

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290131 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.06

(22) Дата подачи заявки
2020.08.31

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К CD96 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/894,334; 62/931,476

(32) 2019.08.30; 2019.11.06

(33) US

(86) PCT/US2020/048700

(87) WO 2021/042019 2021.03.04

(71) Заявитель:
АГЕНУС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

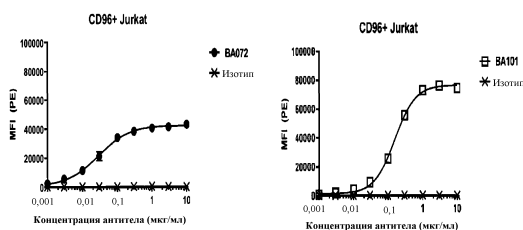
Чанд Дхан Сидхартха, Гомбос Рэнди
Барбара, Игнатович Ольга, Рамсэй
Никола Анн, Бушелл К. Марк, Бриенд
Эммануэль Сирилль Паскаль (US)

(74) Представитель:

Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96) и оказывают антагонистическое действие на функцию CD96. Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие такие антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения таких антител, а также способы лечения субъекта с применением таких антител.

Связывание исходных антител к CD96 с клетками Jurkat, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96



A1

202290131

202290131

A1

АНТИТЕЛА К CD96 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет в соответствии с предварительной заявкой США №№ 62/894334, поданной 30 августа 2019 года, и 62/931476, поданной 6 ноября 2019 года, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96), и к способам их применения.

2. ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] CD96 (кластер дифференцировки 96), также известный как TACTILE (белок активации Т-клеток, с увеличенной поздней экспрессией), представляет собой трансмембранный белок I типа в суперсемействе иммуноглобулинов (Ig). Он имеет один домен Ig, трансмембранный домен I типа, один внутриклеточный иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) и один мотив фосфорилирования YXXM и экспрессируется на поверхности Т-клеток и натуральных киллеров (NK-клеток).

[0004] Считается, что CD96 играет определенную роль в регуляции иммунных клеток (например, NK-клеток и Т-клеток) и метастазировании опухоли. В частности, было показано, что блокировка функции CD96 подавляла рост первичной опухоли у нескольких моделей опухолей у мышей зависимым от CD8⁺ Т-клеток образом.

[0005] Учитывая роль человеческого CD96 в модуляции иммунных ответов, терапевтические средства, предназначенные для блокирования взаимодействий лиганда CD96, имеют большие перспективы для лечения заболеваний, связанных с иммунной супрессией.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96) и модулируют функцию CD96, например, CD96-опосредованную иммуносупрессию. Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие такие антитела,

нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения таких антител, а также способы лечения субъекта с применением таких антител. Описанные в данном документе антитела особенно применимы для усиления активации иммунных клеток и, следовательно, применимы для лечения рака у субъекта или лечения или предупреждения инфекционного заболевания у субъекта.

[0007] Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, при этом антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области (CDR) CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую следующие CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность $X_1YX_2X_3X_4$ (SEQ ID NO: 135), где

X_1 представляет собой Q или S;

X_2 представляет собой A или S;

X_3 представляет собой M или I и

X_4 представляет собой H или S;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность $X_1IX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9YX_{10}QKFQG$ (SEQ ID NO: 137), где

X_1 представляет собой W или G;

X_2 представляет собой N или I;

X_3 представляет собой A, E, V или P;

X_4 представляет собой V, G, W или I;

X_5 представляет собой S, Y, T, N или F;

X_6 представляет собой G или W;

X_7 представляет собой D, Y, N или T;

X_8 представляет собой T или A;

X₉ представляет собой K или N и

X₁₀ представляет собой S или A;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность NWGX₁SYGX₂DV (SEQ ID NO: 180), GYDSRPLDV (SEQ ID NO: 19) или GYDSRPLDY (SEQ ID NO: 20), где

X₁ представляет собой M или L и

X₂ представляет собой M или L;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность RASQSIX₁X₂YLN (SEQ ID NO: 139) или GGNNIGSKIVH (SEQ ID NO: 26), где

X₁ представляет собой S, T или L и

X₂ представляет собой S, P или W;

(e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность X₁X₂SSLQS (SEQ ID NO: 141) или DDRDRPS (SEQ ID NO: 32), где

X₁ представляет собой S или A и

X₂ представляет собой A, S или E; и/или

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQX₁YSTPALX₂ (SEQ ID NO: 143) или QVWDINVHHVI (SEQ ID NO: 35), где

X₁ представляет собой S или A и

X₂ представляет собой T или S,

где необязательно аминокислота, непосредственно расположенная на N-конце CDRH1, представляет собой N, T, S, D или A.

[0008] В определенных вариантах осуществления:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность X₁YX₂MH (SEQ ID NO: 136), где

X₁ представляет собой Q или S и

X₂ представляет собой A или S;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность WINX₁X₂X₃X₄X₅TKYSQKFQG (SEQ ID NO: 138), где

X₁ представляет собой A, V или E;

X₂ представляет собой V, W или G;

X₃ представляет собой S, Y, T или N;

X₄ представляет собой G или W и

X₅ представляет собой D, N, Y или T;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность NWGX₁SYGX₂DV (SEQ ID NO: 180), где

X₁ представляет собой M или L и

X₂ представляет собой M или L;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность RASQSIX₁X₂YLN (SEQ ID NO: 139), где

X₁ представляет собой S, T или L и

X₂ представляет собой S, P или W;

(e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность X₁X₂SSLQS (SEQ ID NO: 141), где

X₁ представляет собой S или A и

X₂ представляет собой A, S или E; и/или

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPALT (SEQ ID NO: 33) или QQAYSTPALS (SEQ ID NO: 34).

[0009] В определенных вариантах осуществления:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19 или 20;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26;

(e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32 и/или

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35.

