab (Sigma, St. Louis, MO, Cat # A0293-1ML) и развивали с использованием хромогенного субстрата ТМБ.

Пример 3. Созревание аффинности вариантов осуществления анти-PDL1-антител.

В данном примере показано выделение вариантов осуществления антител с улучшенной кинетикой связывания и улучшенным профилем технологичности получения.

ность связываться с PDL1 мыши и человека, и результаты фагового ELISA показаны на фиг. 4А и В. Все клоны фага связываются с человеческим PDL1, но не с В7-1, кроме того, CDR2-клоны С05 и G12 демонстрируют сильное связывание с мышинным PDL1, и CDR3-клон Н9 показывал слабое связывание с мышинным PDL1. В табл.4 приведены переменные области тяжелой цепи, закодированные клонами, и SEQ ID NO для последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислотных последовательностей их соответствующих тяжелых цепей.

Переменные области легкой цепи для каждого из них идентичны доменам с60 (SEQ ID NO 11 и 12).

SEQ ID NO: 11

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAA
GCTCCTGATCTATTATGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACTACTGTCAAC
AGGATAATGGTTATCCTTCTACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO: 12

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYASTLQSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNGYPTFGQGTKVEIKR

Таблица 4

VH	Последовательность нуклеиновой кислоты	Аминокислотная последовательность
PDL1 c1	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
PDL1 d1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
PDL1 g7	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
PDL1 h9	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
PDL1 b10	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
PDL1 E10	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
PDL1 A05	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
PDL1 C05	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28
PDL1 C10	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30

PDL1 D08	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32
PDL1 G09	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34
PDL1 G10	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36
PDL1 G12	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38
PDL1 E11	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40
PDL1 D01	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42
PDL1 H06	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44

SEQ ID NO: 13

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTATTCTACTGGTGGTGTACAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTAGTCGGCCGGGTTTTGACTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 14

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIYSTGGATAYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSAGQSRPGFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 15

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTATTCTACTGGTGGTGTACAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTCGTGGCCGGGTTTTGACTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 16

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIYSTGGATAYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSAGQSWPGFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 17

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTATTCTACTGGTGGTGTACAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTCAGTCGTTTCCGGGTTTTGACTACTGGGG
CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 18

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIYSTGGATAYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSAGQSFPGFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 19

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTATTCTACTGGTGGTGTACAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATGGTCTGCTGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 20

EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIYSTGGATAYADSVKGR
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFQDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 21

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTATTCTACTGGTGGTGTACAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATGGTCTGCTGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 22

EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIYSTGGATAYADSVKGR
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAGYDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 23

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTATTCTACTGGTGGTGTACAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATGGTCTAAGGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 24

EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIYSTGGATAYADSVKGR
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSKGFQDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 25

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTGGAAGTAGGGTATTGTGACAGTGAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 26

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWKQGIVTVYDSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSAGFDYWGQGLVTV

SEQ ID NO: 27

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTGGCGGAATGGTATTGTTACAGTTAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGTTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 28

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYDSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSAGFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 29

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAGATATTTGGAAGTAGGGTATGGTTACAGTGAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGTTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 30

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDIWKQGMVTVYDSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSAGFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 31

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCATCGATTTGGAGGTAGGGTCTGGCGACAGCGAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGTTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 32

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRQLATAYDSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSAGFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 33

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAGAGATTGTGGCTACTGGTATTTTGACAAGTAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 34

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSEIVATGILTSYDSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSAGFDYWQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 35

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCATCGATTGGTCGGTAGGGTTTGATTACAGTTAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 36

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIGRQLITVYDSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSAGFDYWQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 37

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCATCTATTTGGTATTAGGGTCTGGTGACAGTTAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 38

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWYQGLTVYDSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSAGFDYWQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 39

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAGATATTTGGAAGTAGGGTTTTGCTACAGCGAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDIWKQGFATADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSSAGFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 41

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTGGAAGTAGGGTATTGTGACAGTGAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 42

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWKQGI VTVYDSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSSAGFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 43

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCATCGATTTGGAGGTAGGGTCTGGCGACAGCGAGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGG
CCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTTCTGCTGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 44

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRQGLATAYDSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSSAGFDYWGQGLVTVSS

Пример 4. Выделение и тестирование вариантов осуществления аффинно зрелых анти-PDL1-антител.

В данном примере показано, что зрелый PDL1 Fab-фаг, который связывается с PDL1 человека и мыши, может быть превращен в полностью человеческие IgG-антитела, которые сохраняют связывание с человеческим PDL1 и показывают усиленное связывание с мышинным PDL1.

Получение полностью человеческих IgG, содержащих переменные области зрелых клонов, осуществляли с использованием способов, аналогичных способам, описанным в публикации международной заявки PCT WO 2010/081173. ДНК, кодирующую переменные области анти-PDL1 Fab-фаг клонов C1, D1, G7, C05, G12 и комбинации CDR3 переменных областей тяжелой цепи анти-PDL1 Fab-фаг клонов C05 или G12 с CDR2 переменной области легкой цепи анти-PDL1 Fab-фаг клонов B10, E10 или H9, клонировали в экспрессионные векторы для экспрессии полностью человеческих IgG. Переменные области легкой цепи для каждого из них идентичны доменам с60 (SEQ ID NO: 10). Переменные области легкой цепи (Lc) амплифицировали из Fab-матриц. Вектор (LcpOP (модифицированный из pCDNA3, Invitrogen, Carlsbad, CA)) и амплифицированную ДНК расщепляли с использованием BsiWI и EcoRI в течение ночи, объединяли лигированием и трансфектировали в клетки MC1061 E. coli. Переменные области тяжелой цепи (Hc) амплифицировали из Fab-матриц. Полностью человеческие IgG анти-PDL1-антитела экспрессировали из транзистентно трансфицированных клеток HEK-293 и выделяли из супернатанта культуры хроматографией на протеине А.

Аффинно зрелые анти-PDL1-антитела анализировали на их способность связываться с PDL1 человека и мыши. Вкратце, человеческий PDL1-Fc или мышинный PDL1-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN) адсорбировали в лунках 96-луночного планшета для постановки ELISA. Очищенные анти-PDL1-антитела вносили в лунки планшета и оставляли для связывания. Связанное антитело визуализировали античеловеческим конъюгатом IgG-HRP, специфичным к Fab (Sigma, St. Louis, MO, Cat # A0293-1ML), и развивали с использованием хромогенного субстрата ТМВ. На фиг. 5 показано, что объединение CDR3 зрелых переменных областей тяжелой цепи с CDR2 переменных областей тяжелой цепи приводит к получению антител с повышенной аффинностью к PDL1 человека. Кроме того, комбинация CDR2 зрелых переменных областей тяжелой цепи C05 с CDR3 переменных областей тяжелой цепи H9 приводит к получению антитела с высокой аффинностью к PDL1 человека и мыши. В табл. 5 представлены SEQ ID NO для последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислотных последовательностей соответствующих переменных областей тяжелых цепей.

Затем анти-PDL1-антитела C5H9, C5B10 и C5E10 характеризовали по их видовой специфичности в отношении связывания с PDL1 и другими родственными белками. Вкратце, человеческий PDL1-Fc, мышинный PDL1-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN) или PDL1-Fc обезьяны циномогус (цино) (Sino biological) адсорбировали в лунках 96-луночного планшета для постановки ELISA. Очищенные анти-PDL1-антитела вносили в лунки планшета и оставляли для связывания. Связанное антитело визуализировали античеловеческим конъюгатом IgG-HRP, специфичным к Fab (Sigma, St. Louis, MO, Cat # A0293-1ML), и развивали с использованием хромогенного субстрата ТМВ. На фиг. 6А и В показано, что C5H9 связывается с PDL1 человека и мыши почти с одинаковой аффинностью и C5B10 и C5E10 связываются только с PDL1 человека. Ни одно из тестируемых антител не связывалось с человеческим B7-1 (фиг. 6D) или с человеческим CD28 (фиг. 6C), двумя тесно связанными белками. На фиг. 7 показано, что анти-PDL1-антитело C5H9 связывается с высокой и равной аффинностью с PDL1 человека, мыши и обезьяны циномогус, но не с B7H3 человека (также относится здесь к B7-H3) (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Таблица 5. Варибельные области тяжелой цепи вариантов осуществления антител к PDL1

ВН	Последовательность нуклеиновой кислоты	Аминокислотная последовательность
PDL1 C5H9	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46
PDL1 C5B10	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48
PDL1 C5E10	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 50
PDL1 G12H9	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 52
PDL1 G12B10	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 54
PDL1 G12E10	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 56

SEQ ID NO: 45

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTGGCGGAATGGTATTGTTACAGTTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTA CTGTGCGAAATGGTCTGCTGCTTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 46

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFVYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 47

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTGGCGGAATGGTATTGTTACAGTTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATGGTCTGCTGGTTATGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGT
CACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 48

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGR
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAGYDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 49

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCAAGTATTTGGCGGAATGGTATTGTTACAGTTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATGGTCTAAGGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGT
CACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 50

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGR
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSKGFYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 51

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCATCTATTTGGTATCAGGGTCTGGTGACAGTTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATGGTCTGCTGCTTTTACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGT
CACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 52

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWIYQGLVTVYADSVKGR
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFYDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 53

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTCTCAAGTATTTGGCGGAATGGTATTGTTACAGTTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
 TTCACCATCTCCAGAGACAATTTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
 ACACGGCCGTATATTAAGTGTGCGAAATGGTCTGCTGGTTATGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
 CACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 54

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWYQGLVTVYADSVKGR
 FTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKWSAGYDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 55

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
 GGAGTGGGTCTCAAGTATTTGGCGGAATGGTATTGTTACAGTTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGG
 TTCACCATCTCCAGAGACAATTTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
 ACACGGCCGTATATTAAGTGTGCGAAATGGTCTAAGGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
 CACCGTCTCGAGC

SEQ ID NO: 56

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWYQGLVTVYADSVKGR
 FTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKWSKGFYWGQGLVTVSS

Пример 5. Модификации зародышевой линии в варибельной области легкой цепи анти-PDL1-антитела C5H9 повышают технологичность получения и снижают потенциальную иммуногенность.

В данном примере описан дополнительный вариант осуществления анти-PDL1-антитела, которое проявляет пониженную прогнозируемую иммуногенность, уменьшенную агрегацию и повышенную экспрессию.

В *in silico* прогнозе иммуногенности с использованием ProPred был обнаружен сильный потенциальный эпитоп в CDR2 варибельной области легкой цепи C5H9; анти-PDL1-антитело C5H9, также относится здесь к C5H9, включает легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 12, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46. Выравнивание варибельной области легкой цепи антитела C5H9 с антителами человеческой зародышевой линии выявило две аминокислоты в CDR2, которые при модификации в зародышевую линию, элиминировали прогнозируемый эпитоп. Остатки подчеркнуты и выделены жирным шрифтом в последовательности, показанной ниже в SEQ ID NO: 12.

Кроме того, каркасную область 4 легкой цепи антитела C5H9 модифицировали, как указано жирным курсивом в SEQ ID NO: 58, заменив глицин (G) на глутамин (Q) в J-области. Данная модификация была направлена на повышение гибкости соединения между варибельными и константными областями, что потенциально снижало тенденцию C5H9 к образованию агрегатов. Полученные последовательности ДНК и аминокислотные последовательности показаны в SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 58 соответственно. Полученное в результате анти-PDL1-антитело, также относится здесь анти-PDL1-антителу C5H9v2, также упоминаемое здесь как C5H9v2, включает легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 58, и тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO: 12

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYASTLQSGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGQGTKEIKR

SEQ ID NO: 57

GATATTGAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATACCT
 GCCGCGGAGCCAGAGCATTAGCAGCTATCTGAAGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAA
 ACTGCTGATTTATGCGGCGAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTCCGAGCCGCTTTAGCGGACGCGGCAGC
 GGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCAGCCTATTATTGCCAGC
 AGGATAACGGCTATCCGAGCACCTTTGGCGGCGGCACCAAAGTGGAAATTTAAACGC

SEQ ID NO: 58

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGKVEIKR

На фиг. 8А и В показано, что модификации зародышевой линии, описанные в SEQ ID NO: 58, снижают прогнозируемую иммуногенность (верхняя панель) и потенциал к агрегации и повышают уровень экспрессии в три раза.

Пример 6. Характеристика *in vitro* анти-PDL1-антител C5H9 и C5H9v2.

В данном примере показана специфичность связывания и биологическая активность анти-PDL1-антител по изобретению.

Получение полностью человеческих IgG, содержащих вариабельные области зрелых клонов, осуществляли с использованием способов, аналогичных способам, описанным в публикации международной заявки PCT WO 2010/081173. ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи анти-PDL1-антитела C5H9 (нуклеиновокислотная последовательность SEQ ID NO: 45, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 46), амплифицировали и клонировали в векторы для экспрессии полностью человеческих IgG. ДНК, кодирующую вариабельные области легкой цепи анти-PDL1-антитела C5H9 (нуклеиновокислотная последовательность SEQ ID NO: 11, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 12), амплифицировали и клонировали в векторы для экспрессии полностью человеческих IgG. Аналогично ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи анти-PDL1-антитела C5H9 (нуклеиновокислотная последовательность SEQ ID NO: 45, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 46), амплифицировали и клонировали в векторы для экспрессии химерных мышиных IgG2a. ДНК, кодирующую вариабельные области легкой цепи анти-PDL1-антитела C5H9v2 (нуклеиновокислотная последовательность SEQ ID NO: 57, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 58), амплифицировали и клонировали в векторы для экспрессии химерных мышиных IgG2a. Полностью человеческие IgG или химерные мышиные IgG2a антитела к PDL1 экспрессировали из транзientно трансфектированных клеток HEK-293 и выделяли из супернатанта культуры хроматографией на протеине А. IgG анти-PDL1-антитело C5H9 включает тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 46, и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 12. IgG анти-PDL1-антитело C5H9v2 включает тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 46, и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 58.

Анти-PDL1-антитело C5H9v2 характеризовали на видоспецифическое связывание с PDL1, и насколько данное антитело будет связываться с панелью человеческих белков. Вкратце, человеческий PDL1-Fc, мышиный PDL1-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN) или PDL1-Fc обезьяны циномоглус (цино) (Sino biological) адсорбировали в лунках 96-луночного планшета для постановки ELISA. Очищенные анти-PDL1-антитела C5H9 и C5H9v2 вносили в лунки планшета и оставляли для связывания. Связанное антитело визуализировали античеловеческим конъюгатом IgG-HRP, специфичным к Fab (Sigma, St Louis, MO, Cat # A0293-1ML) и развивали с использованием хромогенного субстрата ТМВ. На фиг. 9 показано, что оба анти-PDL1-антитела C5H9 и C5H9v2 связываются с человеческим, мышиным PDL1 и PDL1 обезьяны циномоглус почти с одинаковой аффинностью. Значения EC₅₀ для анти-PDL1-антитела C5H9v2 к человеческому PDL1, PDL1 обезьяны циномоглус, крысиному и мышиному PDL1 также имели практически одинаковые значения: 0,25 нМ, 0,28 нМ, 0,31 нМ и 0,30 нМ соответственно.

В аналогичном эксперименте анти-PDL1-антитело C5H9 оценивали на связывание с панелью человеческих и мышиных белков. Вкратце, каждый белок, представленный на фиг. 10, абсорбировали в лунках планшета для постановки ELISA. Очищенные анти-PDL1-антитела C5H9 и C5H9v2 вносили в лунки планшета и оставляли для связывания. Связанное антитело визуализировали античеловеческим конъюгатом IgG-HRP, специфичным к Fab (Sigma, St Louis, MO, Cat # A0293-1ML), и развивали с использованием хромогенного субстрата ТМВ. Анти-PDL1-антитело C5H9v2 связывается только с PDL1 человека и

мыши, демонстрируя специфичность к PDL1.

Биологическая активность PDL1 опосредуется посредством связывания с PD1 и/или с B7-1. Блокирование связывания является желательной характеристикой для терапевтического антитела; следовательно, оценивали эффективность блокирования взаимодействия PDL1 с PD1 и B7-1. Вкратце, человеческий, мышинный PDL1 или PDL1 обезьяны циномогус адсорбировали в лунках планшета для постановки ELISA. Биотинилированный PDL1 человека, мыши или обезьяны циномогус или B7-1 вносили в лунки в отсутствие или в присутствии возрастающей концентрации анти-PDL1-антитела C5H9 или анти-PDL1-антитела C5H9v2 и оставляли для связывания. Связанный биотинилированный PD1 или B7-1 визуализировали конъюгатом стрептавидин-HRP (Thermo Scientific, Cat. No. 21126) и развивали с использованием хромогенного субстрата TMB. На фиг. 11 показано, что оба анти-PDL1-антитела C5H9 и анти-PDL1-антитело C5H9v2 являются сильными блокаторами связывания B7-1 или PD1 с PDL1 и что блокирование включает все три вида PDL1 человека, обезьяны циномогус и мыши с одинаковыми значениями EC₅₀ на уровне нМ.

Пример 7. Анти-PDL1-антитело по изобретению ускоряет индукцию диабета у мышей NOD.

В данном примере анти-PDL1-антитело C5H9 анализировали на способность индуцировать диабет у мышей NOD.

Мышей NOD, подвид NOD/ShiLtJ, получали из питомника Jackson Laboratory в возрасте 6 недель и акклиматизировали на месте в течение 1 недели. Через 7 недель мышей проверяли на наличие диабета до включения в исследование, разделения на группы и дозирования, как показано в табл.6.

Таблица 6. Группы и дозы в опыте на мышах NOD

Группа	Количество мышей	Вид обработки	Доза (мг/кг) нагрузка/регулярная	Объемная доза (мл/кг)	Схема	Путь введения
1	6	контроль	20/10	10	q2dx6	в/б
2	6	анти-PDL1-антитело (C5H9)	20/10	10	q2dx6	в/б
3	6	анти-PDL1-антитело (10F9G2)	20/10	10	q2dx6	в/б

На фиг. 12, где представлены графики зависимости % мышей без диабета против количества суток после введения начальной дозы, показано, что анти-PDL1-антитело C5H9 (Gr2-C5H9) индуцирует диабет у мышей NOD, аналогично анти-PDL1-антителу 10F9G2, которое использовали в качестве положительного контроля. Контрольный крысиный IgG2b не вызывал диабета у мышей NOD.

Анти-PDL1-антитело C5H9v2 также тестировали на способность индуцировать диабет у мышей NOD дозозависимым образом с использованием метода, аналогичного описанному выше, на 9-недельных животных с использованием групп и доз, указанных в табл.7.

Таблица 7. Группы и дозы в дозозависимом опыте на мышах NOD

Группа	Количество мышей	Пол	Вид обработки	Доза (мг/кг)	Объемная доза (мл/кг)	Схема	Путь введения
1	8	самки	mIgG2a (C1.18.4)	25	10	Однократная доза	в/б
2	8	самки	анти-PDL1-антитело (C5H9v2)	25	10	Однократная доза	в/б
3	8	самки	анти-PDL1-антитело (C5H9v2)	5	10	Однократная доза	в/б
4	8	самки	анти-PDL1-антитело (C5H9v2)	1	10	Однократная доза	в/б
5	8	самки	анти-PDL1-антитело (C5H9v2)	0,2	10	Однократная доза	в/б

На фиг. 13, где представлены графики зависимости % мышей без диабета против количества суток после введения начальной дозы, показано, что анти-PDL1-антитело C5H9v2 индуцирует диабет у мышей NOD в зависимости от дозы.

Пример 8. Варианты осуществления анти-PDL1-антитела подавляют рост опухолей MC38 у мышей.

В данном примере анти-PDL1-антитело C5H9v2 анализировали на способность подавлять рост сингенных опухолей MC38.

Клеточную линию мышинной карциномы ободочной кишки MC38 получали из ATCC (Американская коллекция типовых культур, Manassas, VA). Клетки MC38 выращивали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в воздухе. Клетки собирали во время логарифмической фазы роста, ресуспендировали в PBS и хранили на льду для индукции опухолей.

Каждой мышке прививали подкожно на правом боку 1×10⁶ клеток MC38 в PBS для роста опухолей. Обработки начинали, когда средний размер опухолей достигал примерно 100-200 мм³ (не более 200 мм³). Размеры опухолей определяли два раза в неделю в двух измерениях с помощью штангенциркуля, и объем выражали в мм³, используя формулу: V=0,5 a×b², где a и b - длинный и короткий диаметры опухоли соответственно.

Мышей разделяли на группы и вводили антитела, как указано в табл.8.

Таблица 8. Группы и дозы для опыта с сингенными опухолями MC38

Группа	Количество во мышей	Вид обработки	Доза (мг/кг)	Объемная доза (мл/кг)	Схема	Путь введения
1	10	анти-PDL1-антитело (10F9G2)	10	10	t.i.w. в течение 2 недель (MWF)	в/б
2	10	анти-PDL1-антитело (C5H9v2)	10	10	t.i.w. в течение 2 недель (MWF)	в/б
3	10	mIgG2a+lIgG1 хомяка	10	10	t.i.w. в течение 2 недель (MWF)	в/б

На фиг. 14, где представлены графики зависимости объема опухолей против количества суток после введения первоначальной дозы, показано, что анти-PDL1-антитело C5H9v2 ингибирует рост сингенных опухолей MC38, аналогично анти-PDL1-антителу 10F9G2, которое использовали в качестве положительного контроля.

Пример 9. Маскирующие фрагменты активируемого анти-PDL1-антитела C5H9v2.

В данном примере описана идентификация маскирующих фрагментов (MM) для снижения связывания активируемых анти-PDL1-антител C5H9v2 с их мишенью.

Анти-PDL1-антитело C5H9v2 и Fab использовали для скрининга библиотек с применением способа, аналогичного описанному в публикации международной заявки PCT WO 2010/081173, опубликованной 15 июля 2010 г. Скрининг состоял из одного раунда MACS и трех раундов сортировки FACS. Начальный MACS проводили, используя магнитные частицы Dynabeads с протеином A (Invitrogen) и анти-PDL1-антителом C5H9v2 в концентрации 100 нМ. Для MACS примерно 1×10¹¹ клеток подвергали скринингу на связывание и собирали 6×10⁶ клеток. Анти-PDL1-антитела C5H9v2, непосредственно меченные AlexaFluor-488, использовали в качестве зонда для всех вариантов FACS. В первом раунде FACS клетки метили 100 нМ AlexaFluor-анти-PDL1-антитела C5H9v2. Во втором раунде FACS клетки метили 10 нМ AlexaFluor-анти-PDL1-антитела C5H9v2. В третьем раунде FACS, клетки метили 1 нМ AlexaFluor-анти-PDL1-антитела C5H9v2. Было подтверждено, что положительная популяция из третьего раунда FACS ингибируется рекомбинантным белком PDL1 человека в отношении связывания с анти-PDL1-антителом C5H9v2 и Fab. Индивидуальные пептидные клоны идентифицировали анализом последовательности и затем проверяли на их способность связываться с анти-PDL1-антителом C5H9v2 и Fab.