[0010] В определенных вариантах осуществления CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 5 и 18; 2, 6 и 18; 2, 8 и 18; 2, 9 и 18; 2, 10 и 18; 1, 7 и 18; 2, 11 и 18; 1, 12 и 18; 1, 13 и 18; 1, 14 и 18; 3, 15 и 18; 1, 16 и 18; 1, 5 и 140; 1, 5 и 142; 1, 5 и 179; 4, 17 и 19 или 4, 17 и 20 соответственно.

[0011] В определенных вариантах осуществления CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 21, 28 и 33; 21, 29 и 33; 21, 30 и 33; 21, 31 и 33; 22, 29 и 33; 24, 29 и 33; 23, 29 и 33; 25, 28 и 34 или 26, 32 и 35 соответственно.

[0012] В определенных вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 5, 18, 21, 28 и 33; 1, 5, 18, 21, 29 и 33; 1, 5, 18, 22, 29 и 33; 1, 5, 18, 23, 29 и 33; 1, 5, 18, 24, 29 и 33; 1, 5, 18, 25, 28 и 34; 1, 5, 140, 21, 28 и 33; 1, 5, 142, 21, 28 и 33; 1, 5, 179, 21, 28 и 33; 1, 7, 18, 21, 29 и 33; 1, 12, 18, 21, 28 и 33; 1, 13, 18, 21, 28 и 33; 1, 14, 18, 21, 28 и 33; 1, 16, 18, 21, 28 и 33; 2, 6, 18, 21, 29 и 33; 2, 8, 18, 21, 29 и 33; 2, 9, 18, 21, 30 и 33; 2, 10, 18, 21, 29 и 33; 2, 11, 18, 21, 31 и 33; 3, 15, 18, 21, 28 и 33; 4, 17, 19, 26, 32 и 35 или 4, 17, 20, 26, 32 и 35 соответственно.

[0013] В определенных вариантах осуществления антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61 представляет собой глутамин. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID

NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61 представляет собой пироглутамат.

[0014] В определенных вариантах осуществления антитело содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75.

[0015] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, при этом антитело содержит: VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или 61; и/или VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75. В определенных вариантах осуществления VH и VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 36 и 62; 37 и 62; 37 и 63; 37 и 66; 37 и 67; 37 и 68; 37 и 69; 38 и 63; 39 и 63; 40 и 63; 41 и 63; 42 и 63; 43 и 64; 44 и 64; 45 и 63; 46 и 63; 47 и 65; 48 и 62; 49 и 62; 50 и 62; 51 и 62; 52 и 62; 53 и 62; 54 и 62; 55 и 62; 56 и 62; 57 и 62; 58 и 62; 59 и 62; 60 и 70; 60 и 71; 60 и 72; 60 и 73; 60 и 74; 60 и 75 или 61 и 70 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36 и 62; 37 и 62; 37 и 63; 37 и 66; 37 и 67; 37 и 68; 37 и 69; 38 и 63; 39 и 63; 40 и 63; 41 и 63; 42 и 63; 43 и 64; 44 и 64; 45 и 63; 46 и 63; 47 и 65; 48 и 62; 49 и 62; 50 и 62; 51 и 62; 52 и 62; 53 и 62; 54 и 62; 55 и 62; 56 и 62; 57 и 62; 58 и 62; 59 и 62; 60 и 70; 60 и 71; 60 и 72; 60 и 73; 60 и 74; 60 и 75 или 61 и 70 соответственно. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61 представляет собой глутамин. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или 61 представляет собой пироглутамат.

[0016] В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывается с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 130 или 131. В определенных вариантах осуществления антитело связывается с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 134.

[0017] В определенных вариантах осуществления антитело интернализируется при связывании с клетками, экспрессирующими человеческий CD96.

[0018] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 130 или 131. В определенных вариантах осуществления антитело связывается с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 134.

[0019] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, где антитело интернализируется при связывании с клетками, экспрессирующими человеческий CD96.

[0020] В определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из человеческого IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. В определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 содержит мутацию N297A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 124 или 176. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 содержит мутации S239D, A330L и I332E, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 125 или 177. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 содержит мутации S267E и L328F, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU. В определенных

вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 126 или 178. В определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, которая является вариантом константной области тяжелой цепи дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи связывается с FcγR с большей аффинностью, чем константная область тяжелой цепи дикого типа связывается с FcγR. В определенных вариантах осуществления FcγR представляет собой FcγRIIB.

[0021] В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 или 169. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, или 169. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 и 169 представляет собой глутамин. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 и 169 представляет собой пироглутамат.

[0022] В определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 122 или 123. В определенных вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 или 115. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 102, 103, 104,

105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 или 115.

[0023] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, при этом антитело содержит: тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, или 169; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 или 115. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 или 169; и/или аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, или 115. В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь и легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 76 и 102; 79 и 103; 78 и 103; 82 и 103; 84 и 104; 83 и 104; 86 и 103; 85 и 103; 81 и 103; 80 и 103; 87 и 105; 77 и 102; 88 и 102; 77 и 106; 77 и 107; 77 и 108; 77 и 103; 89 и 102; 90 и 102; 91 и 102; 92 и 102; 93 и 102; 77 и 109; 94 и 102; 95 и 102; 96 и 102; 97 и 102; 98 и 102; 99 и 102; 100 и 110; 100 и 111; 100 и 112; 100 и 113; 100 и 114; 100 и 115; 101 и 110; 144 и 102; 147 и 103; 146 и 103; 150 и 103; 152 и 104; 151 и 104; 154 и 103; 153 и 103; 149 и 103; 148 и 103; 155 и 105; 145 и 102; 156 и 102; 145 и 106; 145 и 107; 145 и 108; 145 и 103; 157 и 102; 158 и 102; 159 и 102; 160 и 102; 161 и 102; 145 и 109; 162 и 102; 163 и 102; 164 и 102; 165 и 102; 166 и 102; 167 и 102; 168 и 110; 168 и 111; 168 и 112; 168 и 113; 168 и 114; 168 и 115 или 169 и 110 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76 и 102; 79 и 103; 78 и 103; 82 и 103; 84 и 104; 83 и 104; 86 и 103; 85 и 103; 81 и 103; 80 и 103; 87 и 105; 77 и 102; 88 и 102; 77 и 106; 77 и 107; 77 и 108; 77 и 103; 89 и 102; 90 и 102; 91 и 102; 92 и 102; 93 и 102; 77 и 109; 94 и 102; 95 и 102; 96 и 102; 97 и 102; 98 и 102; 99 и 102; 100 и 110; 100 и 111; 100 и

112; 100 и 113; 100 и 114; 100 и 115; 101 и 110; 144 и 102; 147 и 103; 146 и 103; 150 и 103; 152 и 104; 151 и 104; 154 и 103; 153 и 103; 149 и 103; 148 и 103; 155 и 105; 145 и 102; 156 и 102; 145 и 106; 145 и 107; 145 и 108; 145 и 103; 157 и 102; 158 и 102; 159 и 102; 160 и 102; 161 и 102; 145 и 109; 162 и 102; 163 и 102; 164 и 102; 165 и 102; 166 и 102; 167 и 102; 168 и 110; 168 и 111; 168 и 112; 168 и 113; 168 и 114; 168 и 115 или 169 и 110 соответственно. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76-101 или 144-169 представляет собой глутамин. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76-101 или 144-169 представляет собой пироглутамат.

[0024] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, где антитело связывается с таким же эпитопом человеческого CD96, что и антитело, раскрытое в данном документе.

[0025] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, где антитело конкурирует за связывание с человеческим CD96 с раскрытым в данном документе антителом.

[0026] В определенных вариантах осуществления антитело является человеческим антителом. В определенных вариантах осуществления антитело является мультиспецифическим антителом. В определенных вариантах осуществления антитело является конъюгированным с цитотоксическим средством, цитостатическим средством, токсином, радионуклидом или детектируемой меткой. В определенных вариантах осуществления антитело является конъюгированным со вторым антителом.

[0027] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH и/или VL раскрытого в данном документе антитела. В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотид. В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или вектор. В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения антитела, которое

специфически связывается с человеческим CD96, при этом способ предусматривает культивирование клетки-хозяина в подходящих условиях так, чтобы экспрессировался полинуклеотид и продуцировалось антитело.

[0028] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, полинуклеотид, вектор или клетку-хозяина, раскрытые в данном документе; и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0029] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ усиления иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции, которые раскрыты в данном документе.

[0030] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения рака у субъекта при этом способ включает введение субъекту эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции, которые раскрыты в данном документе.

[0031] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, при этом способ включает введение субъекту антитела, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции, которые раскрыты в данном документе.

[0032] В определенных вариантах осуществления указанных выше способов антитело, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина или фармацевтическую композицию вводят системно, внутривенно, подкожно, внутрь опухоли или доставляют в лимфатический узел, дренирующий опухоль.

[0033] В определенных вариантах осуществления указанных выше способов способы дополнительно включают введение дополнительного терапевтического средства субъекту. В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является химиотерапевтическое средство. В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа, выбрано из группы, состоящей из

антагонистического антитела к PD-1, антагонистического антитела к PD-L1, антагонистического антитела к PD-L2, антагонистического антитела к CTLA-4, антагонистического антитела к TIM-3, антагонистического антитела к LAG-3, антагонистического антитела к VISTA, антагонистического антитела к TIGIT, антагонистического антитела к CEACAM1, антагонистического антитела к CD96, агонистического антитела к GITR и агонистического антитела к OX40. В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является антитело к PD-1, при этом антитело к PD-1 необязательно является пембролизумабом или ниволумабом. В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). В определенных вариантах осуществления ингибитор выбран из группы, состоящей из эпакадостата, F001287, индоксимода и NLG919. В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является вакцина. В определенных вариантах осуществления вакцина содержит комплекс пептида и белка теплового шока (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В определенных вариантах осуществления белком теплового шока является hsc70 и он образует комплекс с опухоле-ассоциированным антигенным пептидом. В определенных вариантах осуществления белок теплового шока является белком gp96 и он образует комплекс с опухоле-ассоциированным антигенным пептидом, где HSPPC получен из опухоли, которая получена от субъекта.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0034] На фигурах 1A и 1B представлены графики, на которых изображено связывание антител к CD96 BA072 или BA101 или антитела изотипического контроля IgG1 с клетками Jurkat, сконструированными для экспрессии высоких уровней человеческой изоформы 2 CD96 на клеточной поверхности. Уровни связывания клеток Jurkat с помощью BA072 (фигура 1A) или BA101 (фигура 1B), оцениваемые по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием клеток Jurkat антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0035] На фигурах 2А и 2В представлены графики, на которых изображено связывание антител к CD96 BA072 или BA101 или антитела изотипического контроля IgG1 с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 1 человеческого CD96 на клеточной поверхности. Уровни связывания с помощью BA072 (фигура 2А) или BA101 (фигура 2В), оцениваемые по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием клеток CHO антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0036] На фигурах 3А и 3В представлены графики, на которых изображено связывание антител к CD96 BA072 или BA101 или антитела изотипического контроля IgG1 с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 человеческого CD96 на клеточной поверхности. Уровни связывания с помощью BA072 (фигура 3А) или BA101 (фигура 3В), оцениваемые по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием клеток CHO антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0037] На фигурах 4А и 4В представлены графики, на которых изображено связывание антител к CD96 BA072 или BA101 или антитела изотипического контроля IgG1 с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 яванского макака на клеточной поверхности. Уровни связывания с помощью BA072 (фигура 4А) или BA101 (фигура 4В), оцениваемые по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием клеток CHO антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0038] На фигурах 5А и 5В представлены графики, на которых изображено связывание антител к CD96 BA072 или BA101 или антитела изотипического контроля IgG1 с активированными первичными человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD96 на клеточной поверхности. Уровни связывания с помощью