Последовательности маскирующих фрагментов анти-PDL1-антитела C5H9v2 приведены в табл.9.

Таблица 9. Маскирующие фрагменты (ММ) анти-PDL1-антитела C5H9v2

ММ	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
PL01	YCEVSESELFVLPWCMG	SEQ ID NO: 208
PL02	SCLMHPHYANDYCYV	SEQ ID NO: 426
PL03	LCEVLMLLQHPWCMG	SEQ ID NO: 59
PL04	IACRHFMEQLPFCCHH	SEQ ID NO: 60
PL05	FGPRCGEASTCVPYE	SEQ ID NO: 61
PL06	ILYCDSWGAGCLTRP	SEQ ID NO: 62
PL07	GIALCPSHFCQLPQT	SEQ ID NO: 63
PL08	DGPRCFVSGECS PIG	SEQ ID NO: 64
PL09	LCYKLDYDDRSYCHI	SEQ ID NO: 65
PL10	PCHPHPYDARPYCNV	SEQ ID NO: 66
PL11	PCYWHPPFFAYRYCNT	SEQ ID NO: 67
PL12	VCYYMDWLGRNWCSS	SEQ ID NO: 68
PL13	LCDLFKLREFPYCMG	SEQ ID NO: 69
PL14	YLPCHFVPIGACNNK	SEQ ID NO: 70
PL15	IFCHMGWVPQCANY	SEQ ID NO: 71
PL16	ACHPHPYDARPYCNV	SEQ ID NO: 72
PL17	PCHPAPYDARPYCNV	SEQ ID NO: 73
PL18	PCHPHAYDARPYCNV	SEQ ID NO: 74
PL19	PCHPHPADARPYCNV	SEQ ID NO: 75
PL20	PCHPHPYAARPYCNV	SEQ ID NO: 76
PL21	PCHPHPYDAAPYCNV	SEQ ID NO: 77
PL22	PCHPHPYDARPAACNV	SEQ ID NO: 78
PL23	PCHPHPYDARPYCAV	SEQ ID NO: 79
PL24	PCHANPYDARPYCNV	SEQ ID NO: 80
PL25	PCHPHPYDARAYCNV	SEQ ID NO: 81

Пример 10. Активируемые антитела, включающие анти-PDL1-антитело C5H9v2.

В данном примере описаны примеры активируемых антител по изобретению, включающие анти-PDL1-антитело C5H9v2.

Активируемые анти-PDL1-антитела, включающие маскирующий фрагмент анти-PDL1-антитела, отщепляемый фрагмент, и анти-PDL1-антитело C5H9v2, получали способами, аналогичными способом, описанным в публикациях международных заявок PCT WO 2009/025846 и WO 2010/081173. Контроль качества полученных активируемых антител показал, что большинство из них содержит по меньшей мере 95% мономера. Ниже приведены аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот нескольких активируемых антител, включающих анти-PDL1-антитело C5H9v2. Каждое активируемое антитело включает анти-PDL1-антитело C5H9v2, имеющее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, показанную в SEQ ID NO: 46, и аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, показанных в SEQ ID NO: 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, 155, 157, 931, 933, 935, 937, 939, 941, 943, 945, 947, 949, 951, 953, 959, 961, 963, 965, 967, 969, 971, 973, 975, 977, 979, 981, 983, 985, 987, 989, 991, 993, 995, 997, 999, 1001, 1003, 1005, 1144-1191, 1200 и 1201 и приведенных ниже.

Несмотря на то, что последовательности, показанные ниже, включают спейсерную последователь-

ность SEQ ID NO: 923, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что активируемые анти-PDL1-антитела по изобретению могут включать любую подходящую спейсерную последовательность, например, такую как спейсерная последовательность, выбранная из группы, состоящей из QGQSGS (SEQ ID NO: 923); GQSGS (SEQ ID NO: 1192); QSGS (SEQ ID NO: 1193); SGS (SEQ ID NO: 1194); GS (SEQ ID NO: 1195); S; QGQSGQG (SEQ ID NO: 924); GQSGQG (SEQ ID NO: 395); QSGQG (SEQ ID NO: 925); SGQG (SEQ ID NO: 926); GQG (SEQ ID NO: 927); QG (SEQ ID NO: 928); G; QGQSGQ (SEQ ID NO: 1196); GQSGQ (SEQ ID NO: 1197); QSGQ (SEQ ID NO: 1198); SGQ (SEQ ID NO: 616); GQ (SEQ ID NO: 1199); Q. Несмотря на то, что последовательности, показанные ниже, включают спейсерную последовательность SEQ ID NO: 923, специалисты в данной области техники также должны понимать, что активируемые анти-PDL1-антитела по изобретению в некоторых вариантах осуществления не включают спейсерную последовательность.

Аминокислотная последовательность VH C5H9v2.

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFQYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 46)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL01-0003 LC (SEQ ID NO: 930)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [TATTGCGAGGTTAGTGAGCTGTTTGTCTTCTTGGTGCATGGGTG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTCCGCTAACCC
ACGTGGCGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCCGCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 82)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL01-0003 LC (SEQ ID NO: 931)]

[QGQSGS] [YCEVSELFVLPWCMGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVTTICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 83)

Нуклеотидная последовательность PL01-0003 LC

TATTGCGAGGTTAGTGAGCTGTTTGTTCCTTGGTGCATGGGTGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
 CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAACCTGC
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 930)

Аминокислотная последовательность PL01-0003 LC

YCEVSELFVLPWCMGGGSSGGSSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR
 ASQSISSYLWYQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
 NYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 931)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL02-0003 LC (SEQ ID NO: 932)]
 [CAAGGTCACTCTGGATCC] [TCTTGCSTTATGCATCCGCATTATGCTCATGATTATTGCTATGTTG
 GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
 ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
 AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
 CCGCAAGGCCCCCAAACCTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
 TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC
 ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
 AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT
 T] (SEQ ID NO: 84)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL02-0003 LC (SEQ ID NO: 933)]
 [QGQSGS] [SCLMHPHYAHDYCYVGGGSSGGSSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVTITCRASQSISSYLWYQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 85)

Нуклеотидная последовательность PL02-0003 LC

TCTTGCSTTATGCATCCGCATTATGCTCATGATTATTGCTATGTTGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
 CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAACCTGC
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 932)

Аминокислотная последовательность PL02-0003 LC

SCLMHPHYAHDYCYVGGGSSGGSSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR
 ASQSISSYLWYQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
 NYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 933)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL03-0003 LC (SEQ ID NO: 934)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [TTGTGCGAGGTTTTGATGTTGTTGCAGCATCCGTGGTGCATGGGGG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 86)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL03-0003 LC (SEQ ID NO: 935)]

[QQQSGS] [LCEVLMLLQHPWCMGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 87)

Нуклеотидная последовательность PL03-0003 LC

TTGTGCGAGGTTTTGATGTTGTTGCAGCATCCGTGGTGCATGGGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCAAACTGC
TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
AACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 934)

Аминокислотная последовательность PL03-0003 LC

LCEVLMLLQHPWCMGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 935)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL04-0003 LC (SEQ ID NO: 936)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [ATTGCGTGCCGGCATTATGGAGCAGTTGCCGTTTTGCCATCATG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 88)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL04-0003 LC (SEQ ID NO: 937)]

[QGQSGS] [IACRHFMEQLPFC HHGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 89)

Нуклеотидная последовательность PL04-0003 LC

ATTGCGTGCCGGCATTATGAGCAGTTGCCGTTTCCCATCATGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
GCCAGCCAGAGCATCAGCAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGCCCCAAACTGC
TGATCTACGCCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
AACGGCTACCCAGCACCTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 936)

Аминокислотная последовательность PL04-0003 LC

IACRHFMEQLPFC HHGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCR
ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 937)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL05-0003 LC (SEQ ID NO: 938)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [TTTGGTCTAGGTGCGGTGAGGCTTCTACTTGCCTTCCGTATGAGG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 90)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL05-0003 LC (SEQ ID NO: 939)]

[QGQSGS] [FGPRCGEASTCVPYEGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 91)

Нуклеотидная последовательность PL05-0003 LC

TTTGGTCTAGGTGCGGTGAGGCTTCTACTTGCGTTCCGTATGAGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCACGTGGCGGCGGTCTGACAT
 CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCAAACTGC
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 938)

Аминокислотная последовательность PL05-0003 LC

FGPRCGEASTCVPYEGGGSSGSGSGSGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR
 ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
 NYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 939)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL06-0003 LC (SEQ ID NO: 940)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [ATTCTTTATTGCGATAGTTGGGGGCGGGGTGCTTGACGCGGCCGG
 GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACC
 ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
 AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
 CCGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
 TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCC
 ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
 AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
 T] (SEQ ID NO: 92)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL06-0003 LC (SEQ ID NO: 941)]

[QQQSGS] [ILYCDSWGAGCLTRPGGSSGSGSGSGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 93)

Нуклеотидная последовательность PL06-0003 LC

ATTCTTTATTGCGATAGTTGGGGGCGGGGTGCTTGACGCGGCCGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCACGTGGCGGCGGTCTGACAT
 CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCAAACTGC
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 940)

Аминокислотная последовательность PL06-0003 LC

I LYCDSWGAGCLTRPGGGSSGGSGGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCR
 ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOD
 NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 941)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL07-0003 LC (SEQ ID NO: 942)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GGGATTGCGTTGTGCCCGTCTCATTTTTGCCAGCTGCCTCAGACTG
 GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
 ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
 AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
 CCGGCAAGGCCCCCAAAGTCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
 TTCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC
 ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCA
 AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
 T] (SEQ ID NO: 94)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-0003 LC (SEQ ID NO: 943)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 FATYYCQODNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 95)

Нуклеотидная последовательность PL07-0003 LC

GGGATTGCGTTGTGCCCGTCTCATTTTTGCCAGCTGCCTCAGACTGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
 CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAAGTCTG
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 942)

Аминокислотная последовательность PL07-0003 LC

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCR
 ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOD
 NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 943)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL08-0003 LC (SEQ ID NO: 944)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GATGGGCCGCGTTGCTTTGTGTCGGGGGAGTGCTCTCCGATTGGTG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCCAAAGTCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 96)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL08-0003 LC (SEQ ID NO: 945)]

[QGQSGS] [DGPRCFVSGECSPIGGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 97)

Нуклеотидная последовательность PL08-0003 LC

GATGGGCCGCGTTGCTTTGTGTCGGGGGAGTGCTCTCCGATTGGTGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAAGTCTG
TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
AACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 944)

Аминокислотная последовательность PL08-0003 LC

DGPRCFVSGECSPIGGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 945)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL09-0003 LC (SEQ ID NO: 946)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [TTGTGCTATAAGCTGGATTATGATGATAGGTCTTATTGCCATATTG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCCAAAGTCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 98)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL09-0003 LC (SEQ ID NO: 947)]

[QGQSGS] [LCYKLDYDDRSYCHIGGGSSGGSSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 99)

Нуклеотидная последовательность PL09-0003 LC

TTGTGCTATAAGCTGGATTATGATGATAGGTCTTATTGCCATATTGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCAAACTGC
TGATCTACGCCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
AACGGTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 946)

Аминокислотная последовательность PL09-0003 LC

LCYKLDYDDRSYCHIGGGSSGGSSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 947)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL10-0003 LC (SEQ ID NO: 948)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [CCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTCGTCCTTATTGCAATGTGG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 100)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL10-0003 LC (SEQ ID NO: 949)]

[QGQSGS] [PCHPHPYDARPYCNVGGGSSGGSSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 101)

Нуклеотидная последовательность PL10-0003 LC

CCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTCGTCCTTATTGCAATGTGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
 CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAACCTGC
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGCTACCCAGCACSTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 948)

Аминокислотная последовательность PL10-0003 LC

PCHPHPYDARPYCNVGGSSGGSSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR
 ASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
 NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 949)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL11-0003 LC (SEQ ID NO: 950)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [CCTTGCTATTGGCATCCTTTTTTTGCGTATAGGTATTGCAATACTG
 GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
 ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
 AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
 CCGCAAGGCCCCCAAACCTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
 TTCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC
 ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACSTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
 AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
 T] (SEQ ID NO: 102)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL11-0003 LC (SEQ ID NO: 951)]

[QQQSGS] [PCYWHPPFAYRYCNTGGGSSGGSSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 103)

Нуклеотидная последовательность PL11-0003 LC

CCTTGCTATTGGCATCCTTTTTTTGCGTATAGGTATTGCAATACTGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
 CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAACCTGC
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGCTACCCAGCACSTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 950)

Аминокислотная последовательность PL11-0003 LC

PCYWHPPFFAYRYCNTGGGSSGGSGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCR
 ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
 NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 951)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL12-0003 LC (SEQ ID NO: 952)]
 [CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GTTTGCTATTATATGGATTGGTTGGGGCGGAATTGGTGCTCTTCGG
 GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
 ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
 AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
 CCGGCAAGGCCCCAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
 TTCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCC
 АССТАСТАТGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
 AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
 T] (SEQ ID NO: 104)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL12-0003 LC (SEQ ID NO: 953)]
 [QGQSGS] [VCYYMDWLGRNWCSSGGGSSGGSGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDVRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 105)

Нуклеотидная последовательность PL12-0003 LC

GTTTGCTATTATATGGATTGGTTGGGGCGGAATTGGTGCTCTTCGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
 CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCAACTGC
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 952)

Аминокислотная последовательность PL12-0003 LC

VCYYMDWLGRNWCSSGGGSSGGSGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCR
 ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
 NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 953)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL13-0003 LC (SEQ ID NO: 954)]
 [CAAGGTCAGTCTGGATCC] [CTGTGCGATCTGTTAAGTTGCGTGAGTTTCCTTATTGCATGGGGG
 GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
 ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
 AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
 CCGGCAAGGCCCCAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT

TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCAGGACTTCGCC
 АССТАТАCTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
 AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
 T] (SEQ ID NO: 106)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL13-0003 LC (SEQ ID NO: 955)]
 [QGQSGS] [LCDLFLKREFPYCMGGGGSSGGSGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 107)

Нуклеотидная последовательность PL13-0003 LC

СТGTGCGATCTGTTТААГТТГCGTGAGTTTCCTTATTGCATGGGGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTCTGACAT
 ССАГАТGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCAAACTGC
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 954)

Аминокислотная последовательность PL13-0003 LC

LCDLFLKREFPYCMGGGGSSGGSGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 955)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL14-0003 LC (SEQ ID NO: 956)]
 [CAAGGTCACTCTGGATCC] [TATCTTCCGTGCCATTTTGTTCGATTGGGGCTTGCAATAATAAGG
 GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
 АСГТGGCGGCGGTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
 AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
 CCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
 TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCAGGACTTCGCC
 АССТАТАCTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
 AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
 T] (SEQ ID NO: 108)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL14-0003 LC (SEQ ID NO: 957)]
 [QGQSGS] [YLPCHFVPIGACNNKGGGSSGGSGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 109)

Нуклеотидная последовательность PL14-0003 LC

TATCTTCCGTGCCATTTTGTTCGATTGGGGCTTGCAATAATAAGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAACCTGC
TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
AACGGCTACCCAGCACSTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 956)

Аминокислотная последовательность PL14-0003 LC

YLPCHFVPIGACNNKGGSSGGSSGGTSTSGRSANPRGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR
ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 957)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL15-0003 LC (SEQ ID NO: 958)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [ATTTTTTGCCATATGGGTGTTGTGGTTCCTCAGTGCGCGAATTATG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACSTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 110)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL15-0003 LC (SEQ ID NO: 959)]

[QGQSGS] [IFCHMGVVVPQCANYGGGSSGGSSGGTSTSGRSANPRGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 111)

Нуклеотидная последовательность PL15-0003 LC

ATTTTTTGCCATATGGGTGTTGTGGTTCCTCAGTGCGCGAATTATGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAACCTGC
TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
AACGGCTACCCAGCACSTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 958)

Аминокислотная последовательность PL15-0003 LC

IFCHMGVVVPQCANYGGSSGGSSGGTSTSGRSANPRGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR
 ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
 NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 959)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL16-0003 LC (SEQ ID NO: 960)]
 [CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTCGTCCTTATTGCAATGTGG
 GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
 ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
 AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
 CCGGCAAGGCCCCAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
 TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCC
 АССТАТАCTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAATCA
 AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
 T] (SEQ ID NO: 112)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL16-0003 LC (SEQ ID NO: 961)]

[QGQSGS] [ACHPHPYDARPYCNVGGSSGGSSGGTSTSGRSANPRGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 113)

Нуклеотидная последовательность PL16-0003 LC

GCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTCGTCCTTATTGCAATGTGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
 CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCAACTGC
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGCTACCCSAGCACSTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 960)

Аминокислотная последовательность PL16-0003 LC

ACHPHPYDARPYCNVGGSSGGSSGGTSTSGRSANPRGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR
 ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
 NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 961)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL17-0003 LC (SEQ ID NO: 962)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [CCGTGCCATCCGGCTCCTTATGATGCTCGTCCTTATTGCAATGTGG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 114)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL17-0003 LC (SEQ ID NO: 963)]
[QGQSGS] [PCHPAPYDARPYCNVGGGSSGGSGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 115)

Нуклеотидная последовательность PL17-0003 LC

CCGTGCCATCCGGCTCCTTATGATGCTCGTCCTTATTGCAATGTGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCAAACTGC
TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
AACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 962)

Аминокислотная последовательность PL17-0003 LC

PCHPAPYDARPYCNVGGGSSGGSGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 963)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL18-0003 LC (SEQ ID NO: 964)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [CCGTGCCATCCGCATGCTTATGATGCTCGTCCTTATTGCAATGTGG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 116)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL18-0003 LC (SEQ ID NO: 965)]

[QGQSGS] [PCHPHAYDARPYCNVGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 117)

Нуклеотидная последовательность PL18-0003 LC

CCGTGCCATCCGCATGCTTATGATGCTCGTCCTTATTGCAATGTGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGCGGTTCTGACAT
CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAACCTGC
TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
AACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 964)

Аминокислотная последовательность PL18-0003 LC

PCHPHAYDARPYCNVGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 965)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL19-0003 LC (SEQ ID NO: 966)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [CCGTGCCATCCGCATCCTGCTGATGCTCGTCCTTATTGCAATGTGG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCCAAACCTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 118)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL19-0003 LC (SEQ ID NO: 967)]

[QGQSGS] [PCHPHPADARPYCNVGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 119)

Нуклеотидная последовательность PL19-0003 LC

PCHPHPYAARPYCNVGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR
ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 969)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL21-0003 LC (SEQ ID NO: 970)]
[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [CCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTGCTCCTTATTGCAATGTGG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCTGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 122)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL21-0003 LC (SEQ ID NO: 971)]
[QGQSGS] [PCHPHPYDAAPYCNVGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 123)

Нуклеотидная последовательность PL21-0003 LC

CCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTGCTCCTTATTGCAATGTGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCTGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCAAACTGC
TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
CGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
AACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 970)

Аминокислотная последовательность PL21-0003 LC

PCHPHPYDAAPYCNVGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR
ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 971)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL22-0003 LC (SEQ ID NO: 972)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [CCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTCGTCCTGCTTGCAATGTGG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 124)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL22-0003 LC (SEQ ID NO: 973)]
[QGQSGS] [PCHPHPYDARPAENVGGSSGGSSGGSGGTSTSGRSANPRGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 125)

Нуклеотидная последовательность PL22-0003 LC

CCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTCGTCCTGCTTGCAATGTGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCAAACTGC
TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
AACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 972)

Аминокислотная последовательность PL22-0003 LC

PCHPHPYDARPAENVGGSSGGSSGGSGGTSTSGRSANPRGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 973)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL23-0003 LC (SEQ ID NO: 974)]
[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [CCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTCGTCCTTATTGCGTGTGG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCGTTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 126)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL23-0003 LC (SEQ ID NO: 975)]

[QGQSGS] [PCHPHYDARPYCAVGGGSSGGSSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 127)

Нуклеотидная последовательность PL23-0003 LC

CCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTCGTCCTTATTGCGCTGTGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTCTGACAT
CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCAAACTGC
TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
AACGGTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
AGACATCAACTTCACCCATTTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 974)

Аминокислотная последовательность PL23-0003 LC

PCHPHYDARPYCAVGGGSSGGSSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 975)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL24-0003 LC (SEQ ID NO: 976)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [CCGTGCCATGCGCATCCTTATGATGCTCGTCCTTATTGCAATGTGG
GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTCTCCGCTAACCC
ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
CCGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
TTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCAACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCC
ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAAATCA
AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
T] (SEQ ID NO: 128)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL24-0003 LC (SEQ ID NO: 977)]

[QGQSGS] [PCHPHYDARPYCAVGGGSSGGSSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 129)

Нуклеотидная последовательность PL24-0003 LC

CCGTGCCATGCGCATCCTTATGATGCTCGTCCCTTATTGCAATGTGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
 CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAAGTGC
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 976)

Аминокислотная последовательность PL24-0003 LC

PCHNHPYDARPYCNVGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCR
 ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
 NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 977)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL25-0003 LC (SEQ ID NO: 978)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [CCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTCGTCTTATTGCAATGTGG
 GAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTTCGTTCCGCTAACCC
 ACGTGGCGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGAC
 AGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGC
 CCGGCAAGGCCCCCAAAGTGCCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATT
 TTCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC
 ACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCA
 AGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
 T] (SEQ ID NO: 130)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL25-0003 LC (SEQ ID NO: 979)]

[QQQSGS] [PCHNHPYDARAYCNVGGGSSGGSGGSGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
 FATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 131)

Нуклеотидная последовательность PL25-0003 LC

CCGTGCCATCCGCATCCTTATGATGCTCGTCTTATTGCAATGTGGGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCA
 GCGGTGGCTCTGGTGGTACTAGCACCTCTGGTTCGTTCCGCTAACCCACGTGGCGGCGGTTCTGACAT
 CCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA
 GCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAAGTGC
 TGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCAC
 CGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGAC
 AACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACA
 AGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 978)

Аминокислотная последовательность PL25-0003 LC

PCHPHYDARAYCNVGGGSSGGSGGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICR
 ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQD
 NGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 979)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL03-2001 LC (SEQ ID NO: 952)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCA
 GTGGTCTGTТАAGCGGTCGTAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAG
 CAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGC
 TACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAAGTCTGATCTACGCCGCCAGCTCTC
 TGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAG
 CTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTT
 GGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTG
 TSAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT] (SEQ ID NO: 132)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL03-2001 LC (SEQ ID NO: 981)]