BA072 (фигура 5A) или BA101 (фигура 5B), оцениваемые по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием активированных первичных человеческих Т-клеток антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0039] На фигурах 6A, 6B и 6C представлена серия графиков, на которых изображено связывание антител к CD96 BA072, BA083 или BA084 или антитела изотипического контроля IgG1 с активированными первичными человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD96 на клеточной поверхности. Уровни связывания с помощью BA072 (фигура 6A), BA083 (фигура 6B) или BA084 (фигура 6C), оцениваемые по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием активированных первичных человеческих Т-клеток антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0040] На фигурах 7A-7F представлена серия графиков, на которых изображено связывание антител к CD96 BA101, BA102, BA103, BA104, BA105 или BA106 или антитела изотипического контроля IgG1 с активированными первичными человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD96 на клеточной поверхности. Уровни связывания с помощью BA101 (фигура 7A), BA102 (фигура 7B), BA103 (фигура 7C), BA104 (фигура 7D), BA105 (фигура 7E) или BA106 (фигура 7F), оцениваемые по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием активированных первичных человеческих Т-клеток антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0041] На фигурах 8A-8M представлена серия графиков, на которых изображено связывание антител с созревшей аффинностью к CD96 BA074, BA073, BA079, BA078, BA081, BA080, BA077, BA076, BA082 или BA075, исходных антител BA072 или BA101, антител зародышевого типа BA083 или антител изотипического контроля IgG1 с CD8⁺ Т-клетками, трансфицированными посредством NY-ESO-1, экспрессирующими CD96 на клеточной поверхности. Уровни связывания BA072 (фигура 8A), BA083 (фигура 8B), BA074 (фигура 8C), BA073 (фигура 8D), BA079

(фигура 8E), BA078 (фигура 8F), BA081 (фигура 8G), BA080 (фигура 8H), BA077 (фигура 8I), BA076 (фигура 8J), BA082 (фигура 8K), BA075 (фигура 8L) или BA101 (фигура 8M), оцениваемые по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием с CD8⁺ Т-клетками, трансфицированными посредством NY-ESO-1, антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0042] На фигурах 9A и 9B представлены графики, на которых изображено связывание антител к CD96 BA072 или BA101 или антитела изотипического контроля IgG1 с активированными первичными Т-клетками яванского макака, экспрессирующими CD96 яванского макака на клеточной поверхности. Уровни связывания с помощью BA072 (фигура 9A) или BA101 (фигура 9B), оцениваемые по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием активированных первичных Т-клеток яванского макака антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0043] На фигурах 10A и 10B представлены графики, на которых изображена блокировка связывания PVR-Fc с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 человеческого CD96 на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 BA072 (фигура 10A) или BA101 (фигура 10B). Уровни связывания PVR-Fc, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокировкой антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0044] На фигурах 11A и 11B представлены графики, на которых изображена блокировка связывания PVR-His с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 человеческого CD96 на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 BA072 (фигура 11A) или BA101 (фигура 11B). Уровни связывания PVR-His, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокировкой антителом

изотипического контроля IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0045] На фигурах 12A-12C представлена серия графиков, на которых изображена блокировка связывания PVR-Fc с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 человеческого CD96 на клеточной поверхности, с помощью антител BA072 (фигура 12A), BA083 (фигура 12B) или BA084 (фигура 12C) к CD96. Уровни связывания PVR-Fc, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокировкой антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0046] На фигурах 13A-13L представлена серия графиков, на которых изображена блокировка связывания человеческого PVR-Fc с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 человеческого CD96 на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 BA072 (фигура 12A), BA083 (фигура 12B), BA085 (фигура 13C), BA086 (фигура 13D), BA087 (фигура 13E), BA089 (фигура 13F), BA090 (фигура 13G), BA088 (фигура 13H), BA091 (фигура 13I), BA092 (фигура 13J), BA093 (фигура 13K) или BA094 (фигура 12C). Уровни связывания PVR-Fc, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокировкой антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0047] На фигурах 14A-14L представлена серия графиков, на которых изображена блокировка связывания человеческого PVR-Fc с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 1 человеческого CD96 на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 BA073 (фигура 14A), BA074 (фигура 14B), BA078 (фигура 14C), BA079 (фигура 14D), BA080 (фигура 14E), BA081 (фигура 14F), BA076 (фигура 14G), BA077 (фигура 14H), BA082 (фигура 14I), BA075 (фигура 14J), BA083 (фигура 14K) или BA072 (фигура 14L). Уровни связывания PVR-Fc, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в

каждом случае по сравнению с блокировкой антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0048] На фигурах 15A-15L представлена серия графиков, на которых изображена блокировка связывания человеческого PVR-Fc с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 человеческого CD96 на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 BA073 (фигура 15A), BA074 (фигура 15B), BA078 (фигура 15C), BA079 (фигура 15D), BA080 (фигура 15E), BA081 (фигура 15F), BA076 (фигура 15G), BA077 (фигура 15H), BA082 (фигура 15I), BA075 (фигура 15J), BA083 (фигура 15K) или BA072 (фигура 15L). Уровни связывания PVR-Fc, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокировкой антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0049] На фигурах 16A-16F представлена серия графиков, на которых изображена блокировка связывания PVR-Fc с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней человеческой изоформы 2 CD96 на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 BA101 (фигура 16A), BA102 (фигура 16B), BA103 (фигура 16C), BA104 (фигура 16D), BA105 (фигура 16E) или BA106 (фигура 16F). Уровни связывания PVR-Fc, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокировкой антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0050] На фигурах 17A и 17B представлены графики, на которых изображена блокировка связывания PVR-Fc с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней человеческой изоформы 2 CD96 на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 BA101 (фигура 17A) или BA107 (фигура 17B). Уровни связывания PVR-Fc, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокировкой антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в

зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0051] На фигурах 18A-18C представлена серия графиков, на которых изображена блокировка связывания PVR-Fc с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 яванского макака на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 BA072 (фигура 18A), BA083 (фигура 18B) или BA084 (фигура 18C). Уровни связывания PVR-Fc, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокировкой антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0052] На фигурах 19A-19L представлена серия графиков, на которых изображена блокировка связывания человеческого PVR-Fc с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 яванского макака на клеточной поверхности, с помощью антител BA072 (фигура 19A), BA083 (фигура 19B), BA085 (фигура 19C), BA086 (фигура 19D), BA088 (фигура 19E), BA087 (фигура 19F), BA089 (фигура 19G), BA090 (фигура 19H), BA091 (фигура 19I), BA092 (фигура 19J), BA093 (фигура 19K) или BA094 (фигура 19L) к CD96. Уровни связывания PVR-Fc, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокировкой антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0053] На фигурах 20A-20L представлена серия графиков, на которых изображена блокировка связывания человеческого PVR-Fc с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 1 CD96 яванского макака на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 BA073 (фигура 20A), BA074 (фигура 20B), BA078 (фигура 20C), BA079 (фигура 20D), BA080 (фигура 20E), BA081 (фигура 20F), BA076 (фигура 20G), BA077 (фигура 20H), BA082 (фигура 20I), BA075 (фигура 20J), BA083 (фигура 20K) или BA072 (фигура 20L). Уровни связывания PVR-Fc, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокировкой антителом изотипического контроля

IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0054] На фигурах 21A-21L представлена серия графиков, на которых изображена блокировка связывания человеческого PVR-Fc с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 яванского макака на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 BA073 (фигура 21A), BA074 (фигура 21B), BA078 (фигура 21C), BA079 (фигура 21D), BA080 (фигура 21E), BA081 (фигура 21F), BA076 (фигура 21G), BA077 (фигура 21H), BA082 (фигура 21I), BA075 (фигура 21J), BA083 (фигура 21K) или BA072 (фигура 21L). Уровни связывания PVR-Fc, оцениваемые по средней интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокировкой антителом изотипического контроля IgG1, нанесены на график в виде % максимального ответа в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0055] На фигурах 22A и 22B представлены графики, на которых изображено образование конъюгатов клеток CHO, сконструированных для экспрессии высоких уровней изоформы 2 человеческого CD96 или PVR, в присутствии антител к CD96 BA072 (фигура 22A) или BA101 (фигура 22B) или антитела изотипического контроля IgG1. Процент образовавшихся конъюгатов в каждом случае по сравнению с изотипическим контролем IgG1 нанесен на график в зависимости концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками. На фигуре 22C представлены графики рассеяния, на которых изображено образование конъюгата в квадранте Q2 в присутствии изотипического контроля, а не в присутствии блокирующего антитела.

[0056] На фигуре 23 представлен график, на котором изображено образование конъюгатов клеток CHO, сконструированных для экспрессии высоких уровней изоформы 2 человеческого CD96 или PVR, в присутствии антител к CD96 BA072, BA083, BA084 или антитела изотипического контроля IgG1. Процент образовавшихся конъюгатов в каждом случае по сравнению с изотипическим контролем IgG1 нанесен на график в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0057] **На фигуре 24** представлен график, на котором изображено образование конъюгатов клеток СНО, сконструированных для экспрессии высоких уровней изоформы 2 человеческого CD96 или PVR, в присутствии антител к CD96 BA101, BA102, BA103, BA104, BA105 или BA106. Процент образовавшихся конъюгатов в каждом случае по сравнению с изотипическим контролем IgG1 нанесен на график в зависимости от концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0058] **На фигурах 25A-25H** представлена серия графиков, на которых показано, что антитела к CD96 BA072 и BA101 стимулируют секрецию IL-2 SEA-простимулированными PBMC дозозависимым образом при введении с антителом к PD-1 и без него у двух разных доноров. На фигурах 25A-D представлены результаты первого эксперимента с первым донором, а на фигурах 25E-H представлены результаты второго эксперимента со вторым донором.

[0059] **На фигурах 26A-26F** представлена серия графиков, на которых показано, что антитела BA073, BA078, BA080 и BA076 с созревшей аффинностью и антитело зародышевого типа BA083 стимулируют секрецию IL-2 SEA-простимулированными PBMC как с антителом к PD-1, так и без него. На фигурах 26A и 26B представлены результаты одного эксперимента без антитела к PD-1 (фигура 26A) и с антителом к PD-1 (фигура 26B). На фигурах 26C и 26D представлены результаты второго эксперимента с другим донором без антитела к PD-1 (фигура 26C) и с антителом к PD-1 (фигура 26D). На фигурах 26E и 26F представлены результаты третьего эксперимента с другим донором без антитела к PD-1 (фигура 26E) и с антителом к PD-1 (фигура 26F).

[0060] **На фигурах 27A-27F** представлена серия графиков, на которых показана способность антител BA074, BA079, BA077, BA081, BA082 и BA075 с созревшей аффинностью и исходного антитела BA072 стимулировать секрецию IL-2 SEA-простимулированными PBMC. На фигурах 27A и 27B представлены результаты одного эксперимента без антитела к PD-1 (фигура 27A) и с антителом к PD-1 (фигура 27B). На фигурах 27C и 27D представлены результаты второго эксперимента с другим донором без антитела к PD-1 (фигура 27C) и с антителом к PD-1 (фигура 27D). На фигурах 27E и 27F представлены результаты третьего эксперимента

с другим донором без антитела к PD-1 (фигура 27E) и с антителом к PD-1 (фигура 27F).