[QGQSGS] [LCEVLMLLQHPWCMGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
 VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
 DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 133)

Нуклеотидная последовательность PL03-2001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCAGTGGTCTGTТАAGCGGTCGTA
 GCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGG
 CGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAG
 AAGCCCGGCAAGGCCCCCAAAGTCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCA
 GATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTT
 CGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAA
 ATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATG
 AGTGT (SEQ ID NO: 980)

Аминокислотная последовательность PL03-2001 LC

LCEVLMLLQHPWCMGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
 RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
 DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 981)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL04-2001 LC (SEQ ID NO: 1183)]

[QGQSGS] [IACRHFMEQLPFCHHGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
 VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
 DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1182)

Аминокислотная последовательность PL04-2001 LC

IACRHFMEQLPFCHHGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
 RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
 DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1183)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL06-2001-mk LC (SEQ ID NO: 982)]

[СААГГТСАГТСТГГАТСС] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCAGTGGTCTGTTAAGCGGTCGTAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGТСААГАГСТТСААСАГГААТГАГТГТ] (SEQ ID NO: 134)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL06-2001-mk LC (SEQ ID NO: 983)]

[QQQSGS] [ILYCDSWGAGCLTRPGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 135)

Нуклеотидная последовательность PL06-2001-mk LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCAGTGGTCTGTTAAGCGGTCGTAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAAGCCCGCAAGGCCCCAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO: 982)

Аминокислотная последовательность PL06-2001-mk LC

ILYCDSWGAGCLTRPGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 983)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL07-2001 LC (SEQ ID NO: 984)]

[СААГГТСАГТСТГГАТСС] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCAGTGGTCTGTTAAGCGGTCGTAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGТСААГАГСТТСААСАГГААТГАГТГТ] (SEQ ID NO: 136)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2001 LC (SEQ ID NO: 985)]
 [QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSSGGSSGGLSSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
 VGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPE
 DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 137)

Нуклеотидная последовательность PL07-2001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCAGTGGTCTGTТААGCGGTCGTA
 GCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGG
 CGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAG
 AAGCCCCGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCA
 GATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTT
 CGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAA
 ATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATG
 AGTGT (SEQ ID NO: 984)

Аминокислотная последовательность PL07-2001 LC

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSSGGSSGGLSSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC
 RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
 DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 985)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL10-2001 LC (SEQ ID NO: 986)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCA
 GTGGTCTGTТААGCGGTCGTAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAG
 CAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGC
 TACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTC
 TGCACTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAG
 CTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTT
 GGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTG
 TCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT] (SEQ ID NO: 138)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL10-2001 LC (SEQ ID NO: 987)]

[QGQSGS] [PCHPHYDARPYCNVGGGSSGGSSGGSSGGLSSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
 VGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPE
 DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 139)

Нуклеотидная последовательность PL10-2001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCAGTGGTCTGTAAAGCGGTCTGTA
GCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGG
CGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAG
AAGCCCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCA
GATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTT
CGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAA
ATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATG
AGTGT (SEQ ID NO: 986)

Аминокислотная последовательность PL06-2001 LC

PCHPHPYDARPYCNVGGGSSGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 987)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL11-2001 LC (SEQ ID NO: 1185)]
[QGQSGS] [PCYWHPPFAIRYRCNTGGGSSGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1184)

Аминокислотная последовательность PL11-2001 LC

PCYWHPPFAIRYRCNTGGGSSGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1185)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL12-2001 LC (SEQ ID NO: 1187)]
[QGQSGS] [VCYMDWLGRNWCSSGGGSSGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1186)

Аминокислотная последовательность PL12-2001 LC

VCYMDWLGRNWCSSGGGSSGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1187)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL14-2001 LC (SEQ ID NO: 988)]
[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCA
GTGGTCTGTAAAGCGGTCTGACGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAG
CAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGC
TACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTC
TGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCTGACCATCAG
CTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTT
GGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTG
TCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT] (SEQ ID NO: 140)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL14-2001 LC (SEQ ID NO: 989)]
 [QGQSGS] [YLPCHFVPIGACNNKGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
 VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
 DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 141)

Нуклеотидная последовательность PL14-2001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCAGTGGTCTGTAAAGCGGTCGTA
 GCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGG
 CGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAG
 AAGCCCCGCAAGGCCCCCAAACCTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCA
 GATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTT
 CGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAA
 ATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATG
 AGTGT (SEQ ID NO: 988)

Аминокислотная последовательность PL14-2001 LC

YLPCHFVPIGACNNKGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
 RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
 DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 989)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL15-2001 LC (SEQ ID NO: 990)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCA
 GTGGTCTGTAAAGCGGTCGTAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAG
 CAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGC
 TACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGCAAGGCCCCCAAACCTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTC
 TGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAG
 CTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTT
 GGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTG
 TCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT] (SEQ ID NO: 142)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL15-2001 LC (SEQ ID NO: 991)]

[QGQSGS] [IFCHMGVVVPQCANYGGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
 VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
 DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 143)

Нуклеотидная последовательность PL15-2001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCAGTGGTCTGTAAAGCGGTCGTA
 GCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGG
 CGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAG
 AAGCCCCGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGGCCAGCA
 GATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTT
 CGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAA
 ATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATG
 AGTGT (SEQ ID NO: 990)

Аминокислотная последовательность PL15-2001 LC

IFCHMGVVVPQCANYGGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSIDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
 RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
 DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 991)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL18-2001 LC (SEQ ID NO: 992)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCA
 GTGGTCTGTAAAGCGGTCGTAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAG
 CAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGC
 TACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTC
 TGCAGTCTGGCGTGGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAG
 CTCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTT
 GGCGGAGGTACCAAGGTGGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTG
 TCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT] (SEQ ID NO: 144)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL18-2001 LC (SEQ ID NO: 993)]

[QQQSGS] [PCHPHAYDARPYCNVGGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSIDIQMTQSPSSLSAS
 VGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPE
 DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 145)

Нуклеотидная последовательность PL18-2001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATTAGCAGTGGTCTGTAAAGCGGTCGTA
 GCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGG
 CGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAG
 AAGCCCCGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGGCCAGCA
 GATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTT
 CGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTGGAA
 ATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATG
 AGTGT (SEQ ID NO: 992)

Аминокислотная последовательность PL18-2001 LC

PCHPHAYDARPYCNVGGGSSGGSSGGISSGLLSGRSDNHGGSIDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
 RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
 DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 993)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL19-2001 LC (SEQ ID NO: 1189)]

[QGQSGS] [PCHPHPADARPYCNVGGGSSGGSGGSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1188)

Аминокислотная последовательность PL19-2001 LC

PCHPHPADARPYCNVGGGSSGGSGGSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1189)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL20-2001 LC (SEQ ID NO: 1191)]

[QGQSGS] [PCHPHYAARPYCNVGGGSSGGSGGSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1190)

Аминокислотная последовательность PL20-2001 LC

PCHPHYAARPYCNVGGGSSGGSGGSGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1191)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL03-1004/GG/0001 (также
относится здесь к PL03-3001) LC (SEQ ID NO: 994)]

[CAAGGTCACTCTGGATCC] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCTGGCTC
CCCCGGCGCGCTGTCCGGCCGACGATAATCATGGCGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
CAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGC
AGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCT
CTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCAGCTTACCCTGACCAT
CAGCTCCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACC
TTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCA
TTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT] (SEQ ID NO: 146)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL03-1004/GG/0001 LC (SEQ ID
NO: 995)]

[QGQSGS] [LCEVLMMLQHPWCMGGGSSGGSGAVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSA
SVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 147)

Нуклеотидная последовательность PL03-1004/GG/0001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCCTGGCTCCCCGGGCGGCCTGTCCGGCC
 GCAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGT
 GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAG
 CAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCCA
 GCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGA
 CTTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTG
 CAAATCAAGCCTTCTCAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATCTCAACAGCTTCAACACGA
 ATGAGTGT (SEQ ID NO: 994)

Аминокислотная последовательность PL03-1004/GG/0001 LC

LCEVLMLLQHPWCMGGGSSGGSGAVLLAPPGLSGRSDNHGGSIDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT
 CRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
 QDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 995)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL06-1004/GG/0001 (также
 относится здесь к PL06-3001) LC (SEQ ID NO: 996)]

[CAAGGTCACTCTGGATCC] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCCTGGCTC
 CCCCCGGGCGGCCTGTCCGGCCGACGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
 CAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGC
 AGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCT
 CTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCAT
 CAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACC
 TTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCC
 TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT] (SEQ ID NO: 148)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL06-1004/GG/0001 LC (SEQ ID
 NO: 997)]

[QCQSCS] [ILYCDSWGAGCLTRPGCCSSCGSGAVLLAPPGLSCRSDNHGGSIDIQMTQSPSSLSA
 SVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPE
 EDFATYYCQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 149)

Нуклеотидная последовательность PL06-1004/GG/0001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCCTGGCTCCCCGGGCGGCCTGTCCGGCC
 GCAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGT
 GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAG
 CAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCCA
 GCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGA
 CTTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTG
 GAAATCAAGCCTTGCAGAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGG
 GAGAGTGT (SEQ ID NO: 996)

Аминокислотная последовательность PL06-1004/GG/0001 LC

I LYCD SWGAGCLTRPGGSSGGSGAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT
CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 997)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL07-1004/GG/0001 (также
относится здесь к PL07-3001) LC (SEQ ID NO: 998)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCCTGGCTC
CCCCGGGCGGCCTGTCCGGCCGACGATAATCATGGCGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
CAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGC
AGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAAGTCTGATCTACGCCGCCAGCT
CTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTCCGGCAGCGCTCTGGCACCAGACTTCACCCTGACCAT
CAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACC
TTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG
TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT] (SEQ ID NO: 150)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL01-1004/GG/0001 LC (SEQ ID
NO: 999)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSA
SVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQ
EDFATYYCQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 151)

Нуклеотидная последовательность PL07-1004/GG/0001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCCTGGCTCCCCGGGCGGCCTGTCCGGCC
GCAGCGATAATCATGGCGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGT
GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAG
CAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAAGTCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCCA
GCAGATTTTCCGGCAGCGGTCTGGCACCAGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGA
CTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTG
GAAATCAAGCGTTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGT (SEQ ID NO: 998)

Аминокислотная последовательность PL07-1004/GG/0001 LC

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT
CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 999)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL14-1004/GG/0001 (также
относится здесь к PL14-3001) LC (SEQ ID NO: 1000)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCCTGGCTC
 CCCC GGCGGCCTGTCCGGCCGAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
 CAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGC
 AGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCT
 CTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCAT
 CAGCTCCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACC
 TTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCC
 TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT] (SEQ ID NO: 152)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL14-1004/GG/0001 LC (SEQ ID
 NO: 1001)]

[QGQSGS] [YLPCHFVPIGACNNKGGSSGGSGAVLLAPPGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSA
 SVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
 EDFATYYCQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 153)

Нуклеотидная последовательность PL14-1004/GG/0001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCCTGGCTCCCCGGCGGCCTGTCCGGCC
 GCAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGT
 GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAG
 CAGAAGCCCCGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCCA
 GCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCAGGA
 CTTCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTG
 GAAATCAAGCGTTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACACAAAGAGCTTCAACAGGG
 GAGAGTGT (SEQ ID NO: 1000)

Аминокислотная последовательность PL14-1004/GG/0001 LC

YLPCHFVPIGACNNKGGSSGGSGAVLLAPPGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT
 CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ
 QDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1001)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL15-1004/GG/0001 (также
 относится здесь к PL15-3001) LC (SEQ ID NO: 1002)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCCTGGCTC
 CCCC GGCGGCCTGTCCGGCCGAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
 CAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGC
 AGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCT
 CTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCAT
 CAGCTCCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCCAGCACC
 TTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCA
 TTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT] (SEQ ID NO: 154)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL15-1004/GG/0001 LC (SEQ ID

NO: 1003)]

[QGQSGS] [IFCHMGVVVPQCANYGGGSSGGSGAVLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSA
SVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 155)

Нуклеотидная последовательность PL15-1004/GG/0001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCCTGGCTCCCCGGGCGGCCTGTCCGGCC
GCAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGT
GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAG
CAGAAGCCCCGCAAGGCCCCCAAAGTCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCCA
GCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGA
CTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTG
GAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGA
ATGAGTGT (SEQ ID NO: 1002)

Аминокислотная последовательность PL15-1004/GG/0001 LC

IFCHMGVVVPQCANYGGGSSGGSGAVLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT
CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1003)

[Спейсер (SEQ ID NO: 929)] [PL18-1004/GG/0001 (также
относится здесь к PL18-3001) LC (SEQ ID NO: 1004)]

[CAAGGTCAGTCTGGATCC] [GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCCTGGCTC
CCCCGGGCGGCCTGTCCGGCCGACGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
CAGCAGCCTGTCTGCTAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGC
AGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGCAAGGCCCCCAAAGTCTGATCTACGCCGCCAGCT
CTCTGCAGTCTGGCGTGCCAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCTGACCAT
CAGCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCC
TTTGGCGGAGGTACCAAGGTGAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCA
TTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT] (SEQ ID NO: 156)

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL18-1004/GG/0001 LC (SEQ ID
NO: 1005)]

[QGQSGS] [PCHPHAYDARPYCNVGGGSSGGSGAVLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSA
SVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 157)

Нуклеотидная последовательность PL18-1004/GG/0001 LC

GGAGGTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGCTGTGGGTCTCCTGGCTCCCCGGGCGGCCTGTCCGGCC
 GCAGCGATAATCATGGCGGTTCTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTAGCGT
 GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAG
 CAGAAGCCCCGGAAGGCCCCAAACTGCTGATCTACGCCGCCAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCCA
 GCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCAGGA
 CTTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACAACGGCTACCCAGCACCTTTGGCGGAGGTACCAAGGTG
 GAAATCAAGCGTTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGA
 ATGAGTGT (SEQ ID NO: 1004)

Аминокислотная последовательность PL18-1004/GG/0001 LC

PCHPHAYDARPYCNVGGSSGGSGAVLLAPPGLSGRSDNHGGSIDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT
 CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ
 QDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1005)

PL07-0001

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-1001 LC (SEQ ID NO: 1145)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSLSGRSDNHGGSIDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT
 CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY
 YCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1144)

Аминокислотная последовательность PL07-1001

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSLSGRSDNHGGSIDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQS
 ISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNGYP
 STFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1145)

PL07-0002

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-0002 LC (SEQ ID NO: 1147)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSLSGRSGNHGGSIDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT
 CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY
 YCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1146)

Аминокислотная последовательность PL02-002

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSLSGRSGNHGGSIDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQS
 ISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNGYP
 STFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1147)

PL07-1001

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-1001 LC (SEQ ID NO: 1149)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSISSGGLSSGGSIDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT
 CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY
 YCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1148)

Аминокислотная последовательность PL07-1001

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQS
 ISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDNGYP
 STFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1149)

PL07-1002

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-1002 LC (SEQ ID NO: 1151)]
 [spacer (SEQ ID NO: 923)] [PL07-1002 LC (SEQ ID NO: 1151)]
 [QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGQNALRMAGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV
 TITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY
 YCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1150)

Аминокислотная последовательность PL07-1002

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGQNALRMAGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQS
 ISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDNGYP
 STFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1151)

PL07-1003

[Спейсер [SEQ ID NO: 923)] [PL07-1003 LC (SEQ ID NO: 1153)]
 [QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGVHMLPLGFLGPGGSDIQMTQSPSSLSASVGD
 RVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA
 TYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1152)

Аминокислотная последовательность PL07-1003

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGVHMLPLGFLGPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRAS
 QSISYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDNG
 YPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1153)

PL07-1004

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-1004 LC (SEQ ID NO: 1201)]
 [QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGAVGLLAPPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV
 TITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY
 YCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1200)

Аминокислотная последовательность PL07-1004

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGAVGLLAPPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQS
 ISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDNGYP
 STFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1201)

PL07-2002

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2002 LC (SEQ ID NO: 1155)]
 [QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSGNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
 VGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPE
 DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1154)

Аминокислотная последовательность PL07-2002

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSGGISSGLLSGRSGNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1155)

PL07-2003

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2003 LC (SEQ ID NO: 1157)]

[QQQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSGGISSGLLSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLS
ASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1156)

Аминокислотная последовательность PL07-2003

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSGGISSGLLSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI
TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
QQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1157)

PL07-2004

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2004 LC (SEQ ID NO: 1159)]

[QQQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSGGAVGLLAPPTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1158)

Аминокислотная последовательность PL07-2004

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSGGAVGLLAPPTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
YYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1159)

PL07-2005

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2005 LC (SEQ ID NO: 1161)]

[QQQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSGGAVGLLAPPSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSS
LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1160)

Аминокислотная последовательность PL07-2005

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGSGGAVGLLAPPSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV
TITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY
YCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1161)

PL07-2006

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2006 LC (SEQ ID NO: 1163)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDDHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1162)

Аминокислотная последовательность PL07-2006

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDDHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1163)

PL07-2007

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2007 LC (SEQ ID NO: 1165)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDIHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1164)

Аминокислотная последовательность PL07-2007

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDIHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1165)

PL07-2008

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2008 LC (SEQ ID NO: 1167)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDQHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1166)

Аминокислотная последовательность PL07-2008

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDQHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1167)

PL07-2009

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2009 LC (SEQ ID NO: 1169)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDTHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1168)

Аминокислотная последовательность PL07-2009

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDTHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1169)

PL07-2010

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2010 LC (SEQ ID NO: 1171)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDYHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1170)

Аминокислотная последовательность PL07-2010

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDYHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1171)

PL07-2011

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2011 LC (SEQ ID NO: 1173)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1172)

Аминокислотная последовательность PL07-2011

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1173)

PL07-2012

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2012 LC (SEQ ID NO: 1175)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSANPGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1174)

Аминокислотная последовательность PL07-2012

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSANPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1175)

PL07-2013

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2013 LC (SEQ ID NO: 1177)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSANIGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1176)

Аминокислотная последовательность PL07-2013

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSANIGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1177)

PL07-2014

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-2017 LC (SEQ ID NO: 1179)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNIGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1178)

Аминокислотная последовательность PL07-2014

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNIGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
DNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1179)

PL07-1004/GG/0003

[Спейсер (SEQ ID NO: 923)] [PL07-1004/GG/0003 LC (SEQ ID
NO: 1181)]

[QGQSGS] [GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGAVGLLAPPGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFT
LTISLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR] (SEQ ID NO: 1180)

Аминокислотная последовательность PL07-1004/GG/0003

GIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGGGAVGLLAPPGGTSTSGRSANPRGGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 1181)

Пример 11. Активируемые анти-PDL1-антитела по изобретению.

В данном примере показано, что могут быть получены активируемые анти-PDL1-антитела с различными комбинациями областей MM, CM, VL и VH, а также с различными изоформами человека.

Таблица 18. Компоненты активируемых анти-PDL1-антител

Маскирующая последовательность (MM)	Последовательность субстрата (CM)	VL	VH
YCEVSELFVLPWCMG (SEQ ID NO: 208)	LSGRSDNH (SEQ ID NO: 341)	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 14
SCLMHPHYAHDYCYV (SEQ ID NO: 426)	TGRGPSWV (SEQ ID NO: 338)	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 16

LCEVLMLLQHPWCMG (SEQ ID NO: 59)	PLTGRSGG (SEQ ID NO: 344)		SEQ ID NO: 18
IACRHFMEQLPFCHH (SEQ ID NO: 60)	TARGPSFK (SEQ ID NO: 340)		SEQ ID NO: 20
FGPRCGEASTCVPYE (SEQ ID NO: 61)	NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 435)		SEQ ID NO: 22
ILYCDSWGAGCLTRP (SEQ ID NO: 62)	NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 436)		SEQ ID NO: 24
GIALCPSHFCQLPQT (SEQ ID NO: 63)	TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 437)		SEQ ID NO: 26
DGPRCFVSGECSPIG (SEQ ID NO: 64)	TSGRSANP (SEQ ID NO: 438)		SEQ ID NO: 28

LCYKLDYDDRSYCHI (SEQ ID NO: 65)	VHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 352)		SEQ ID NO: 30
PCHPHPYDARPYCNV (SEQ ID NO: 66)	AVGLLAPP (SEQ ID NO: 372)		SEQ ID NO: 32
PCYWHPFFAYRYCNT (SEQ ID NO: 67)	AQNLLGMV (SEQ ID NO: 360)		SEQ ID NO: 34
VCYYMDWLGRNWCSS (SEQ ID NO: 68)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 359)		SEQ ID NO: 36
LCDLFKLREFPYCMG (SEQ ID NO: 69)	LAAPLGLL (SEQ ID NO: 371)		SEQ ID NO: 38
YLPCHFVPIGACNNK (SEQ ID NO: 70)	STFPFGMF (SEQ ID NO: 361)		SEQ ID NO: 40

IFCHMGVWPQCANY (SEQ ID NO: 71)	ISSGLLSS (SEQ ID NO: 364)		SEQ ID NO: 42
ACHPHPYDARPYCNV (SEQ ID NO: 72)	PAGLWLDP (SEQ ID NO: 374)		SEQ ID NO: 44
PCHPAPYDARPYCNV (SEQ ID NO: 73)	VAGRSMRP (SEQ ID NO: 439)		SEQ ID NO: 46
PCHPHAYDARPYCNV (SEQ ID NO: 74)	WPEGRRS (SEQ ID NO: 440)		SEQ ID NO: 48
PCHPHPADARPYCNV (SEQ ID NO: 75)	ILPRSPAF (SEQ ID NO: 441)		SEQ ID NO: 50
PCHPHPYAARPYCNV (SEQ ID NO: 76)	MVLGRSLL (SEQ ID NO: 442)		SEQ ID NO: 52
PCHPHPYDAAPYCNV (SEQ ID NO: 77)	QGRAITFI (SEQ ID NO: 443)		SEQ ID NO: 54
PCHPHPYDARPACNV (SEQ ID NO: 78)	SPRSIMLA (SEQ ID NO: 444)		SEQ ID NO: 56
PCHPHPYDARPYCAV (SEQ ID NO: 79)	SMLRSMPL (SEQ ID NO: 445)		

PCHAHFYDARPYCNV (SEQ ID NO: 80)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 377)		
PCHPHPYDARAYCNV (SEQ ID NO: 81)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 383)		
	ISSGLLSSGGSGGSLGRSDN H (SEQ ID NO: 378)		
	LSGRSGNH (SEQ ID NO: 883)		
	SGRSANPRG (SEQ ID NO: 884)		
	LSGRSDDH (SEQ ID NO: 885)		
	LSGRSDIH (SEQ ID NO: 886)		
	LSGRSDQH (SEQ ID NO: 887)		
	LSGRSDTH (SEQ ID NO: 888)		
	LSGRSDYH (SEQ ID NO: 889)		
	LSGRSDNP (SEQ ID NO: 890)		
	LSGRSANP (SEQ ID NO: 891)		
	LSGRSANI (SEQ ID NO: 892)		

	LSGRSDNI (SEQ ID NO: 893)		
	MIAPVAYR (SEQ ID NO: 894)		
	RPSPMWAY (SEQ ID NO: 895)		
	WATPRPMR (SEQ ID NO: 896)		
	FRLLDWQW (SEQ ID NO: 897)		
	ISSGL (SEQ ID NO: 898)		
	ISSGLLS (SEQ ID NO: 899)		
	ISSGLL (SEQ ID NO: 900)		
	ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 901)		
	AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 902)		
	AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 903)		
	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 904)		
	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 905)		

	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 906)		
	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 907)		
	ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 908)		
	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 909)		
	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 910)		
	ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 911)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 912)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 913)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 914)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 915)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 916)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 917)		
	AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 918)		

	AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 919)		
	ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 920)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 921)		
	GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 1009)		
	GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 1010)		

Любую из комбинаций, описанных в табл. 18, можно объединить с константными областями иммуноглобулина человека с получением полностью человеческих IgG, включая IgG1, IgG2, IgG4, или с мутированными константными областями с получением человеческих IgG с измененными функциями, таких как IgG1 N297A, IgG1 N297Q или IgG4 S228P. Комбинации, приведенные в табл.18, не ограничиваются конкретными комбинациями, показанными в любой данной строке, и включают любую маскирующую последовательность из колонки 1, соответствующую любой последовательности субстрата из колонки 2, соответствующую любой последовательности VL из колонки 3, соответствующую любой последовательности VH из колонки 4. В дополнение к последовательностям субстрата, приведенным в колонке 2, может быть использован любой CM, раскрытый здесь.