[0061] На фигурах 28A и 28B представлены графики, на которых изображено увеличение передачи сигналов NFAT-люциферазы (фигура 28A) и NFκB-люциферазы (фигура 28B) на CD96-экспрессирующих репортерных клетках Jurkat в присутствии BA072 и PVR и клеток CHO, экспрессирующих антитела к CD3. Изменение в отношении относительных световых единиц (RLU) между BA072 и изотипическим контролем нанесено на график в зависимости от концентрации антител. На фигуре 28C представлена серия гистограмм, на которых показана экспрессия CD96, CD226, PVR и CD3 на клеточной поверхности.

[0062] На фигурах 29A и 29B представлена серия графиков, на которых показано увеличение передачи сигналов NFAT-люциферазы на CD96-экспрессирующих репортерных клетках Jurkat с поверхностной экспрессией CD226 (фигура 29A) и без поверхностной экспрессии CD226 (фигура 29B) в присутствии BA072 и PVR и клеток CHO, экспрессирующих антитело к CD3. Изменение в отношении относительных световых единиц (RLU) между BA072 и изотипическим контролем нанесено на график в зависимости от концентрации антител.

[0063] На фигурах 30A-30C представлена серия графиков, на которых показана стимуляция антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) у CD96-экспрессирующих клеток в присутствии первичных NK-клеток по результатам измерения с помощью индуцирования активации каспазы 3/7 с помощью IgG1 BA072 (фигура 30A), Fc-усиленного BA072 (BA109) (фигура 30B) или подвергнутого сайленсингу Fc-варианта BA072 (BA108) (фигура 30C), в каждом случае по сравнению с изотипическим контролем. % индуцированной активации каспазы 3/7 нанесен на график в зависимости от времени (ч.).

[0064] На фигурах 31A-31C представлена серия графиков, на которых показана FcγRIIIA-опосредованная передача сигналов NFAT от FcγRIIIA-экспрессирующих репортерных клеток Jurkat в присутствии Fc-вариантов антитела к CD96 BA072, Fc-усиленного варианта BA072 (BA109) (фигура 31B), подвергнутого сайленсингу Fc-варианта BA072 (BA108) (фигура 31C) или IgG1 BA072 (фигура 31A), связанного с CD96-экспрессирующими целевыми клетками (соотношение E:T 4:1). Относительные

световые единицы (RLU) нанесены на график в зависимости от концентрации антител.

[0065] На фигурах 32А и 32В представлены графики, на которых изображена степень секреции IL-2, вызванной с помощью ВА072 (фигура 32А) и ВА108 (подвергнутый сайленсингу Fc-вариант ВА072; фигура 32В) в анализах совместного культивирования Т-клеток:АРС с применением РВМС от двух доноров-людей.

[0066] На фигурах 33А-33D представлена серия графиков, на которых изображен процент интернализации CD96 с использованием CD96-экспрессирующих клеток Jurkat в присутствии ВА072 (фигура 33А), ВА101 (фигура 33В), эталонного антитела «Эталон А» (фигура 33С) или PVR-Fc (фигура 33D).

[0067] На фигурах 34А-34D представлена серия графиков, на которых изображен процент интернализации CD96 с использованием CD96-экспрессирующих клеток Jurkat в присутствии исходных антител ВА072 (фигура 34А) или ВА101 (фигура 34D) или вариантов антител зародышевой линии ВА083 (фигура 34В) или ВА084 (фигура 34С).

[0068] На фигурах 35А и 35В представлены графики, на которых изображена интернализация CD96 CD96-экспрессирующими первичными Т-клетками в присутствии ВА072 у донора 1 (фигура 35А) и донора 2 (фигура 35В).

[0069] На фигурах 36А и 36В представлены сенсограммы, на которых изображено связывание Fab ВА072, Fab ВА101 и Fab Эталона А с Fc-меченым полноразмерным человеческим CD96 (фигура 36А) или Fc-меченым доменом 1 человеческого CD96 (фигура 36В).

[0070] На фигурах 37А-37D представлена серия сенсограмм, на которых изображено связывание Fab ВА072, Fab ВА101 и Fab Эталона А с Fc-меченым полноразмерным человеческим CD96 (фигура 37А и 37В) или Fc-меченым доменом 1 человеческого CD96 (фигура 37С и 37D). На фигурах 37А и 37С представлены результаты экспериментов, в которых исходная связь была с ВА072. На фигурах 37В и 37D представлены результаты экспериментов, в которых исходная связь была с ВА101.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0071] В настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и оказывают антагонистическое действие на функцию CD96, например, CD96-опосредованную иммунную супрессию. Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие такие антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения таких антител, а также способы лечения субъекта с применением таких антител. Описанные в данном документе антитела особенно применимы для усиления активации иммунных клеток и, следовательно, применимы для лечения рака у субъекта или лечения или предупреждения инфекционного заболевания у субъекта. Все случаи «выделенных антител», описанных в данном документе, дополнительно предполагаются как антитела, которые могут быть, но могут и не быть, выделенными. Все случаи «выделенных полинуклеотидов», описанных в данном документе, дополнительно предполагаются как полинуклеотиды, которые могут быть, но могут и не быть, выделенными. Все случаи «антител», описанных в данном документе, дополнительно предполагаются как антитела, которые могут быть, но могут и не быть, выделенными. Все случаи «полинуклеотидов», описанных в данном документе, дополнительно предполагаются как полинуклеотиды, которые могут быть, но могут и не быть, выделенными.

5.1 Определения

[0072] Применяемые в данном документе термины «приблизительно» и «примерно», при применении для модификации числового значения или числового диапазона, указывают на то, что отклонения 5-10% выше (например, 5-10% выше) и 5-10% ниже (например, 5-10% ниже) значения или диапазона остаются в пределах предполагаемого значения приведенного значения или диапазона.

[0073] Применяемый в данном документе термин «CD96» относится к кластеру дифференцировки 96, также известному как TACTILE (белок активации Т-клеток, с увеличенной поздней экспрессией), который у людей кодируется геном CD96. Применяемый в данном документе термин «человеческий CD96» относится к белку CD96, который кодируется человеческим геном CD96 дикого типа (например, с

регистрационным номером в GenBank™ NM_005816.5), его фрагментом или вариантом. Иллюстративные внеклеточные части человеческого CD96 представлены в данном документе под SEQ ID NO: 127, 128, 129, 130 и 131. Иллюстративные внеклеточные части CD96 яванского макака представлены в данном документе под SEQ ID NO: 132, 133 и 134.

[0074] Применяемые в данном документе термины «CD155», «рецептор вируса полиомиелита» и «PVR» применяют взаимозаменяемо, и они относятся к белку CD155, кодируемому геном CD155 (например, с регистрационным номером в GenBank™ NM_006505.5), его фрагментом или вариантом.

[0075] Применяемые в данном документе термины «антитело» и «антитела» включают полноразмерные антитела, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных антител и молекулы, содержащие CDR, VH-области и/или VL-области антител. Примеры антител включают без ограничения моноклональные антитела, рекомбинантно полученные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (в том числе биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легких цепей антитела, димер тяжелых цепей антитела, пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела, интратела, гетероконъюгированные антитела, конъюгаты антитело-лекарственное средство, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), камелизированные антитела, аффитела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, связанные дисульфидной связью Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (в том числе, например, анти-анти-Id антитела) и антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 или IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a или IgG2b) молекулы иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела представляют собой антитела IgG или их класс (например,

человеческий IgG1 или IgG4) или подкласс. В конкретном варианте осуществления антитело является гуманизированным моноклональным антителом. В другом конкретном варианте осуществления антитело является человеческим моноклональным антителом.

[0076] Применяемые в данном документе термины «VH-область» и «VL-область» относятся соответственно к переменным областям тяжелой и легкой цепи одного антитела, содержащим FR (каркасные области) 1, 2, 3 и 4 и CDR (определяющие комплементарность области) 1, 2 и 3 (см. Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (публикация NIH № 91-3242, Bethesda), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0077] Применяемый в данном документе термин «CDR» или «определяющая комплементарность область» означает несмежные антиген-связывающие участки, встречающиеся в переменной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Такие конкретные области были описаны в Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и в Kabat *et al.*, sequences of protein of immunological interest. (1991), в Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) и в MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, где определения включают перекрывающиеся или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. В определенных вариантах осуществления термин «CDR» обозначает CDR, определение которой дано в MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) and Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," in *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). В определенных вариантах осуществления термин «CDR» обозначает CDR, определение которой дано в Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest. (1991). В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи антитела определяются с использованием разных условных обозначений. В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи и/или CDR легкой цепи определяют путем проведения структурного анализа антитела и выявления остатков в переменной(-ых) области(-ях), которая(-ые), согласно предположениям, вступает(-ют) в контакт с эпитопной областью целевой молекулы (например, CD96 человека и/или яванского

макака). CDRH1, CDRH2 и CDRH3 обозначают CDR тяжелой цепи, а CDRL1, CDRL2 и CDRL3 обозначают CDR легкой цепи.

[0078] Применяемый в данном документе термин «каркасные (FR) аминокислотные остатки» относится к аминокислотам в каркасной области цепи иммуноглобулина. Применяемый в данном документе термин «каркасная область» или «FR-область», включает аминокислотные остатки, которые являются частью вариабельной области, но не частью CDR (например, с использованием определения CDR по Kabat или MacCallum).

[0079] Применяемые в данном документе термины «вариабельная область» и «вариабельный домен» применяют взаимозаменяемо и они широко распространены в данной области техники. Вариабельная область обычно относится к части антитела, как правило, к части легкой или тяжелой цепи, обычно к аминоконцевым 110-120 аминокислотам или 110-125 аминокислотам в зрелой тяжелой цепи и приблизительно к 90-115 аминокислотам в зрелой легкой цепи, которые сильно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и формирования специфичности конкретного антитела к его конкретному антигену. Вариабельность последовательности сосредоточена в тех областях, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), тогда как более высококонсервативные области в вариабельном домене называются каркасными областями (FR). Без привязки к какому-либо конкретному механизму или теории полагают, что CDR легкой и тяжелой цепей в первую очередь ответственны за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В определенных вариантах осуществления вариабельная область является человеческой вариабельной областью. В определенных вариантах осуществления вариабельная область содержит CDR грызуна или мыши и человеческие каркасные области (FR). В конкретных вариантах осуществления вариабельная область является вариабельной областью примата (например, отличного от человека примата). В определенных вариантах осуществления вариабельная область содержит CDR грызуна или мыши и каркасную область (FR) примата (например, отличного от человека примата).

[0080] Термины «VL» и «VL-домен» применяют взаимозаменяемо для обозначения вариабельной области легкой цепи антитела.

[0081] Термины «VN» и «домен VN» применяют взаимозаменяемо для обозначения варибельной области тяжелой цепи антитела.

[0082] Применяемые в данном документе термины «константная область» и «константный домен» являются взаимозаменяемыми и широко распространены в данной области техники. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая непосредственно не участвует в связывании антитела с антигеном, но может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором (например, Fc-гамма-рецептором).

[0083] Применяемый в данном документе термин «тяжелая цепь» при применении в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например, к альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основе аминокислотной последовательности константного домена, которые дают начало антителам классов IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[0084] Применяемый в данном документе термин «легкая цепь» при применении в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например, каппа (κ) или лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления легкая цепь является человеческой легкой цепью.