В качестве примера спейсерную последовательность (SEQ ID NO: 923) и маскирующую последовательность SEQ ID NO: 63 можно объединить с субстратом ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 377), VL SEQ ID NO: 58, и объединить с человеческой константной областью каппа с получением SEQ ID NO: 428; или маскирующую последовательность SEQ ID NO: 63 можно объединить с субстратом ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 377), VL SEQ ID NO: 58, и объединить с человеческой константной областью каппа с получением SEQ ID NO: 1008. Кроме того, VH SEQ ID NO: 46 можно объединить с константными областями тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина с получением человеческого IgG1 (SEQ ID NO: 430), мутантного человеческого IgG4 S228P (SEQ ID NO: 432), мутантного человеческого IgG1 N297A (SEQ ID NO: 434) или мутантного человеческого IgG1 N297Q (SEQ ID NO: 1202). Коэкспрессия SEQ ID NO: 427 с SEQ ID NO: 429 дает полностью человеческое активируемое IgG1 анти-PDL1-антитело. Коэкспрессия SEQ ID NO: 427 с SEQ ID NO: 431 дает полностью человеческое активируемое IgG4 анти-PDL1-антитело S228P. Коэкспрессия SEQ ID NO: 427 с SEQ ID NO: 433 дает полностью человеческое активируемое IgG1 анти-PDL1-антитело N297A. Коэкспрессия SEQ ID NO: 427 с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1202, дает полностью человеческое IgG1 активируемое анти-PDL1-антитело N297Q.

Последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 1007) со спейсером (SEQ ID NO: 1006)] (SEQ ID NO: 427)
[CAGGGCCAGTCCGGCTCA] [TATCTGCCCTGCCACTTCGTGCCAATCGGGCCTGTAACAATAAGG
GCGGTGGATCTAGTGGTGGCTCAGGCGGGTCTGGCGGCATTTCCAGTGGACTCTTGT CAGGACGATC
CGATAATCATGGCGGGTCCGACATCCAGATGACACAGAGCCCTTCTTCCCTCTCCGCAAGCGTTGGC
GACAGGGTCACCATTACCTGTAGGGCTTCTCAGAGCATCTCAAGCTATCTGAACTGGTACCAGCAGA
AACCTGGAAAGGCTCCAAAAC TGCTGATTTACGCTGCCTCCAGTCTTCAGTCAGGCGTCCCCTCCAG
ATTTAGCGGATCAGGTAGTGGAAC TGATTTTACCCTTACAATATCTTCTCTGCAGCCAGAGGACTTC
GCCACATACTATTGTCAGCAAGACAATGGTTACCCCAGTACATTTGGCGGAGGGACAAAGGTCGAGA
TCAAAGGACCGTAGCAGCACCAAGCGTCTTTATTTCCCCCCCAGTGACGAACAGCTGAAGAGCGG
AACAGCTTCAGTGGTGTGTCTCCTGAATAACTTCTATCCACGCGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAGGTG
GACAATGCACTGCAGTCTGGTAATCCCAAGAAAAGTGTТАCTGAGCAGGATTCCAAGGATTCAACTT
ACTCTCTGTCTAGCACCCCTGACTCTTTCTAAAGCAGATTATGAGAAGCATAAGGTCTACGCTTGCGA
GGTGACCCACCAGGGGCTTTCCTCTCCAGTTACCAAGTCATTCAACCGGGGTGAGTGTTGATGAGAA
TTC] (SEQ ID NO: 427)

Последовательность легкой цепи без спейсера

TATCTGCCCTGCCACTTCGTGCCAATCGGGGCTGTAACAATAAGGGCGGTGGATCTAGTGGTGGCT
 CAGGCGGGTCTGGCGGCATTTCCAGTGGACTCTTGTGACGACGATCCGATAATCATGGCGGGTCCGA
 CATCCAGATGACACAGAGCCCTTCTTCCCTCTCCGCAAGCGTTGGCGACAGGGTCACCATACCTGT
 AGGGCTTCTCAGAGCATCTCAAGCTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAACCTGGAAAGGCTCCAAAAC
 TGCTGATTTACGCTGCCTCCAGTCTTCAGTCCAGGCTCCCTCCAGATTTAGCGGATCAGGTAGTGG
 AACTGATTTTACCCTTACAATATCTTCTCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGTGAGCAA
 GACAATGGTTACCCAGTACATTTGGCGGAGGGACAAAGGTCGAGATCAAAGGACCGTAGCAGCAC
 CAAGCGTCTTTATTTTCCCCCAGTGACGAACAGCTGAAGAGCGGAACAGCTTCAGTGGTGTGTCT
 CCTGAATAACTTCTATCCACGCGAGGCAAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAATGCACTGCAGTCTGGT
 AATCCCAAGAAAGTGTACTGAGCAGGATTTCAAGGATCAACTTACTCTCTGTCTAGCACCCCTGA
 CTCTTTCTAAAGCAGATTATGAGAAGCATAAGGTCTACGCTTGCAGGTTGACCCACCAGGGCTTTC
 CTCTCCAGTTACCAAGTCATTCAACCGGGGTGAGTGTGATGAGAATTC (SEQ ID NO: 1007)

[Последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 1008) со
 спейсером (SEQ ID NO: 923)] (SEQ ID NO: 428)

[QGQSGS] [GIALCPHFQQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
 VGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISLQPE
 DFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC]
 (SEQ ID NO: 428)

Последовательность легкой цепи без спейсера

GIALCPHFQQLPQTGGGSSGGSGGGISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC
 RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
 DNGYPSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
 NSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
 NO: 1008)

SEQ ID NO: 429

GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGCTTGGTGCAGCCAGGAGGGAGCCTGCGACTGTCTTGCG
 CAGCCAGCGGATTCACCTTCTCTTCCATGCCATGAGCTGGGTTGACAGGCACCCGGCAAAGGTCT
 CGAGTGGGTGTCTAGCATCTGGCGAAACGGAATAGTTACAGTGTATGCCGATAGCGTGAAGGGTCGC
 TTTACTATTTACGGGATAATTCTAAGAACCCTCTACCTGCAAATGAATAGCCTTAGGGCAGAAG
 ATACCGCCGTGTACTIONTGTGCCAAATGGTCCGCAGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACACTGGT
 GACCGTGTCTCTGCATCAACCAAGGGGCCATCAGTGTTCCTACTCGCCCATCTTCCAAGAGTACT
 TCCGGCGGAACCGCAGCCCTTGGCTGCCTTGTAAAGGACTATTTCCAGAACCCGTGACCGTAAGTT

GGAACTCTGGCGCCCTTACTTCTGGGGTGCACACCTTCCCAGCAGTGTTCAGTCCAGTGGCCTTTA
 CTCTCTGTCTAGTGTAGTACTGTGCCTTCCCTCTAGTCTCGGTACCCAGACCTATATTTGTAATGTT
 AACCATAGCCAGCAATACAAAGGTTGATAAGAAAGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACATA
 CCTGCCACCTTGTCCAGCTCCCGAGCTGCTGGGCGGACCCTCAGTCTTTCTCTTCCCACCTAAACC
 CAAGGATACCCTTATGATCTCCAGGACTCCTGAGGTGACCTGCGTTGTGGTTCGACGTGTCACATGAG
 GACCCTGAGGTAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGTGTGGAGGTACATAACGCTAAGACTAAGCCAC
 GAGAGGAGCAATACGCTTCCACTTACAGGGTGGTCAGCGTCTGACCGTTCTCCATCAGGACTGGCT
 GAACGGGAAGGAATATAAGTGTAAAGTTAGCAACAAAGCTCTCCCTGCACCAATCGAGAAGACAATC
 AGCAAGGCAAAAGGGCAGCCTCGGGAACCTCAGGTCTACACCCTCCCTCCTAGCAGGGAAGAGATGA
 CAAAGAACCAGGTCTCTCTCACCTGCCTGGTAAAAGGCTTCTATCCATCTGACATTGCTGTGGAGTG
 GGAATCCAACGGCCAGCCTGAAAATAATTATAAGACCACACCCCCGTCCTTGATTCCGATGGATCT
 TTCTTCTGTACAGTAAACTCACCGTCGACAAATCACGGTGGCAGCAAGGTAACGTGTTTCAGCTGTT
 CTGTTCATGCATGAGGCTCTGCATAACCATTACACACAAAAGTCTTTGTTCATTGTCTCCAGGATGATG
 AGAATTCATTGATCATAATCAGCCATAACCAC

SEQ ID NO: 430

EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGR
 FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFQYWGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVKDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 431

GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGCTTGGTGCAGCCAGGAGGGAGCCTGCGACTGTCTTGCG
 CAGCCAGCGGATTCACCTTTCTTCTTCCATGCCATGAGCTGGGTTTCGACAGGCACCCGCAAAGGTCT
 CGAGTGGGTGTCTAGCATCTGGCGAAACGGAATAGTTACAGTGTATGCCGATAGCGTGAAGGGTTCG
 TTTACTATTTACGGGATAATTCTAAGAACCCTCTACCTGCAAATGAATAGCCTTAGGGCAGAAG
 ATACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAATGGTCCGCAGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACACTGGT
 GACCGTGTCCCTGTCATCAACCAAGGGGCCATCAGTGTTCCTACTCGCCCCATGTAGCAGATCAACA
 TCTGAATCCACCGCAGCCCTTGGCTGCCTTGTAAAGACTATTTCCCAGAACCCGTGACCGTAAGTT
 GGAACTCTGGCGCCCTTACTTCTGGGGTGCACACCTTCCCAGCAGTGTTCAGTCCAGTGGCCTTTA
 CTCTCTGTCTAGTGTAGTACTGTGCCTTCCCTCTAGTCTCGGTACCAAGACCTATACCTGCAACGTA
 GATCATAAGCCCAGCAATACAAAGGTTGATAAGAGAGTAGAGTCAAAGTACGGCCACCCCTGCCAC
 CTTGTCCAGCTCCCAGTTCTGGGCGGACCCTCAGTCTTTCTCTTCCCACCTAAACCAAGGATAC
 CCTTATGATCTCCAGGACTCCTGAGGTGACCTGCGTTGTGGTTCGACGTGTCACAAGAGGACCCTGAG

GTACAGTTTAACTGGTACGTGGACGGTGTGGAGGTACATAACGCTAAGACTAAGCCACGAGAGGAGC
 AATTTAACTCCACTTACAGGGTGGTCAGCGTCTGACCGTTCTCCATCAGGACTGGCTGAACGGGAA
 GGAATATAAGTGTAAGGTTAGCAACAAAGGTCTGCCAGTTCTATCGAGAAGACAATCAGCAAGGCA
 AAAGGGCAGCCTCGGGAACCTCAGGTCTACACCCTCCCTCCTAGCCAGGAAGAGATGACAAAAGAACC
 AGGTCTCTCTCACCTGCCTGGTGAAGGCTTCTATCCATCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAATCCAA
 CGGCCAGCCTGAAAATAATTATAAGACCACACCCCCGTCCTTGATTCCGATGGATCTTTCTTCCTG
 TACAGTCGCCTCACCGTCGACAAATCACGGTGGCAGGAAGGTAACGTGTTTCAGCTGTTCTGTCATGC
 ATGAGGCTCTGCATAACCATTACACACAAAAGTCTTTGTCAATTGTCTCTCGGATGATGAGAATTCAT
 TGATCATAATCAGCCATAACCAC

SEQ ID NO: 432

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGR
 FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFYDWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST
 SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNV
 DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP[E]CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPE
 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKA
 KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

SEQ ID NO: 433

GAAGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGCTTGGTGCAGCCAGGAGGGAGCCTGCGACTGTCTTGCG
 CAGCCAGCGGATTCACCTTTCTCTTCCTATGCCATGAGCTGGGTTGACAGGCACCCGGCAAAGGTCT
 CGAGTGGGTGTCTAGCATCTGGCGAAACGGAATAGTTACAGTGTATGCCGATAGCGTGAAGGGTCGC
 TTTACTATTTTACGGGATAATTCTAAGAACACCCTCTACCTGCAAATGAATAGCCTTAGGGCAGAAG
 ATACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAATGGTCCGCAGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACACTGGT
 GACCGTGTCTCTGCATCAACCAAGGGGCCATCAGTGTTCCTCACTCGCCCCATCTTCCAAGAGTACT
 TCCGGCGGAACCGCAGCCCTTGGCTGCCTTGTTAAGGACTATTTCCCAGAACCCGTGACCGTAAGTT
 GGAACTCTGGCGCCCTTACTTCTGGGGTGCACACCTTCCCAGCAGTGTGACAGTCCAGTGGCCTTTA
 CTCTCTGTCTAGTGTAGTACTGTGCCCTTCTCTAGTCTCGGTACCCAGACCTATATTTGTAATGTT
 AACCATAAGCCCAGCAATACAAAGTTGATAAGAAAGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACATA
 CCTGCCACCTTGTCCAGCTCCCGAGCTGCTGGGCGGACCCCTCAGTCTTTCTCTTCCCACCTAAACC
 CAAGGATACCCTTATGATCTCCAGGACTCCTGAGGTGACCTGCGTTGTGGTGCAGCTGTCACATGAG
 GACCCTGAGGTAAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGTGTGGAGGTACATAACGCTAAGACTAAGCCAC
 GAGAGGAGCAATACGCTTCCACTTACAGGGTGGTACAGCGTCTGACCGTTCTCCATCAGGACTGGCT
 GAACGGGAAGGAATATAAGTGTAAGGTTAGCAACAAAGCTCTCCCTGCACCAATCGAGAAGACAATC
 AGCAAGGCAAAAGGGCAGCCTCGGGAACCTCAGGTCTACACCCTCCCTCCTAGCAGGGAAGAGATGA
 CAAAGAACCAGGTCTCTCTCACCTGCCTGGTGAAGGCTTCTATCCATCTGACATTGCTGTGGAGTG
 GGAATCCAACGGCCAGCCTGAAAATAATTATAAGACCACACCCCCGTCCTTGATTCCGATGGATCT
 TTCTTCCTGTACAGTAAACTCACCGTCGACAAATCACGGTGGCAGCAAGGTAACGTGTTTCAGCTGTT
 CTGTGATGCATGAGGCTCTGCATAACCATTACACACAAAAGTCTTTGTCAATTGTCTCCAGGATGATG
 AGAATTCATTGATCATAATCAGCCATAACCAC

SEQ ID NO: 434

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGR
 FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKWSAAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDK KVEPKS CDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY[A]STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 1202

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIWRNGIVTVYADSVKGR
 FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKWSAAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDK KVEPKS CDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVDSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY[Q]STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

Дополнительные примеры константных областей тяжелой цепи включают, не ограничиваясь этим, константную область тяжелой цепи, имеющую мутацию или делецию одной или нескольких из следующих аминокислот: Ser 228, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Asp265, Asp270, Asn297, Lys 320, Lys 322, Glu328, Pro329, Pro331, согласно индексу ЕС, изложенному Кабат, так что в результате Fc-область имеет более низкую аффинность к Fc-гамма-рецептору.

Пример 12. Оценка эффективности маскирующих фрагментов.

С помощью данного анализа оценивали способность маскирующего пептида блокировать связывание активируемого антитела с антигеном по сравнению со связыванием немодифицированного антитела с антигеном.

Общая схема данного анализа является следующей: планшеты Nunc, Maxisorp покрывают в течение ночи при 4°C из расчета 100 мкл/лунку раствором 1 ppm/мл человеческого PDL1 (R&D, Systems) в PBS, pH 7,4. Планшеты промывают 3 раза PBST (PBS, pH 7,4, 0,05% твина-20) и лунки блокируют из расчета 200 мл/лунку 10 мг/мл BSA в PBST в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают 3 раза PBST (PBS, pH 7,4, 0,05% твин-20). Кривые разбавления получают в 10 мг/мл BSA в PBST, как показано ниже в табл.10.

Таблица 10. Схема расположения образцов в планшете для анализа эффективности маскирования, один планшет на каждую временную точку

	[антитело]= нМ Ряды 1-3	[активируемое антитело 1]=нМ Ряды 4-6	[активируемо е антитело 2]=нМ Ряды 7-9	[активируемое антитело 3] = нМ Ряды 10-12
A	37	1000	1000	1000
B	12,3	333	333	333
C	4,1	111	111	111
D	1,34	37	37	37
E	0,45	12,3	12,3	12,3
F	0,15	4,1	4,1	4,1
G	0,03	1,34	1,34	1,34
H	0,01	0,45	0,45	Контроль

Растворы для оценки связывания добавляют в планшеты, которые затем инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре (RT) и затем 3 раза промывают PBST (PBS, pH 7,4, 0,05% твин-20). Добавляют 100 мкл/лунку 1:4000 разведения козьего античеловеческого IgG (Fab специфический, Sigma cat # A0293) в 10 мг/мл BSA в PBST и планшет инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет развивают с TMB и 1N HCl. На фиг. 15-17 представлены графики изотерм связывания для активируемых анти-PDL1-антител, которые включают анти-PDL1-антитело C5H9v2, описанное здесь. Графики получают с использованием программы Prizm (Sigma Plot) и данные подгоняют к модели насыщения одного сайта и определяют Kd. На фиг. 17 PL03+ является эффекторным активируемым антителом, а именно IgG1 дикого типа, которое используют в качестве положительного контроля. PL03- является эффекторным активируемым антителом, а именно мутированным IgG1 N297Q, которое используют в качестве отрицательного контроля.

Эффективность маскирования рассчитывается делением Kd для связывания активируемых антител на Kd родительского антитела. Эффективность маскирования показана на фиг. 15-17.

Пример 13. Активируемые анти-PDL1-антитела по изобретению.

Замедляют индукцию диабета у мышей NOD.

В данном примере активируемые анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2 и PL18-0003-C5H9v2 были протестированы на способность индуцировать диабет у мышей NOD. Мышей NOD, подвид NOD/ShiLtJ, получали из питомника Jackson Laboratory в возрасте 6 недель и акклиматизировали на месте. Через 9,5 недель мышей тестировали на наличие диабета до включения в опыт, разделения на группы и дозирования, как указано в табл.19.

Таблица 19. Группы и дозы в опыте с диабетом с активируемыми анти-PDL1-антителами

Группа	Количество мышей	Обработка	Доза (мг/кг)	Объемная доза (мл/кг)	Схема	Путь введения
1	8	mIgG2a (C1.18.4)	3	10	Сутки 0	в/б
2	8	анти-PDL1 (C5H9v2)	1	10	Сутки 0	в/б
3	8	анти-PDL1 (C5H9v2)	0,3	10	Сутки 0	в/б
4	8	активируемое антитело PL15-0003-C5H9v2	1	10	Сутки 0	в/б
5	8	активируемое антитело PL18-0003-C5H9v2	1	10	Сутки 0	в/б

На фиг. 18А, где представлен график зависимости % мышей без диабета от количества суток после введения начальной дозы, показано, что анти-PDL1-антитело C5H9v2 индуцировало диабет у мышей NOD при введении в дозе 1 мг/кг, в то время как активируемое анти-PDL1-антитело PL15-0003-C5H9v2 (обозначенное здесь как Gr4-PF15) не индуцировало диабет, и активируемое анти-PDL1-антитело PL18-0003-C5H9v2 (обозначенное на фиг. 18 как Gr 5-PL18) вызывало задержку развития диабета при введении в дозе 1 мг/кг. Контрольный mIgG2a и анти-PDL1-антитело C5H9v2 в дозе 0,3 мг/кг не индуцировали диабета у мышей NOD. В дополнительной группе однократная доза 3 мг/кг активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2, введенного в/б в объемной дозе 10 мл/кг, индуцировала диабет у 2 из 8 мышей (75% мышей без диабета), обеспечивая более чем трехкратный запас безопасности по сравнению с анти-PDL1-антителом C5H9v2 (группа 2). Результаты показаны на фиг. 18В.

Пример 14. Активируемые анти-PDL1-антитела по изобретению подавляют рост опухолей MC38 у мышей.

В данном примере активируемые анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2 и PL18-0003-C5H9v2 анализировали на способность подавлять рост сингенных опухолей MC38.

Клетки мышинной карциномы ободочной кишки MC38 получали из ATCC. Клетки MC38 выращивали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в воздухе. Клетки собирали во время логарифмической фазы роста, ресуспендировали в PBS с соответствующим титром клеток и оставляли на льду для индукции опухолей.

Каждой мышши прививали подкожно в правый бок $0,5 \times 10^6$ клеток MC38 в PBS для роста опухолей. Обработки начинали, когда средний размер опухолей достигал примерно 100-200 мм³ (не более 200 мм³). Размеры опухолей определяли два раза в неделю в двух измерениях с помощью штангенциркуля и объем выражали в мм³, используя формулу: $V=0,5 \times a \times b^2$, где a и b - длинный и короткий диаметры опухоли соответственно.

Мышей разделяли на группы и дозировали, как указано в табл.20.

Таблица 20. Группы и дозы в опыте с сингенными опухолями MC38 с активируемыми анти-PDL1-антителами

Группа	Количество мышей	Обработка	Доза (мг/кг)	Объемная доза (мл/кг)	Схема	Путь введения
1	9	mIgG2a (C1.18.4)	10	10	t.i.w. в течение 2 недель	в/б
2	9	анти-PDL1 (C5H9v2)	10	10	t.i.w. в течение 2 недель	в/б
4	9	PL18-0003-C5H9v2	10	10	t.i.w. в течение 2 недель	в/б
6	9	PL15-0003-C5H9v2	10	10	t.i.w. в течение 2 недель	в/б

На фиг. 19, где представлены графики зависимости объема опухолей от количества суток после введения первоначальной дозы, показано, что активируемые анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2 и PL18-0003-C5H9v2 ингибировали рост сингенных опухолей MC38, аналогично анти-PDL1-антителу C5H9v2, которое использовали в качестве положительного контроля.

Пример 15. Активируемое анти-PDL1-антитело по изобретению демонстрирует пониженную занятость PDL1 в крови и селезенке мышей C57B1/6.

В отличие от антитела, которое будет связываться с антигеном-мишенью произвольно, активируемое антитело будет молекулой, которая является инертной, если она не активируется в микросреде опухоли. После активации расщепленное активируемое антитело связывается с антигеном-мишенью только внутри опухоли, "обходя" антигены в периферических областях. PDL1 экспрессируется в опухолевых клетках, а также в Т-клетках (CD4+ и CD8+) в кровотоке и селезенке. В данном примере показано, что у животных, обработанных активируемым анти-PDL1-антителом, отсутствовало детектируемое активируемое антитело на Т-клетках на периферии, тогда у как животных, обработанных анти-PDL1-антителом, обнаруживали детектируемое дозозависимое присутствие антитела на Т-клетках на периферии.

Для определения того, насколько активируемое анти-PDL1-антитело PL15-0003-C5H9v2 защищено от связывания Т-клеток в кровотоке и селезенке по сравнению с анти-PDL1-антителом C5H9v2, мышей C57B1/6 в возрасте 14-недель (с опухолями с размером в пределах от 38-671 мм³) обрабатывали по схеме, приведенной в табл.21. Размеры опухолей определяли в двух измерениях с помощью штангенциркуля и объем выражали в мм³, используя формулу: $V=0,5 a \times b^2$, где а и b - длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Примерно через 20 ч животных подвергали эвтаназии; и у каждого животного отбирали кровь, селезенку и плазму.

Таблица 21. Группы и дозы в опыте по исследованию занятости PDL1

Группа	Количество мышей	Обработка	Доза (мг/кг)	Объемная доза (мл/кг)	Схема	Путь введения
1	2	mIgG2a (C1.18.4)	1	10	Сутки 0	в/б
2	2	Анти-PDL1 (C5H9v2)	1	10	Сутки 0	в/б
3	2	Анти-PDL1 (C5H9v2)	0,3	10	Сутки 0	в/б
4	2	Анти-PDL1 (C5H9v2)	0,1	10	Сутки 0	в/б
5	2	PL15-0003-C5H9v2	1	10	Сутки 0	в/б
6	2	PL15-0003-C5H9v2	0,3	10	Сутки 0	в/б

Цельную кровь обрабатывали следующим образом: один объем крови добавляли к 10 объемам раствора для лизиса RBC (130-094-183 Miltenyi Biotec) и обрабатывали, следуя протоколу изготовителя. Лимфоциты ресуспендировали в буфере для окрашивания (HBSS 2% FBS). Селезенку обрабатывали следующим образом: селезенку помещали на сетчатый фильтр размером 70 мкм (352350 Coming/BD Falcon) с 1 мл бессывороточной среды RPMI-1640. Задний конец 3 мл шприца использовали для раздавливания ткани селезенки круговыми движениями. Фильтр промывали средой. Спленоциты осаждали с использованием центрифуги и кровь лизировали с использованием 10 объемов раствора для лизиса RBC (130-094-183 Miltenyi Biotec), следуя протоколу изготовителя. Спленоциты повторно фильтровали после ресуспендирования в буфере для окрашивания (HBSS 2% FBS). Подсчитывали количество лимфоцитов из

цельной крови и лимфоцитов из селезенки и аликвотные порции разливали в лунки 96-луночных круглодонных планшетов (5e5 клеток/лунку). Клетки центрифугировали и добавляли реагент мышиный FcR 1:10, следуя протоколу изготовителя (130-092-575 Miltenyi Biotec). Один ряд клеток окрашивали насыщенным количеством, 100 нМ, анти-PDL1-антитела C5H9v2 в течение 60 мин для получения максимального значения насыщения. Клетки промывали 3 раза и окрашивали биотинилированным "а" аллотипным антителом, анти-mIgG2a-антителом (а) клон 8.3 (553502 BD Biosciences) при 300 нг/мл в течение 60 мин. Клетки промывали 3 раза и затем окрашивали 1 мкг/мл (также относится здесь к "мкг/мл") анти-CD4-Pacific Blue (558107 BD Bioscience), 1 мкг/мл анти-CD8-APC (553035 BD Bioscience) и 1:500 разведения SAPE (S-866 Life Technologies) в течение 30 мин. Клетки промывали 2 раза и окрашивали 7-ААД, следуя протоколу изготовителя (559925 BD Bioscience). Проточный цитометр MACSQuant использовали для измерения количества анти-PDL1-антитела C5H9v2 и активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2, связанного с Т-клетками из цельной крови и селезенки. Вкратце, собирали максимально 30000 событий в гейте лимфоцитов. Живые клетки гейтировали из отрицательного гейта 7ААД. Клетки CD4+ и CD8+ выделяли по отдельности, и анти-PDL1 mAb и активируемое анти-PDL1-антитело MFI регистрировали для CD4 и CD8. Процентную занятость определяли отбором MFI образца по сравнению со средним значением MFI для максимального связывания MFI. На фиг. 20А-Д показан процент анти-PDL1-антитела C5H9v2 и активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2, связанных с CD4+ и CD8+ Т-клетками из периферической крови (фиг. 20А, 20В) или селезенки (фиг. 20С, 20D). На всех графиках кружки обозначают изотипное антитело, квадраты обозначают анти-PDL1-антитело C5H9v2, и треугольники обозначают активируемое анти-PDL1-антитело PL15-0003-C5H9v2. Процентная занятость анти-PDL1-антитела C5H9v2 была отражением титрования дозы. Процентная занятость активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2 при концентрации 1 мг/кг была аналогичной этому показателю для изотипного контрольного mIgG2a при 1 мг/кг.

Пример 16. Активируемое анти-PDL1-антитело по изобретению демонстрирует пониженную занятость PDL1 в крови и селезенке мышей C57B1/6.

В данном примере показано, что у животных, обработанных активируемым анти-PDL1-антителом по настоящему изобретению, имеется пониженное связывание с Т-клетками крови от мышей, несущих опухоль, по сравнению с мышами, которые обработаны анти-PDL1-антителом по изобретению в различных дозах.

Исследование проводили аналогично тому, как описано в примере 15. Вкратце, мышам, несущих опухоли MC38, с размером в диапазоне 100-200 мм³, обрабатывали однократной дозой анти-PDL1-антитела C5H9v2 или активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2, как показано на фиг. 21А и В и через 4 суток после введения кровь анализировали на поверхностно связанное антитело с помощью проточной цитометрии. Концентрации антитела и активируемого антитела в плазме определяли с помощью ELISA. На фиг. 21А и В показано, что присутствие протеаз, происходящих из опухоли, способных расщеплять активируемое антитело, не приводило к высоким уровням активированного активируемого антитела в крови (фиг. 21А); т.е. активируемое антитело (показано квадратами) демонстрировало снижение периферического связывания PDL1 у мышей, несущих опухоль, по сравнению с антителом (показано кружками) или изотипным антителом (показано треугольниками), несмотря на то, что концентрации активируемого антитела в плазме были выше, чем концентрации антитела (фиг. 21В).

Пример 17. Активность вариантов осуществления анти-PDL1-антитела и активируемого анти-PDL1-антитела в тесте повторной стимуляции человеческих Т-клеток.

В данном примере мононуклеарные клетки периферической крови от CMV-положительного донора инкубировали в присутствии CMV-лизата и анти-PDL1-антитела или активируемого анти-PDL1-антитела по изобретению для оценки влияния такого анти-PDL1-антитела или активируемого анти-PDL1-антитела на секрецию цитокина интерферона-гамма (IFN-гамма).

PBMC от CMV-положительного донора (Немасаре Donor С) вносили в лунки планшета из расчета $3,5 \times 10^5$ клеток на лунку в присутствии 4 мкг/мл CMV-вирусного лизата (Astarte) и анти-PDL1-антитела C5H9v2, активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2 или антитела контрольного изотипа hIgG4. Через четверо суток супернатант извлекали из каждой лунки и анализировали уровни IFN-гамма с использованием набора ELISA для определения IFN-гамма (Life Technologies, Carlsbad, CA). На фиг. 22 показано, что активируемое анти-PDL1-антитело PL07-2001-C5H9v2 проявило повышенную CMV-стимулированную секрецию IFN-гамма по сравнению с контролем hIgG4, но снижало активность по сравнению с родительским анти-PDL1-антителом C5H9v2 за счет того, что активируемое антитело было маскированным.

Пример 18. Визуализация *in situ* активируемого анти-PDL1-антитела по изобретению.

В данном примере показана способность активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2 к активации и связыванию с замороженными тканями мышечных опухолей MC38 с использованием метода визуализации *in situ*.

Флуоресцентно меченное активируемое анти-PDL1-антитело PL15-0003-C5H9v2 или анти-PDL1-антитело C5H9v2 инкубировали на замороженных срезах опухоли PDL1+ MC38 в течение 1 ч в буфере, совместимом с протеазой, в присутствии или в отсутствии смеси ингибиторов протеаз широкого спектра

как описано в публикации международной заявки PCT WO 2014/107599, опубликованной 10 июля 2014 г.

Результаты представлены на фиг. 23. Изображение ткани на фиг. 23А показывает связывание анти-PDL1-антитела C5H9v2 со срезом опухоли, указывая на присутствие антигена PDL1 в опухолевом срезе. Изображение ткани на фиг. 23В демонстрирует, что активируемое анти-PDL1-антитело PL15-0003-C5H9v2 активировалось в результате протеолитического расщепления опухолью активируемого анти-PDL1-антитела с образованием анти-PDL1-антитела, которое связывалось с мишенью PDL1 в опухолевом срезе. Изображение ткани на фиг. 23D демонстрирует, что флуоресцентный сигнал, показанный на фиг. 23В, ингибировался предварительной обработкой опухолевого среза смесью ингибиторов протеаз широкого спектра III и 50 мМ ЭДТА в разведении 1:100, в то время как эффект смеси ингибиторов протеаз широкого спектра не был обнаружен при связывании анти-PDL1-антитела C5H9v2 с опухолевым срезом, как показано на изображении ткани на фиг. 23С. Данные результаты свидетельствуют о том, что опухолевые срезы обладают достаточной протеазной активностью для активации активируемых антител по изобретению.

Пример 19. Способность активируемого антитела по изобретению проявлять зависимое от протеазы связывание и блокирование активности *in vitro*.

В данном примере показана способность активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2 проявлять зависимое от протеазы связывающую и блокирующую активность *in vitro*.

Опыты по изучению связывания и блокирования проводили с анти-PDL1-антителом C5H9v2 и активируемым анти-PDL1-антителом PL15-0003-C5H9v2 методом, аналогичным описанному в других примерах, за исключением того, что планшеты покрывали 0,5 мкг/мл PDP1.

На фиг. 24 показано, что активируемое анти-PDL1-антитело PL15-0003-C5H9v2 имело более высокое значение EC_{50} для связывания PDL1 и блокирования PD1, чем анти-PDL1-антитело, что было определено с помощью ELISA. На фигуре также показано, что активация активируемого анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2 матриптазой полностью восстанавливала связывание PDL1 и блокирование PD1 до уровней, сравнимых с уровнями для анти-PDL1-антитела C5H9v2.

Пример 20. Способность активируемого анти-PDL1-антитела по изобретению снижать связывание с PDL1 и проявлять зависимую от протеазы блокирующую активность *in vitro*.

В данном примере оценена способность маскирующего пептида снижать связывание активируемого анти-PDL1-антитела по изобретению с PDL1 по сравнению со способностью родительского антитела связываться с PDL1 *in vitro*. Данный пример также демонстрирует способность активируемого анти-PDL1-антитела по изобретению проявлять зависимую от протеазы блокирующую активность *in vitro*.

Тестировали способность активируемых анти-PDL1-антител PL07-2001-C5H9v2 и PF07-3001-C5H9v2 и анти-PDL1-антитела C5H9 связываться с человеческим или мышинным PDL1 методом, аналогичным методам, описанным в других примерах. Результаты показаны на фиг. 25.

Тестировали способность активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2, uPA-активированного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2, MMP14-активированного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2 и анти-PBL1-антитела C5H9v2 блокировать связывание PD1 (PD-1) или B7-1 с PDL1 с использованием метода, аналогичного методам, описанным в других примерах.

Вкратце, для анализа блокирования PD1 человеческий PDL1, PDL1 обезьяны циномоглус или крысиный PDL1 вносили в лунки планшета для постановки ELISA. В лунки вносили биотинилированный человеческий PD1, PD1 обезьяны циномоглус или крысиный PD1 в отсутствие или в присутствии возрастающей концентрации активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2, uPA-активированного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2, MMP14-активированного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2 или анти-PDL1-антитела C5H9v2. Результаты, показанные на фиг. 26, свидетельствуют о том, что активируемое антитело PF07-2001-C5H9v2 имело более высокое значение EC_{50} для блокирования PB1, чем анти-PDL1-антитело, что было определено с помощью ELISA. Однако активация активируемого антитела под действием uPA или MMP14 восстанавливала блокирующую активность для PB1 до уровней, сравнимых с уровнями для анти-PDL1-антитела C5H9v2.

Вкратце, для анализа блокирования B7-1, человеческий PDL1 или PDL1 обезьяны циномоглус адсорбировали в лунках планшета для постановки ELISA. В лунки вносили биотинилированный человеческий B7-1 или B7-1 обезьяны циномоглус, в отсутствие или в присутствии возрастающей концентрации активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2, uPA-активированного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2, MMP14-активированного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2 и анти-PDL1-антитела C5H9v2. Результаты, приведенные на фиг. 27, показывают, что активируемое антитело PF07-2001-C5H9v2 имело более высокое значение EC_{50} для блокирования B7-1, чем анти-PDL1-антитело, что было определено с помощью ELISA. Однако активация активируемого антитела под действием uPA или MMP14 восстанавливала блокирующую активность для B7-1 до уровней, сравнимых с уровнями для анти-PBL1-антитела C5H9v2.

Пример 21. Активируемые анти-PDL1-антитела по изобретению подавляют рост опухолей MC38 у мышей.

В данном примере тестировали способность активируемых анти-PDL1-антител PL15-0003-C5H9v2,

PL15-2001-C5H9v2 и PL15-3001-C5H9v2 подавлять рост сингенных опухолей MC38.

Клетки мышинной карциномы ободочной кишки MC38 получали из АТСС. Клетки MC38 выращивали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в воздухе. Клетки собирали во время логарифмической фазы роста, ресуспендировали в PBS с соответствующим титром клеток и оставляли на льду для индукции опухолей.

Каждой мышке прививали подкожно в правый бок $0,5 \times 10^6$ клеток MC38 в PBS для роста опухолей. Обработки начинали, когда средний размер опухолей достигал примерно 100-200 мм³ (не более 200 мм³). Размеры опухолей определяли два раза в неделю в двух измерениях с помощью штангенциркуля и объем выражали в мм³, используя формулу $V=0,5 \times a \times b^2$, где a и b - длинный и короткий диаметры опухоли соответственно.

Мышей разделяли на группы и дозировали, как указано в табл.24.

Таблица 24. Группы и дозы в опыте с сингенными опухолями MC38 с активизируемыми анти-PDL1-антителами

Группа	Количество мышей	Обработка	Доза (мг/кг)	Объемная доза (мл/кг)	Схема	Путь введения
1	9	mIgG2a (C1.18.4)	5	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
2	9	анти-PDL1 (C5H9v2)	5	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
3	9	PL15-0003- C5H9v2	5	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
4	9	PL15-2001- C5H9v2	5	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
5	9	PL15-3001- C5H9v2	5	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б

На фиг. 28, где представлены графики зависимости объема опухолей от количества суток после введения начальной дозы, показано, что активизируемые анти-PDL1-антитела PL15-0003-C5H9v2, PL15-2001-C5H9v2 и PL15-3001-C5H9v2 ингибировали рост сингенных опухолей MC38 аналогично анти-PDL1-антителу C5H9v2, которое использовали в качестве положительного контроля.

Пример 22. Активируемое анти-PDL1-антитело по изобретению демонстрирует пониженную занятость PDL1 в крови мышей C57B1/6.

В данном примере показано, что у животных, обработанных активизируемыми анти-PDL1-антителами по настоящему изобретению имеет место пониженное связывание с Т-клетками крови от мышей, несущих опухоль, по сравнению с животными, обработанными анти-PDL1-антителом по изобретению.

Исследование проводили аналогично тому, как описано в примере 15. Вкратце, мышам, несущим опухоли MC38, с размером в диапазоне 100-200 мм³, обрабатывали однократной дозой анти-PDL1-антителом C5H9v2 или активизируемым анти-PDL1-антителом PL15-0003-C5H9v2, PL15-2001-C5H9v2 или PL15-3001-C5H9v2, как указано в табл.25, и кровь анализировали на антитело, связанное с поверхностью, с помощью проточной цитометрии через четыре и восемь суток после введения. Процентную занятость рассчитывали, как описано в примере 15.

Таблица 25. Группы и дозы в опыте по исследованию занятости PDL1

Группа	Количество мышей	Обработка	Доза (мг/кг)	Объемная доза (мл/кг)	Схема	Путь введения
1	9	mIlgG2a (C1.18.4)	5	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
2	9	анти-PD-L1 (C5H9v2)	5	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
3	9	анти-PD-L1 (C5H9v2)	3	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
4	9	PL15-0003-C5H9v2	5	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
5	9	PL15-0003-C5H9v2	3	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
6	9	PL15-2001-C5H9v2	5	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
7	9	PL15-2001-C5H9v2	3	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
8	9	PL15-3001-C5H9v2	5	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б
9	9	PL15-3001-C5H9v2	3	10	b.i.w.; 4 дозы	в/б

Концентрацию антитела и активируемых антител в плазме крови определяли с помощью ELISA. На фиг. 29 показано, что присутствие протеаз, происходящих из опухолей, способных расщеплять активируемые антитела, не приводило к высоким уровням активированных активируемых антител в крови.

Пример 23. Визуализация *in vivo* активируемого анти-PDL1-антитела по изобретению.

В данном примере показана способность протеаз в опухоли, имплантированной мышши, активировать активируемое анти-PDL1-антитело по изобретению.

Для этих исследований была использована модель ксенотрансплантата ортотопической опухоли молочной железы MDA-MB-231-luc2. Мышей самок nu/nu получали из питомника Charles River Laboratories в возрасте 7 недель. Через 1 неделю акклиматизации 3 млн клеток MDA-MB-231-luc2-4D3LN (Perkin Elmer) в 30 мкл (μl также относится здесь к мкл) в бессывороточной среде RPMI (1:1 matrigel) вводили в четвертую абдоминальную левую жировую подушку молочной железы. Опухоли росли до размера 110-159 мм³. Трех мышам на группу вводили внутривенно 5 мг/кг A1exa750-конъюгированного анти-PDL1-антитела C5H9v2 или активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2. Четырем мышам вводили внутривенно 5 мг/кг контрольного A1exa750-конъюгированного анти-RSV-антитела, паливизумаба (Synagis). Через 96 ч после введения получали оптические изображения каждой мыши. Результаты представлены на фиг. 30. Высокоинтенсивный флуоресцентный сигнал был обнаружен только в опухолях мышей, которым вводили анти-PDL1-антитело или активируемое анти-PDL1-антитело PL07-2001-C5H9v2, на основании чего можно предположить, что активируемое анти-PDL1-антитело было активировано и накапливалось в опухоли за счет связывания с PDL1.

Пример 24. Активация активируемого антитела по изобретению в образцах плазмы крови человека.

В данном примере определяли, насколько активируется активируемое антитело по изобретению в образцах плазмы человека.

Активируемое анти-PDL1-антитело PL07-2001-C5H9v2 конъюгировали с красителем орегон зеленый (ThermoFisher Cat # 06149). Концентрацию и степень мечения определяли на спектрофотометре. 3 мкМ (также относится здесь к "дкМ") меченного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2 вносили в образцы плазмы, полученные от здоровых доноров, пациентов с меланомой или пациентов с раком легкого, в конечном соотношении активируемого антитела к плазме 30:70. Образцы инкубировали в течение 48 ч во влажной камере с температурой 37°C. Реакции меченного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2 в плазме останавливали через 0 или 48 ч замораживанием образцов при -80°C или денатурацией в буферном растворе Wes (ProteinSimple Cat#PS-MK14). Образцы анализировали с помощью капиллярной системы вестерн-блоттинга Wes (ProteinSimple) с использованием антител против красителя орегон зеленый (ThermoFisher Cat#A-11095 при 100 мкг/мл) с последующим использова-

нием конъюгированного с HRP вторичного антитела (Jackson ImmunoResearch Cat # 705-035-147 при разведении 1/40). Анализ процентной активации меченного активируемого анти-PDL1-антитела PL07-2001-C5H9v2 определяли с использованием программного обеспечения Compass (ProteinSimple).

Не было выявлено детектируемой активации активируемого антитела в пяти образцах здоровых пациентов, в пяти образцах от пациентов с меланомой (три метастаза в лимфатических узлах, два в головном мозге и один на коже спины), в пяти образцах от пациентов с раком легких (один метастаз в нижней доле левого легкого (стадия IV), один в нижней доле правого легкого (стадия IV), один в верхней доле левого легкого (стадия IA) и два в верхней доле правого легкого (стадии IIIA и IB).

Другие варианты осуществления

Несмотря на то, что изобретение было описано в сочетании с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации и не ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в объеме следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Активируемое антитело, которое в активированном состоянии специфически связывается с PDL1 млекопитающего, где указанное активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с PDL1 млекопитающего, где AB содержит:

(a) определяющую комплементарность область 1 переменного домена тяжелой цепи (VH CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212;

(b) определяющую комплементарность область 2 переменного домена тяжелой цепи (VH CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246;

(c) определяющую комплементарность область 3 переменного домена тяжелой цепи (VH CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235;

(d) определяющую комплементарность область 1 переменного домена легкой цепи (VL CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209;

(e) определяющую комплементарность область 2 переменного домена легкой цепи (VL CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей SEQ ID NO: 215 и 227; и

(f) определяющую комплементарность область 3 переменного домена легкой цепи (VL CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228;

маскирующий фрагмент (MM), который ингибирует связывание AB с PDL1 млекопитающего, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, где MM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59-81, 208 и 426; и

расщепляемый фрагмент (CM), образующий пару с AB, где CM представляет полипептид, который действует в качестве субстрата для протеазы, где CM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 338-394 и 435-445, 883-921, 1009 и 1010;

где MM связан с CM так, что активируемое антитело в нерасщепленном состоянии содержит следующий порядок структур от N-конца к C-концу:

MM-CM-AB или AB-CM-MM.

2. Активируемое антитело, которое в активированном состоянии специфически связывается с PDL1 млекопитающего, где указанное активируемое антитело содержит

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с PDL1 млекопитающего, где AB содержит:

(a) определяющую комплементарность область 1 переменного домена тяжелой цепи (VH CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212;

(b) определяющую комплементарность область 2 переменного домена тяжелой цепи (VH CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246;

(c) определяющую комплементарность область 3 переменного домена тяжелой цепи (VH CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235;

(d) определяющую комплементарность область 1 переменного домена легкой цепи (VL CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209;

(e) определяющую комплементарность область 2 переменного домена легкой цепи (VL CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей SEQ ID NO: 215 и 227; и

(f) определяющую комплементарность область 3 переменного домена легкой цепи (VL CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228;

маскирующий фрагмент (MM), который ингибирует связывание AB с PDL1 млекопитающего, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, где MM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 59-81, 208 и 426; и

расщепляемый фрагмент (СМ), образующий пару с АВ, где СМ представляет полипептид, который действует в качестве субстрата для протеазы, где СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 338-394 и 435-445, 883-921, 1009 и 1010;

где ММ связан с СМ так, что активируемое антитело в нерасщепленном состоянии содержит следующий порядок структур от N-конца к С-концу:

ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ,

где активируемое антитело содержит одно или несколько из следующих:

(i) где активируемое антитело содержит линкерный пептид между ММ и СМ;

(ii) где активируемое антитело содержит линкерный пептид между СМ и АВ;

(iii) где активируемое антитело содержит первый линкерный пептид (LP1) и второй линкерный пептид (LP2) и где активированное антитело в нерасщепленном состоянии содержит следующий порядок структур от N-конца до С-конца:

ММ-LP1-СМ-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ-LP1-ММ;

(iv) где два линкерных пептида необязательно должны быть идентичны друг другу; и

(v) где каждый LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной примерно 1-20 аминокислот.

3. Активируемое антитело по п.1 или 2,

где активируемое антитело ингибирует индукцию диабета 1 типа у мыши NOD по меньшей мере в 3 раза сильнее по сравнению с АВ, и/или

где активируемое антитело обладает окном безопасности, которое по меньшей мере в три раза больше окна безопасности АВ.

4. Активируемое антитело по п.1 или 2,

где активируемое антитело в нерасщепленном состоянии связывается с меньшим процентом популяции CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови, чем АВ, и/или

где CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоциты периферической крови являются мышинными; и/или

где мышинные CD4⁺ CD8⁺ Т-лимфоциты периферической крови получены у мыши с опухолью.

5. Активируемое антитело по п.1 или 2, где АВ содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 48, 50, 52, 54 и 56, и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 58; или

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

6. Активируемое антитело по любому из пп.1-5,

где СМ представляет субстрат для протеазы, которая активна в больной ткани; и/или

где СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 377-394, 883-921, 1009 и 1010.

7. Активируемое антитело по любому из пп.1-6, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, scFv, scAb, dAb, однодоменного антитела на основе тяжелой цепи и однодоменного антитела на основе легкой цепи.

8. Активируемое антитело по любому из пп.1-7,

где АВ связан с СМ; и/или

где АВ напрямую связан с СМ; и/или

где АВ связан с СМ через линкерный пептид.

9. Активируемое антитело по п.1 или 2, где активируемое антитело содержит линкерный пептид между ММ и СМ.

10. Активируемое антитело по п.1 или 2, где активируемое антитело содержит линкерный пептид между СМ и АВ.

11. Активируемое антитело по п.1 или 2, где активируемое антитело содержит первый линкерный пептид (LP1) и второй линкерный пептид (LP2) и где активированное антитело в нерасщепленном состоянии содержит следующий порядок структур от N-конца до С-конца:

ММ-LP1-СМ-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ-LP1-ММ.

12. Активируемое антитело по п.11, где два линкерных пептида необязательно должны быть идентичны друг другу.

13. Активируемое антитело по п.11, где каждый LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной примерно 1-20 аминокислот.

14. Конъюгат активируемого антитела, содержащий активируемое антитело по любому из пп.1-13, конъюгированное с агентом,

где агент представляет токсин или его фрагмент; и/или

где агент представляет собой ингибитор микротрубочек; и/или

где агент является агентом, повреждающим нуклеиновую кислоту; и/или

где агент выбран из группы, состоящей из доластатина или его производного, ауристинина или его производного, майтанзиноида или его производного, дуокармицина или его производного, а также кали-

хеамицина или его производного; и/или

где агент представляет ауристатин E или его производное; и/или

где агент представляет монометилауристатин E (ММАЕ); и/или

где агент представляет монометилауристатин D (ММАД); и/или

где агент представляет майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4; и/или

где агент конъюгирован с активируемым антителом через линкер; и/или

где линкер представляет расщепляемый линкер; и/или

где линкер представляет собой нерасщепляемый линкер.

15. Конъюгат по п.14, где агент представляет детектируемую группу.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая

активируемое антитело по любому из пп.1-13 или конъюгат по п.14 или 15 и носитель или

активируемое антитело по любому из пп.1-13 или конъюгат по п.14 или 15 и дополнительный агент, где дополнительный агент представляет терапевтический агент.

17. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая активированное антитело по любому из пп.1-13.

18. Вектор экспрессии, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.17.

19. Способ получения активируемого антитела путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела, где клетка содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п.17.

20. Способ получения активируемого антитела по любому из пп.1-13, которое в активированном состоянии связывается с PDL1, где способ включает:

(а) культивирование клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует активируемое антитело в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела; и

(b) выделение активируемого антитела.

21. Способ снижения активности PDL1 или блокирования связывания природного лиганда с PDL1 при опосредованном PDL1 расстройстве или заболевании, включающий введение эффективного количества активируемого антитела по любому из пп.1-13, конъюгата по п.14 или 15 или фармацевтической композиции по п.16 больному;

где опосредуемое PDL1 расстройство или заболевание представляет собой злокачественное новообразование;

где злокачественное новообразование представляет рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, карциноид, рак шейки матки, рак кишечника, рак эндометрия, глиому, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечноклеточный рак, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, уrogenитальный рак и/или уротелиальный рак;

где злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из меланомы (MEL), почечноклеточной карциномы (RCC), плоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), неплоскоклеточного NSCLC, колоректального рака (CRC), кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC), гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), плоскоклеточной карциномы головы и шеи, карцином пищевода, яичника, органов желудочно-кишечного тракта и молочной железы или гематологического злокачественного заболевания, такого как множественная миелома, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина/первичная медиастинальная В-клеточная лимфома и хронический миелоидный лейкоз;

где способ включает введение дополнительного агента,

где дополнительный агент представляет собой терапевтический агент.

22. Способ получения конъюгата по любому из пп.14 или 15, который в активированном состоянии связывается с PDL1, где способ включает:

(а) культивирование клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, которая кодирует активируемое антитело в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела;

(b) выделение активируемого антитела; и

(с) конъюгирование агента с выделенным активируемым антителом,

где агент представляет собой токсин или его фрагмент; и/или

где агент представляет собой ингибитор микротрубочек; и/или

где агент является агентом, повреждающим нуклеиновую кислоту; и/или

где агент выбран из группы, состоящей из доластатина или его производного, ауристатина или его производного, майтанзиноида или его производного, дуокармицина или его производного, а также калихеамицина или его производного; и/или

где агент представляет ауристатин E или его производное; и/или

где агент представляет монометилауристатин E (ММАЕ); и/или

где агент представляет монометилауристатин D (ММАД); и/или

где агент представляет майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4; и/или

где агент конъюгирован с активируемым антителом через линкер; и/или

где линкер представляет расщепляемый линкер; и/или
 где линкер представляет собой нерасщепляемый линкер.

23. Способ лечения, уменьшения симптомов или замедления прогрессирования опосредованного PDL1 расстройства или заболевания, включающий введение эффективного количества активируемого антитела по любому из пп.1-13, конъюгата по п.14 или 15 или фармацевтической композиции по п.16 больному,

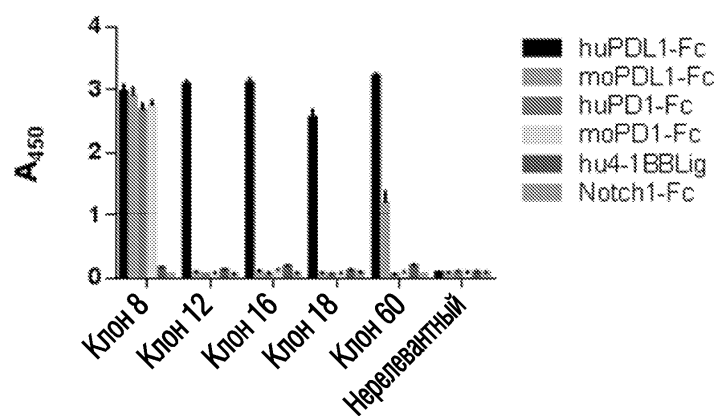
где опосредуемое PDL1 расстройство или заболевание представляет собой злокачественное новообразование;

где злокачественное новообразование представляет рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, карциноид, рак шейки матки, рак кишечника, рак эндометрия, глиому, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечноклеточный рак, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, уrogenитальный рак и/или уротелиальный рак;

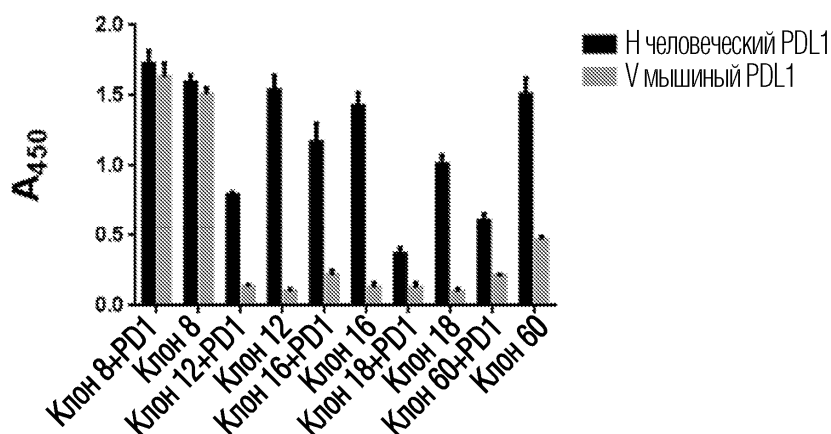
где злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из меланомы (MEL), почечноклеточной карциномы (RCC), плоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), неплоскоклеточного NSCLC, колоректального рака (CRC), кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC), гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), плоскоклеточной карциномы головы и шеи, карцином пищевода, яичника, органов желудочно-кишечного тракта и молочной железы или гематологического злокачественного заболевания, такого как множественная миелома, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина/первичная медиастинальная В-клеточная лимфома и хронический миелоидный лейкоз;

где способ включает введение дополнительного агента,

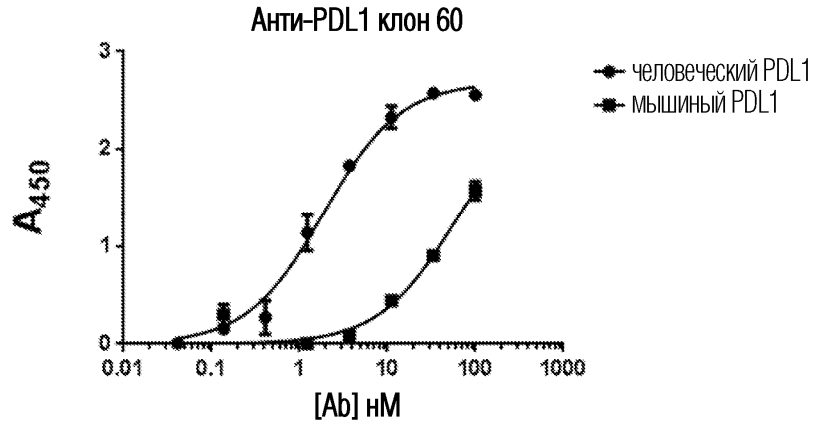
где дополнительный агент представляет собой терапевтический агент.



Фиг. 1

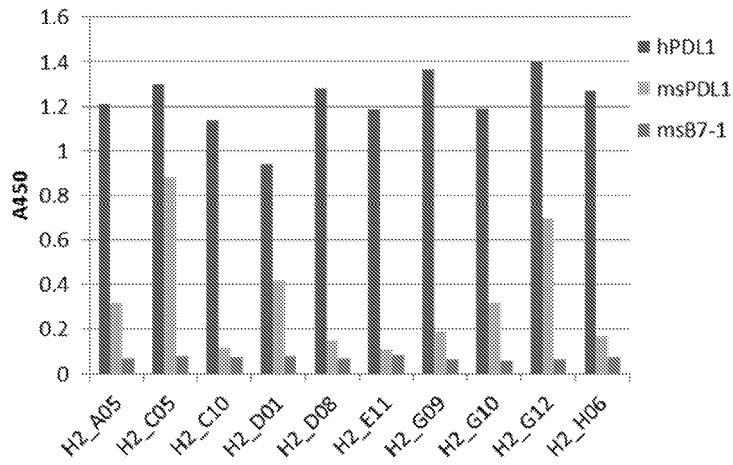


Фиг. 2



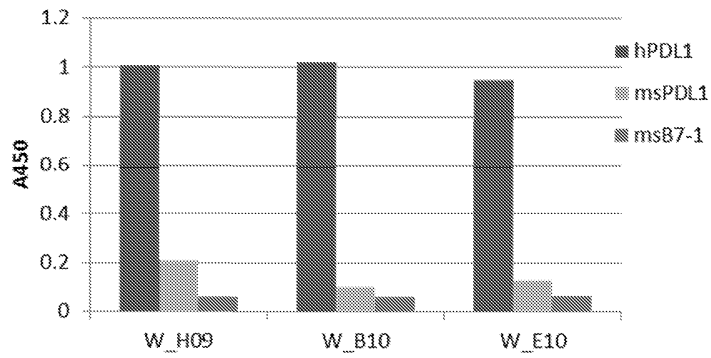
Фиг. 3

Специфичность & перекрестная активность



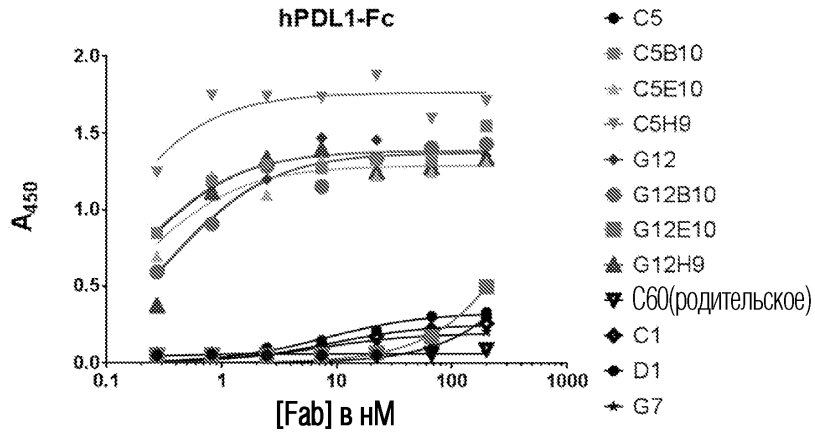
Фиг. 4А

Специфичность перекрестная активность НЗW

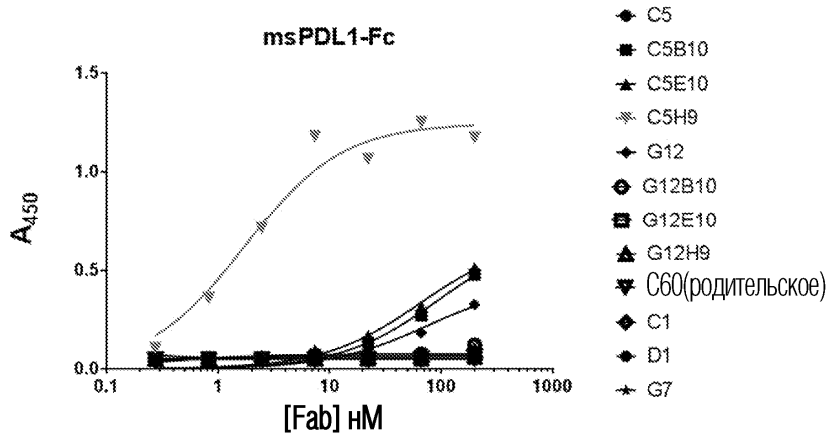


Библиотека НЗW

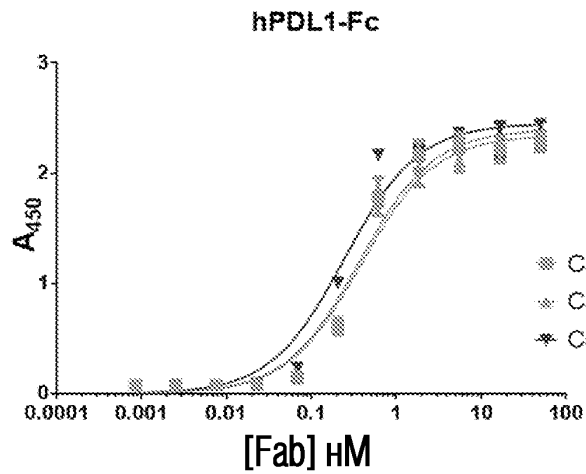
Фиг. 4В



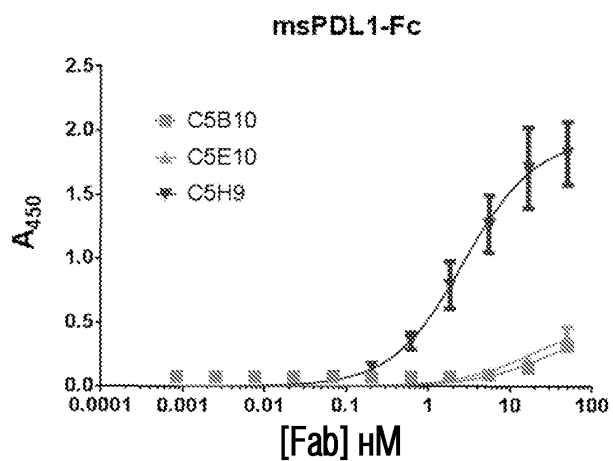
Фиг. 5А



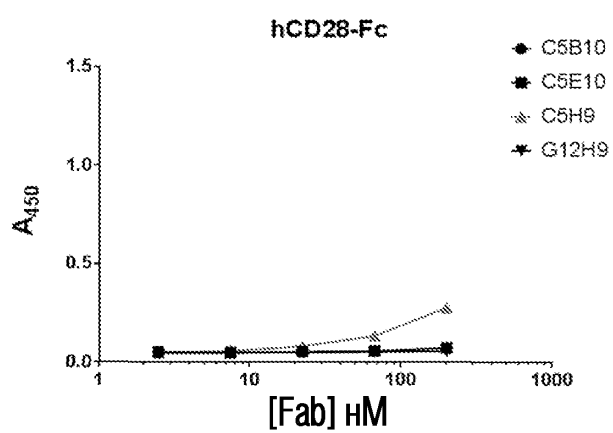
Фиг. 5В



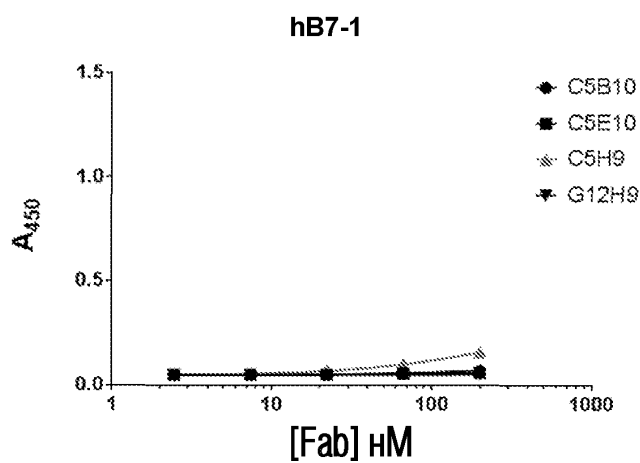
Фиг. 6А



Фиг. 6B

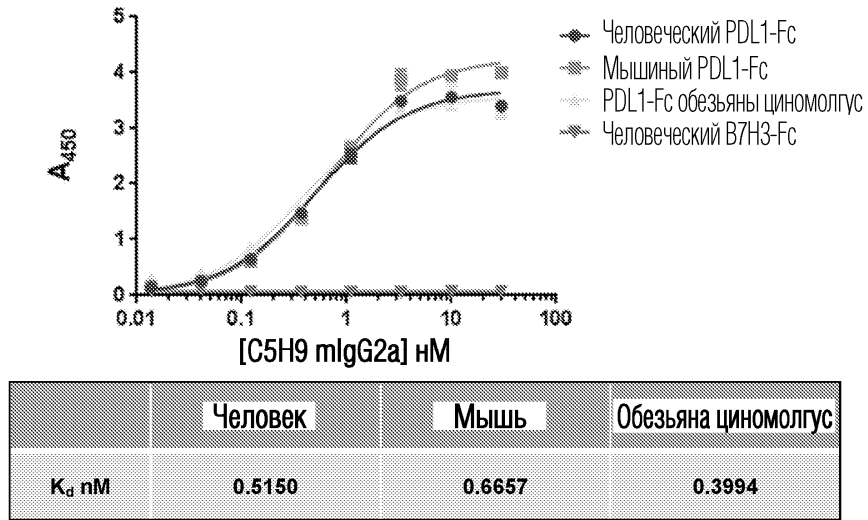


Фиг. 6C

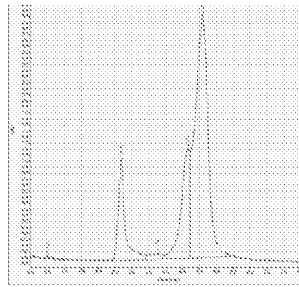
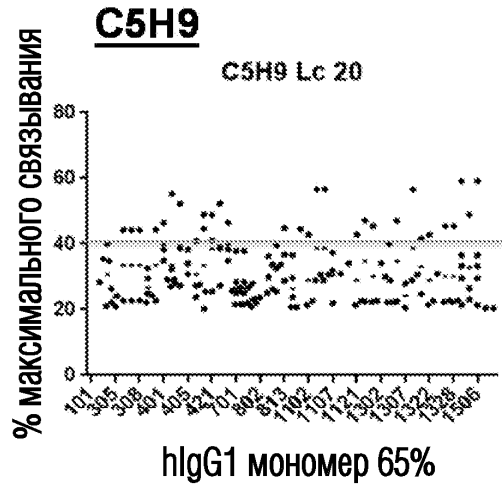


Фиг. 6D

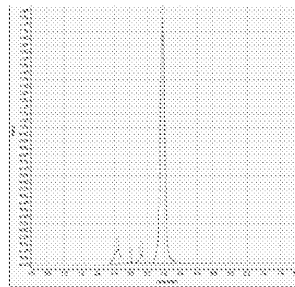
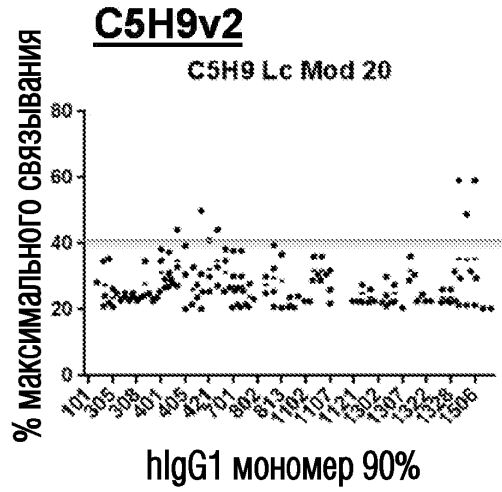
039736



Фиг. 7

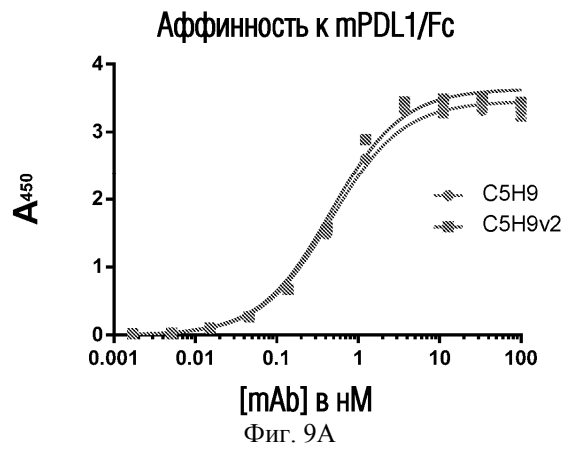


Фиг. 8А

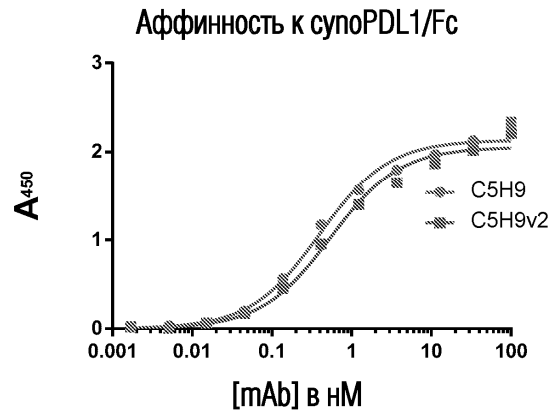


Фиг. 8В

Мышь

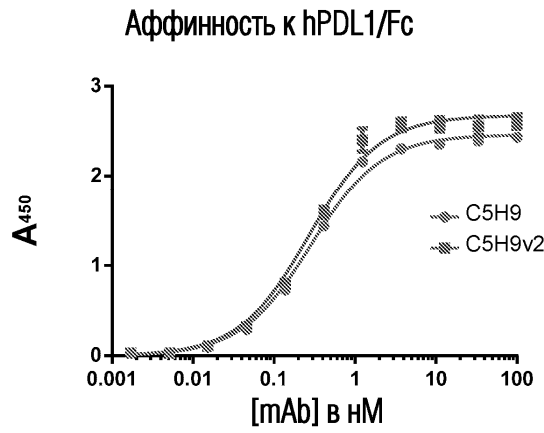


Обезьяна циномогус



Фиг. 9B

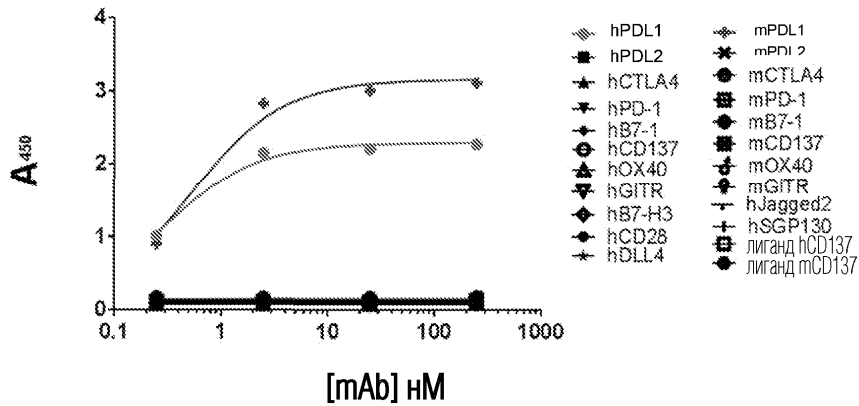
Человек



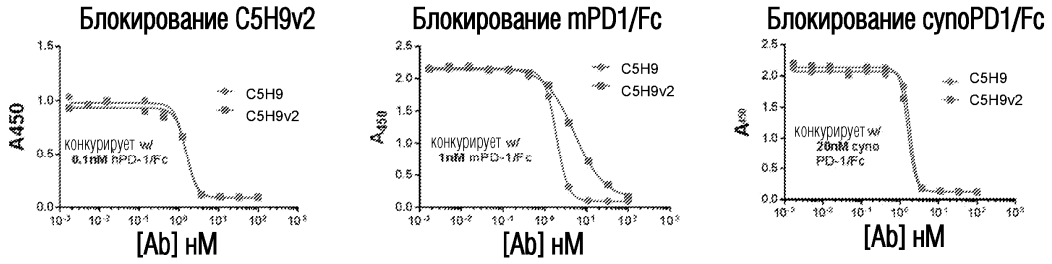
	Kd (нМ)	
	C5H9	C5H9v2
Мышь	0.4754	0.4637
Обезьяна циномогус	0.3981	0.5439
Человек	0.2865	0.2716

Фиг. 9C

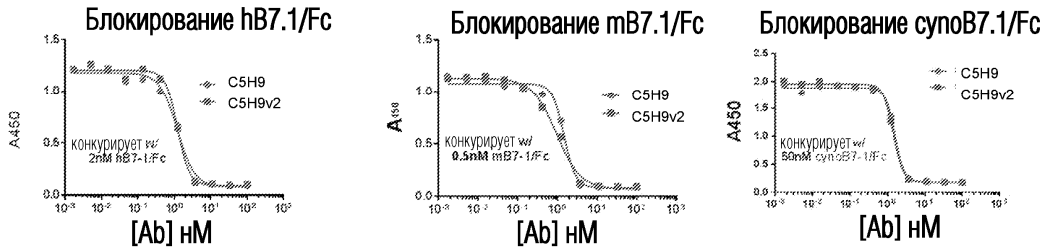
Специфичность C5H9v2



Фиг. 10

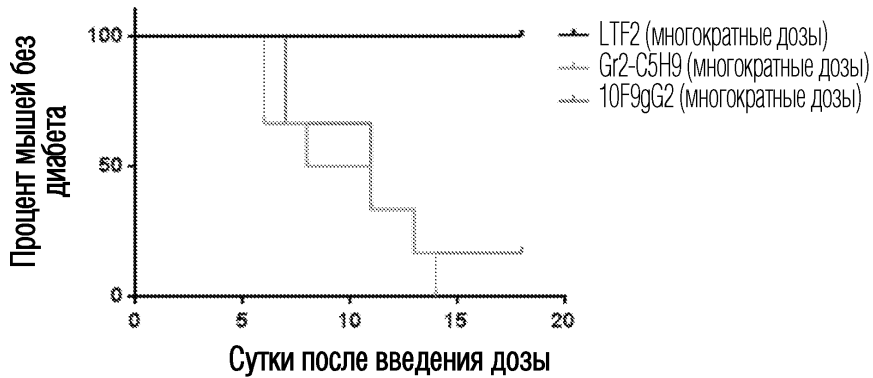


	hPD1-Fc	mPD1-Fc	supоPD1-Fc	hB7.1-Fc	mB7.1-Fc	supоB7.1-Fc
C5H9v1	1.5	1.9	1.9	1.2	1.5	1.6
C5H9v2	1.6	5.2	1.6	1.2	0.9	1.4



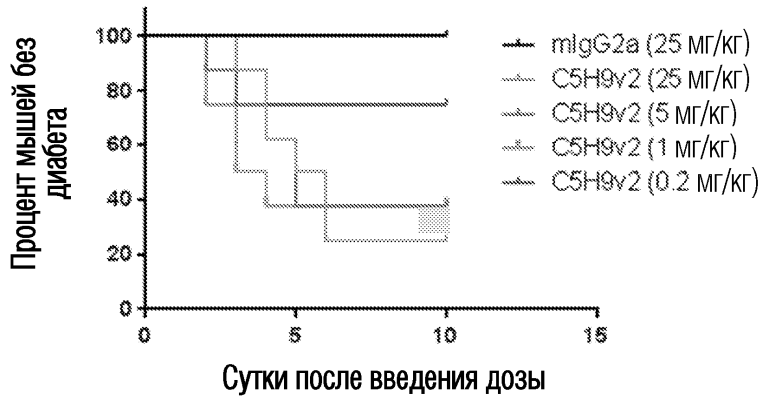
Фиг. 11

C5H9 против 10F9G2 (многократные дозы)



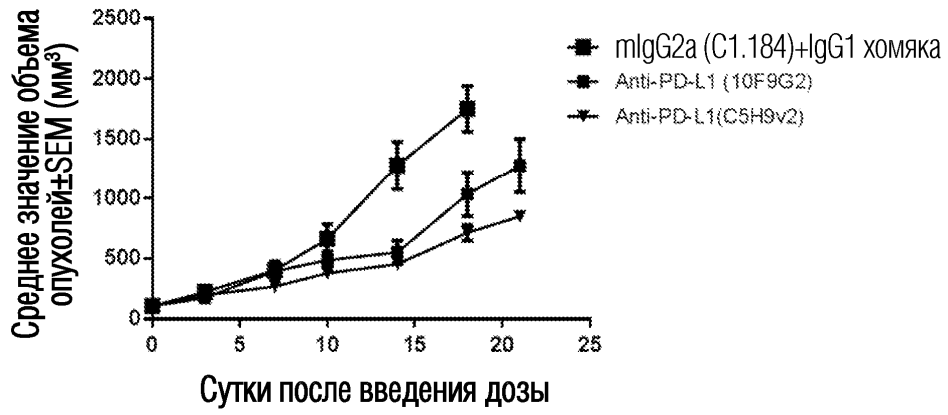
Фиг. 12

**Анти-PDL1-антитело у 9-недельных
мышей самок NOD
Титрация доз C14-055-C5H9v2**

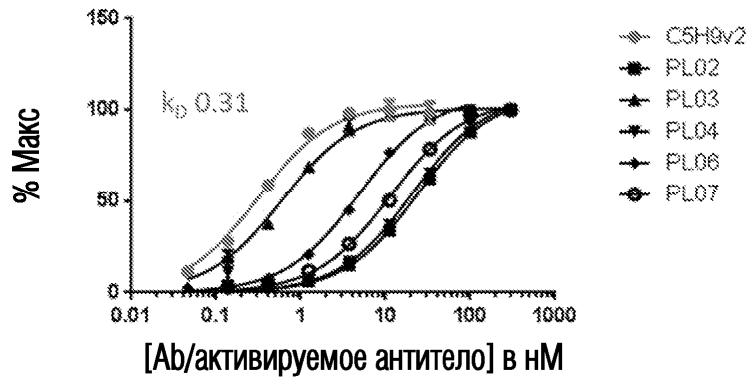


Фиг. 13

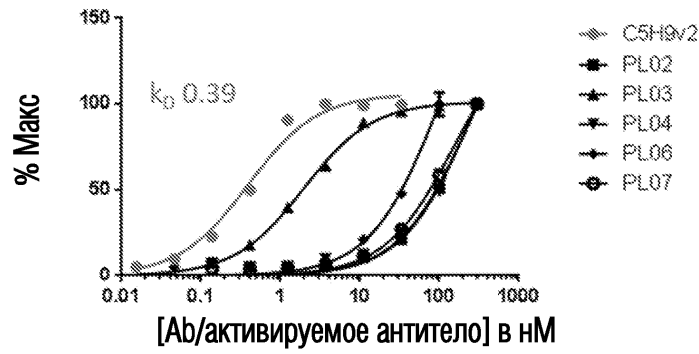
Объем опухолей MC38 (C14-059)



Фиг. 14



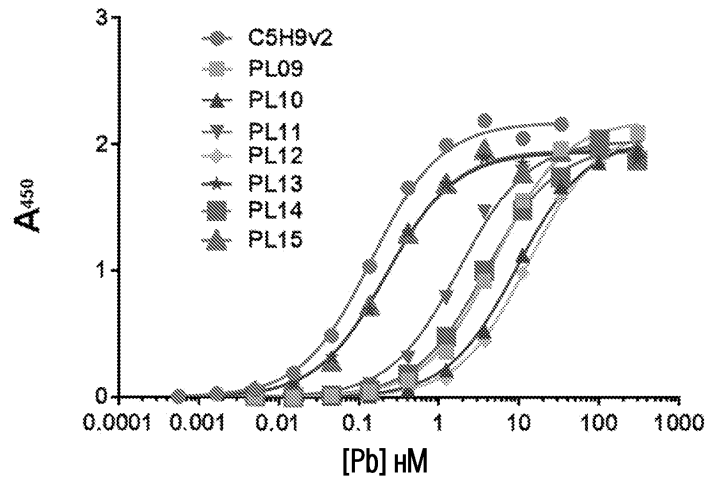
Фиг. 15А



	Эффективность маскирования		
	Среда	Выделенное	
	Человек	Человек	Мышь
PL02	12	80	650
PL03	5	2	5
PL04	52	70	574
PL06	23	16	259
PL07	38	37	389

Фиг. 15В

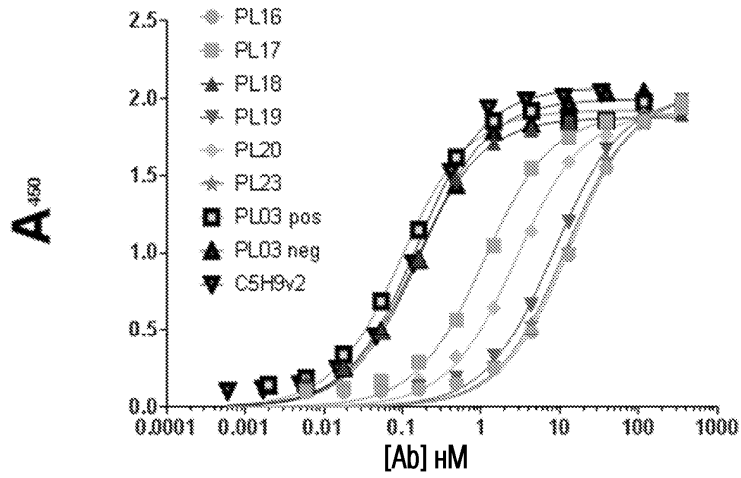
Эффективность маскирования hPDL1/Fc



Эффективность маскирования	PL09	PL10	PL11	PL12	PL13	PL14	PL15
hPDL1	31	63	12	88	1.4	26	2
mPDL1	1518	2246	251	2940	4	1012	48

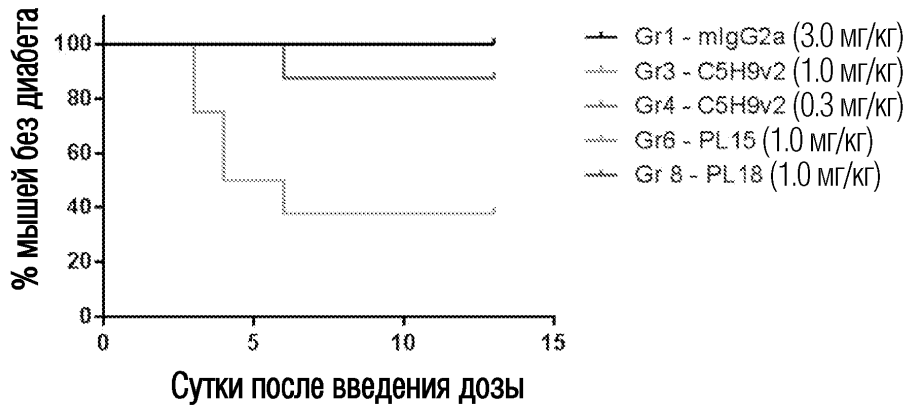
Фиг. 16

Связывание hPDL1/Fc



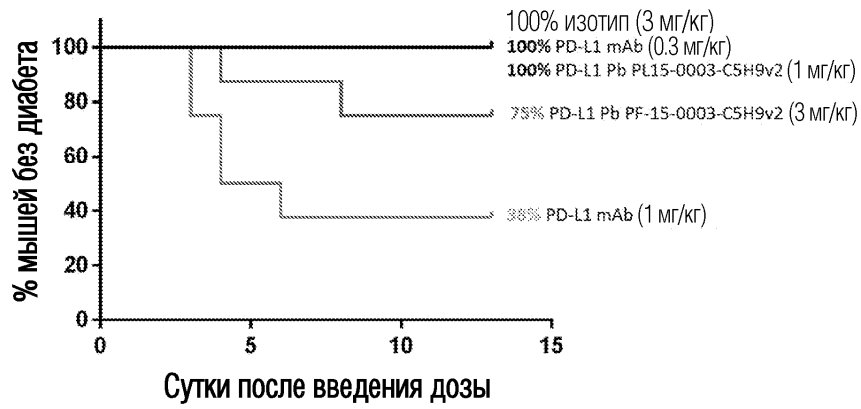
Y/5	PL16	PL17	PL18	PL19	PL20	PL23	PL03+	PL03-
hPDL1	88	7.2	1.0	56	18.3	77.7	0.6	1.1
mPDL1	n/a	421	25	954	645	n/a	1	2.2

Фиг. 17

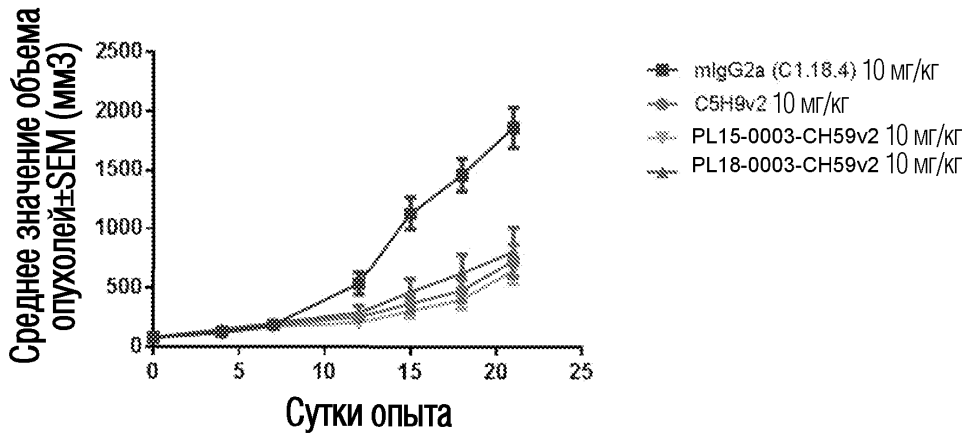


Фиг. 18А

C15-002 PD-L1 Pb у 9-недельных мышей самок NOD

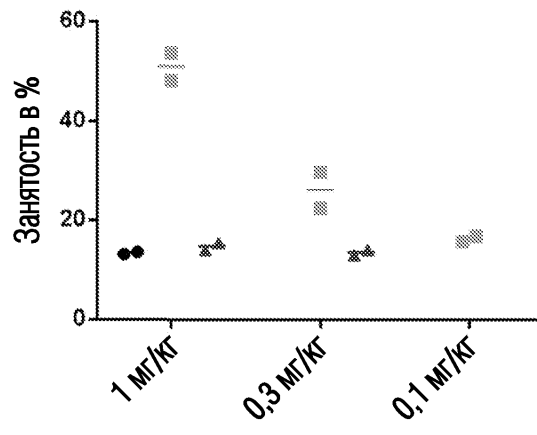


Фиг. 18В



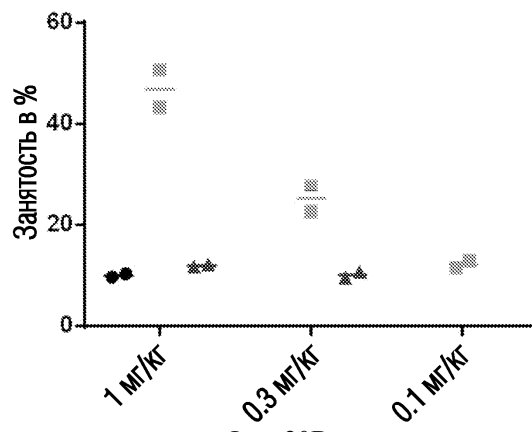
Фиг. 19

Трансформация CD4 в крови



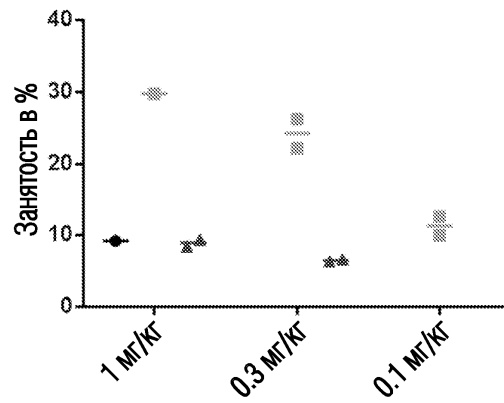
Фиг. 20А

Трансформация CD8 в крови



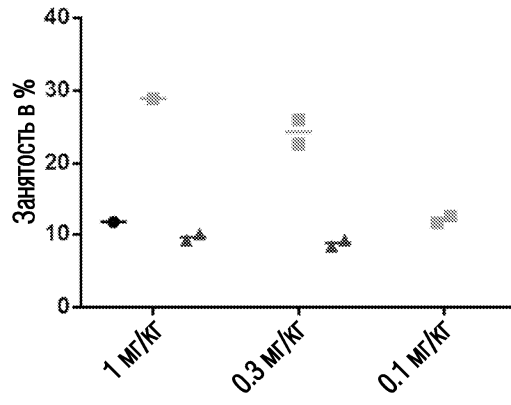
Фиг. 20В

Трансформация CD4 в селезенке

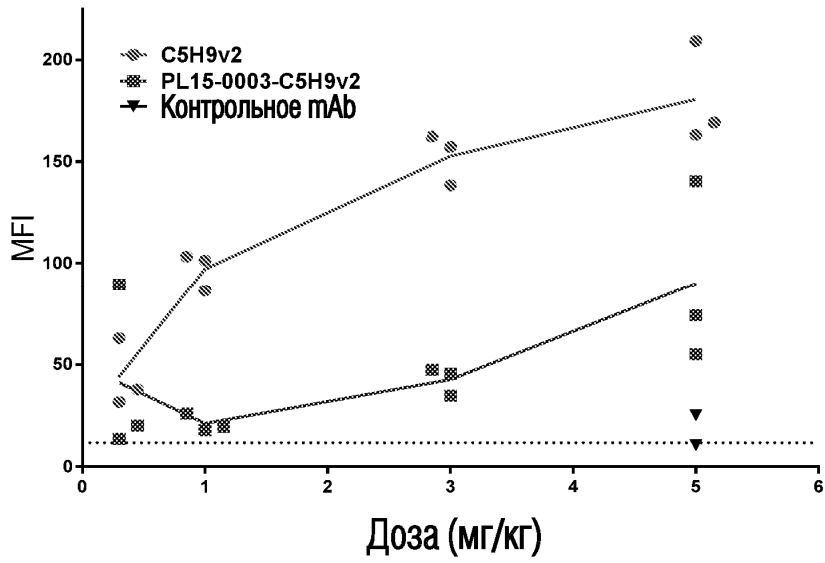


Фиг. 20С

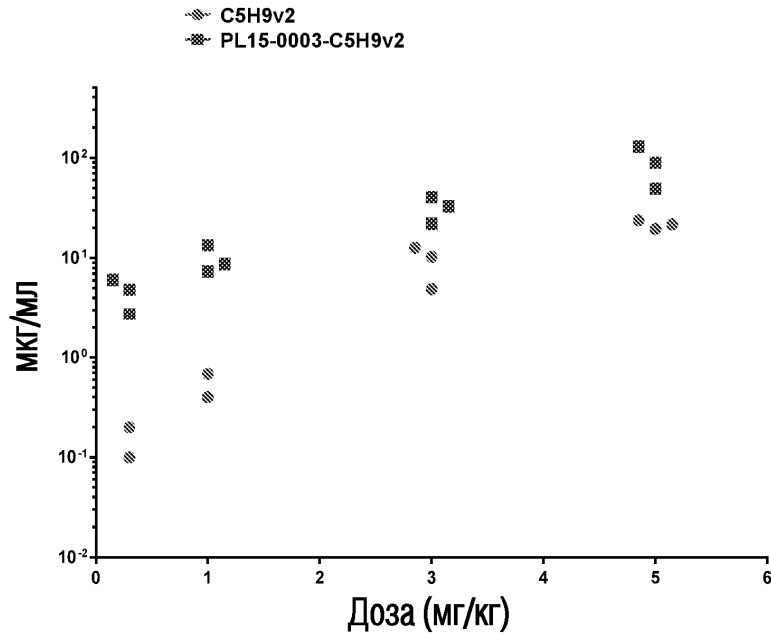
Трансформация CD8 в селезенке



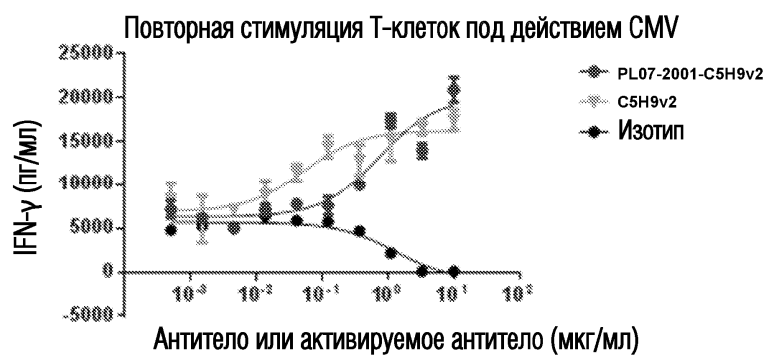
Фиг. 20D



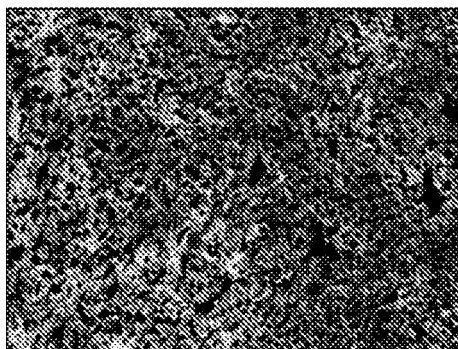
Фиг. 21А



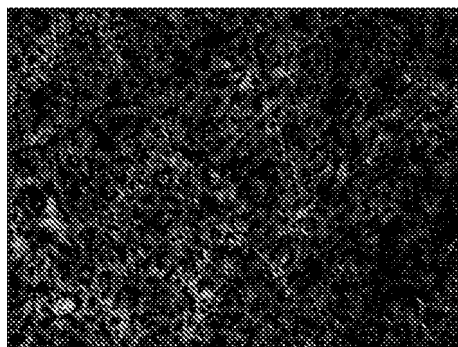
Фиг. 21В



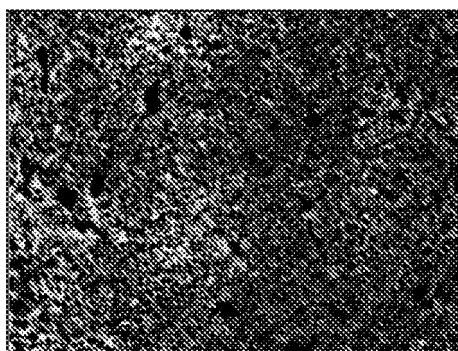
Фиг. 22



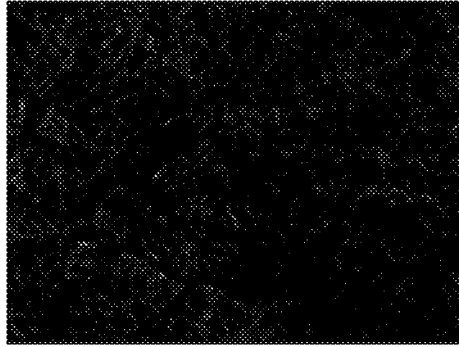
Фиг. 23А



Фиг. 23В

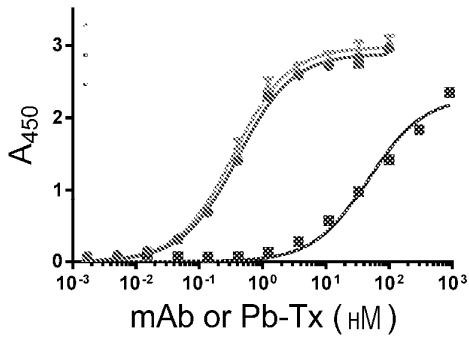


Фиг. 23С

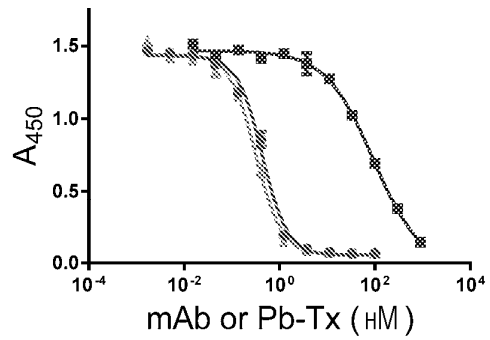


Фиг. 23D

Связывание мышиноного PDL1



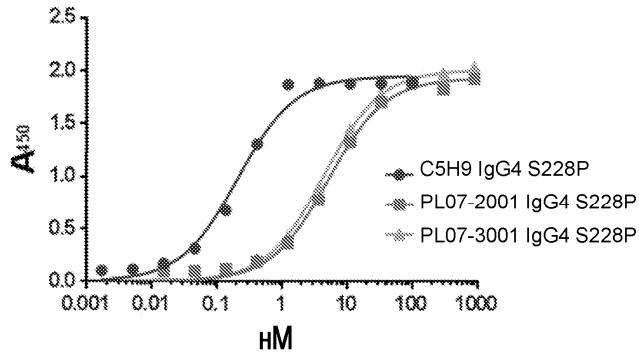
Блокирование мышиноного PDL1



- PL15-003-C5H9v2+матриптаза
- PL15-0003-C5H9v2
- C5H9v2

Фиг. 24

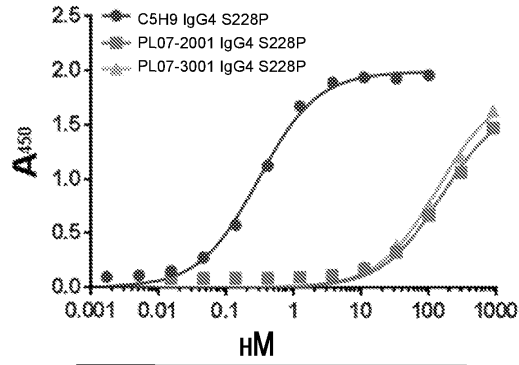
Связывание hDL1



hPDL1	PL-2001	PL-3001
ME	25	21

Фиг. 25A

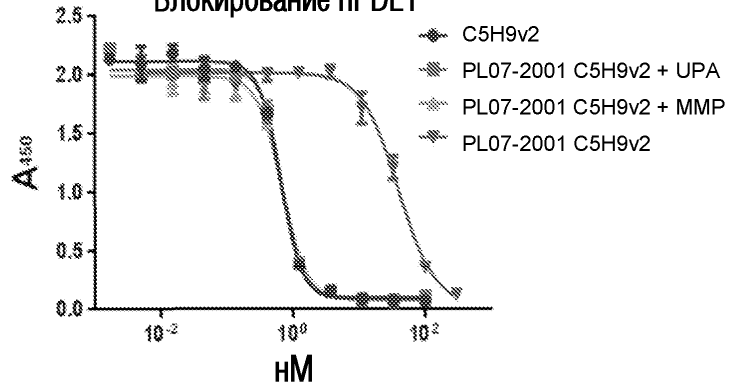
Связывание mDL1



mPDL1	PL-2001	PL-3001
ME	510	450

Фиг. 25В

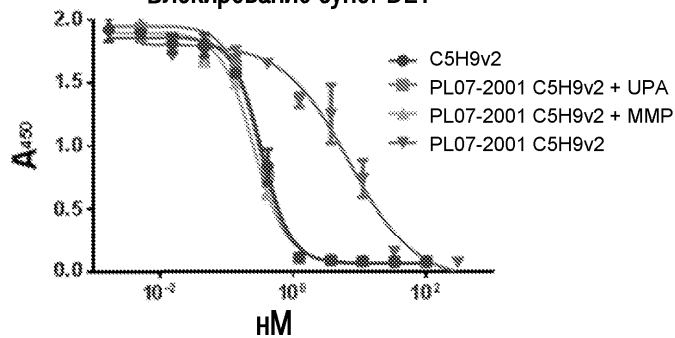
Блокирование hPDL1



	C5H9v2	PL07-2001 C5H9v2 + UPA	PL07-2001 C5H9v2 + MMP	PL07-2001 C5H9v2
IC50 (нМ)	0.7	0.7	0.7	39.8
ME	1	1	1	57

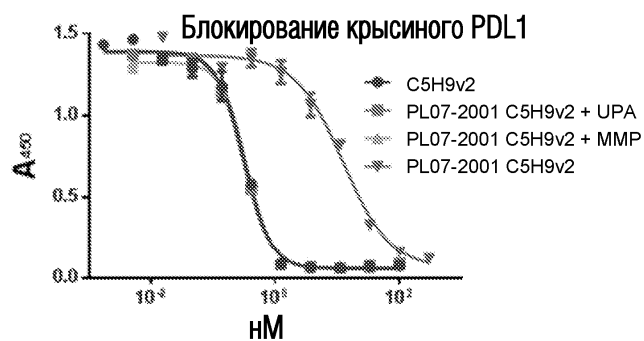
Фиг. 26А

Блокирование супоPDL1



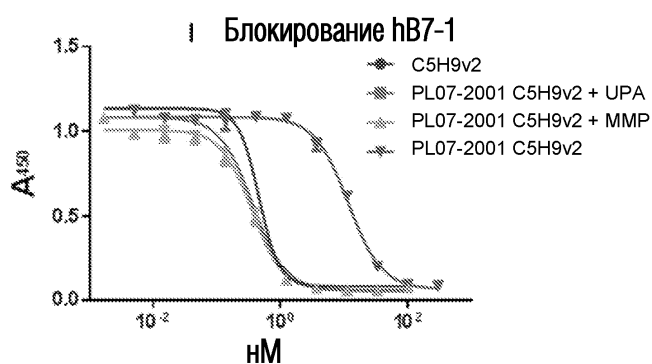
	C5H9v2	PL07-2001 C5H9v2 + UPA	PL07-2001 C5H9v2 + MMP	PL07-2001 C5H9v2
IC50 (нМ)	0.3	0.3	0.3	7
ME	1	1	1	23

Фиг. 26В



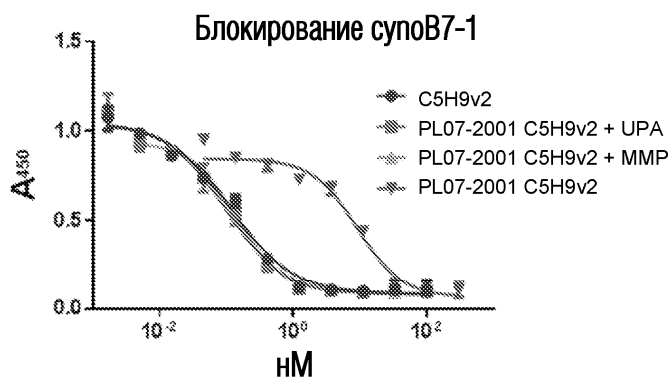
	C5H9v2	PL07-2001 C5H9v2 + UPA	PL07-2001 C5H9v2 + MMP	PL07-2001 C5H9v2
IC50 (нМ)	0.3	0.3	0.3	11.9
ME	1	1	1	40

Фиг. 26С



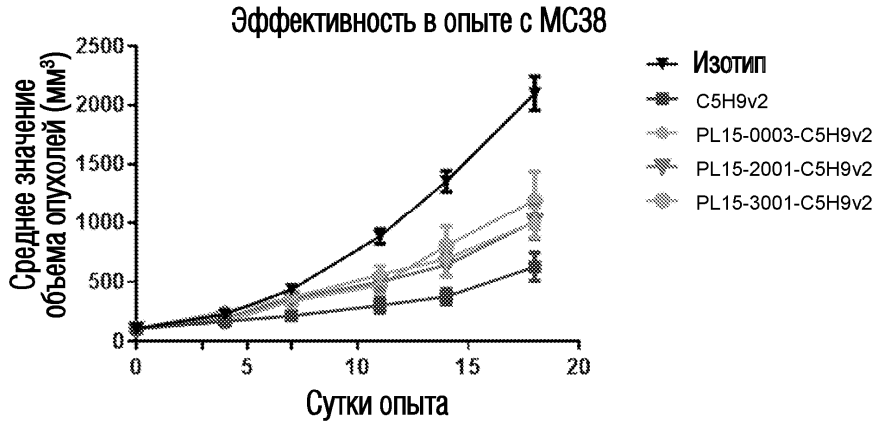
	C5H9v2	PL07-2001 C5H9v2 + UPA	PL07-2001 C5H9v2 + MMP	PL07-2001 C5H9v2
IC50 (нМ)	0.5	0.5	0.4	11.7
ME	1	1	1	29

Фиг. 27А



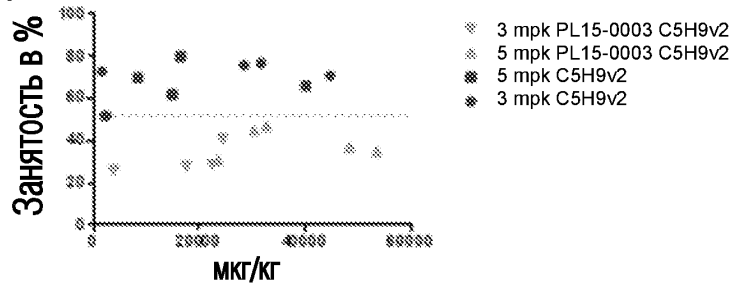
	C5H9v2	PL07-2001 C5H9v2 + UPA	PL07-2001 C5H9v2 + MMP	PL07-2001 C5H9v2
IC50 (нМ)	0.1	0.1	0.1	9.6
ME	1	1	1	96

Фиг. 27В

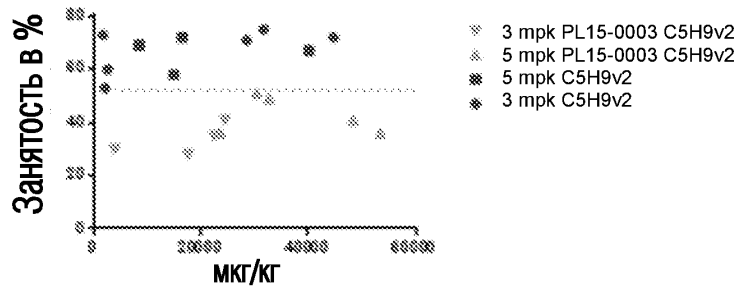


Фиг. 28

Корреляция занятости антигена в CD4+ клетках

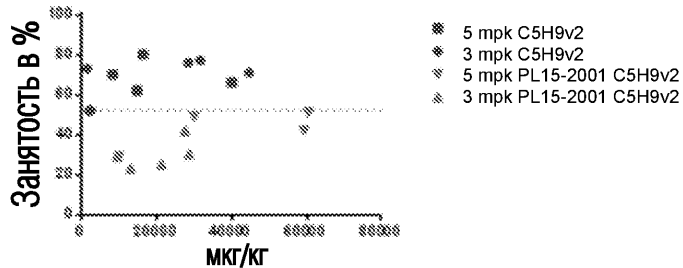


Корреляция занятости антигена в CD8+ клетках

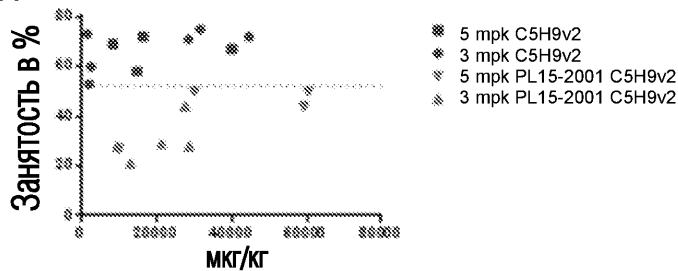


Фиг. 29А

Корреляция занятости антигена в CD4+ клетках

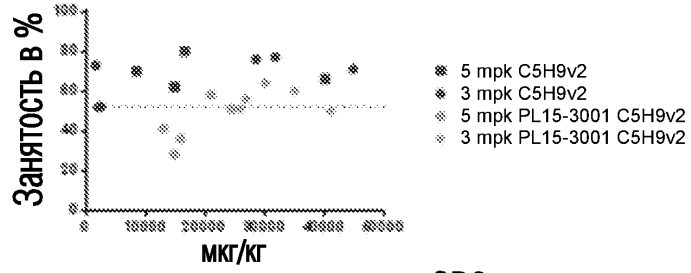


Корреляция занятости антигена в CD8+ клетках

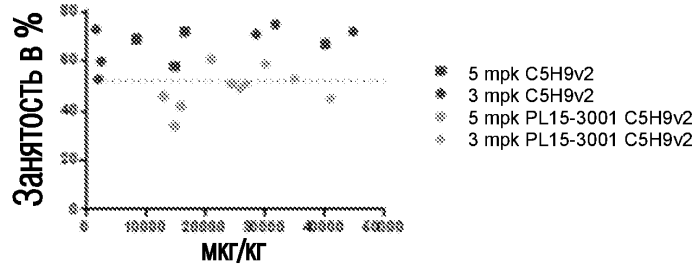


Фиг. 29В

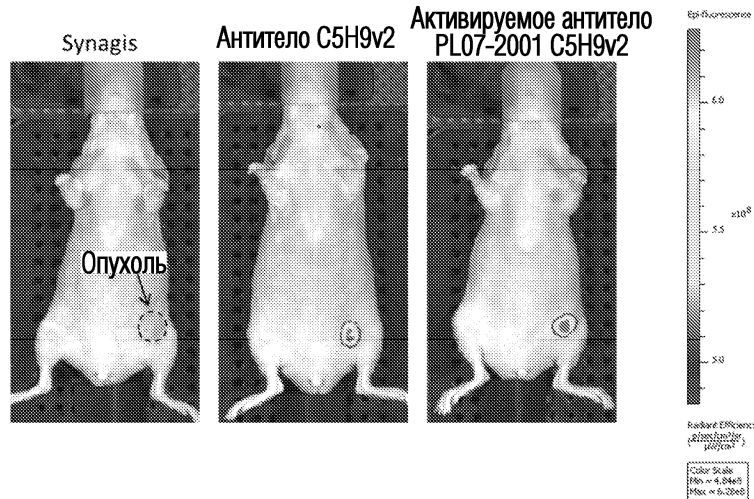
Корреляция занятости антигена в CD4+ клетках



Корреляция занятости антигена в CD8+ клетках



Фиг. 29С



Фиг. 30