[0085] Применяемый в данном документе термин «система нумерации EU» относится к условным обозначениям по системе нумерации EU константных областей антитела, которая описана в Edelman, G.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969), и Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0086] «Аффинность связывания» обычно относится к силе суммарных нековалентных взаимодействий между одним участком связывания молекулы (например, антителом) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, применяемый в данном документе термин «аффинность связывания»

относится к присущей аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между представителями связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена рядом способов, известных в данной области техники, в том числе без ограничения с помощью равновесной константы диссоциации (K_D) и равновесной константы ассоциации (K_A). K_D рассчитывают как частное k_{off}/k_{on} , тогда как K_A рассчитывают как частное k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, а k_{off} относится к константе скорости диссоциации, например, антитела с антигеном. k_{on} и k_{off} могут быть определены методиками, известными специалистам в данной области техники, такими как BIAcore® или KinExA. Применяемый в данном документе термин «более низкая аффинность» относится к большей K_D .

[0087] Применяемые в данном документе термины «специфически связывается», «специфически распознает», «иммуноспецифически связывается» и «иммуноспецифически распознает» являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном (например, эпитопом или иммунным комплексом), в том смысле, как такое связывание понимается специалистом в данной области техники. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, как правило, с более низкой аффинностью, что определяют, например, с помощью иммуноанализа, прибора BIAcore®, KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Бойсе, штат Айдахо), или других анализов, известных из уровня техники. В конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с антигеном с K_A , которая составляет по меньшей мере $2 \log$ (например, множители 10), $2,5 \log$, $3 \log$, $4 \log$ или больше, чем K_A , когда молекулы неспецифически связываются с другим антигеном.

[0088] В другом конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, не вступают в перекрестную реакцию с другими белками в сходных условиях связывания. В другом конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с CD96, не вступают в перекрестную реакцию с другими белками, отличными от CD96. В конкретном

варианте осуществления в данном документе предусмотрено антитело, которое связывается с CD96 (например, человеческим CD96) с более высокой аффинностью, чем с другим неродственным антигеном. В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрено антитело, которое связывается с CD96 (например, человеческим CD96) с 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более высокой аффинностью, чем с другим, неродственным антигеном, по результатам измерения, например, с помощью радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения. В конкретном варианте осуществления степень связывания антитела к CD96, описанного в данном документе, с неродственным белком, отличным от CD96, составляет менее 10%, 15% или 20% от связывания антитела с белком CD96, по результатам измерения с помощью, например, радиоиммуноанализа.

[0089] Применяемый в данном документе термин «эпитоп» представляет собой термин в данной области техники и относится к области антигена, с которой может специфически связываться антитело. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или смежный эпитоп), или эпитоп может, например, образовываться в результате объединения из двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). В определенных вариантах осуществления эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, рентген-дифракционных кристаллографических исследований, ELISA-анализов, водородно-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией с электрораспылением и масс-спектрометрией), анализов сканирования олигопептидов на матричной основе (например, ограничивающих пептидов с использованием CLIPS (химическая связь пептидов на каркасных структурах) для картирования прерывистых или конформационных эпитопов) и/или картирования с помощью мутагенеза (например, картирования с помощью сайт-направленного мутагенеза). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно осуществить с применением любого из известных в данной области техники способов (например, Giegé R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A

(1990) Eur J Biochem 189: 1-23; Chayen NE (1997) Structure 5: 1269-1274; McPherson A (1976) J Biol Chem 251: 6300-6303, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Кристаллы антитело:антиген можно изучить с помощью хорошо известных методик рентгеновской дифракции и можно уточнить с помощью компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяемое Molecular Simulations, Inc.; см., например, Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 10): 1316-1323), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Исследования по картированию с помощью мутагенеза можно проводить с помощью любого способа, известного специалисту в данной области техники. Описание методик мутагенеза, в том числе методик сканирующего аланином мутагенеза, см., например, в Champe M *et al.*, (1995) J Biol Chem 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) Science 244: 1081-1085, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. CLIPS (химическая связь пептидов на каркасных структурах) представляет собой технологию представления одного или нескольких пептидов в структурно ограниченной конфигурации для того, чтобы они вели себя как функциональные имитаторы сложных белковых доменов. См., например, публикации патентов США № US 2008/0139407 A1 и US 2007/099240 A1 и патент США № 7972993, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В конкретном варианте осуществления эпитоп антитела определяют с помощью исследований методом сканирующего аланином мутагенеза. В конкретном варианте осуществления эпитоп антитела определяют с помощью водородно-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией. В конкретном варианте осуществления, эпитоп антитела определяют с помощью технологии картирования эпитопов CLIPS от Pepscan Therapeutics. В конкретном варианте осуществления эпитоп антитела определяют с помощью белкового мутагенеза, например, путем создания мутантов-переключателей антигена с частями его ортолога из другого вида и последующего тестирования мутантов-переключателей на потерю

способности связывания антителом (например, с помощью анализа связывания клеток на основе FACS, как описано в данном документе).

[0090] Применяемые в данном документе термины «Т-клеточный рецептор» и «TCR» применяют взаимозаменяемо и они относятся к полноразмерным гетеродимерным $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ TCR, антигенсвязывающим фрагментам полноразмерных TCR и молекулам, содержащим различные CDR или переменные области TCR. Примеры TCR включают без ограничения полноразмерные TCR, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных TCR, растворимые TCR без трансмембранных и цитоплазматических областей, одноцепочечные TCR, содержащие переменные области TCR, присоединенные гибким линкером, TCR-цепи, связанные сконструированной дисульфидной связью, моноспецифические TCR, мультиспецифические TCR (в том числе биспецифические TCR), продукты слияния с TCR, человеческие TCR, гуманизированные TCR, химерные TCR, рекомбинантно полученные TCR и синтетические TCR. Термин охватывает TCR дикого типа и генетически сконструированные TCR (например, химерный TCR, содержащий химерную цепь TCR, которая включает первую часть из TCR первого вида и вторую часть из TCR второго вида).

[0091] Применяемые в данном документе термины «главный комплекс гистосовместимости» и «МНС» применяют взаимозаменяемо и они относятся к молекуле МНС I класса и/или молекуле МНС II класса.

[0092] Применяемый в данном документе термин «комплекс пептид-МНС» относится к молекуле МНС (МНС I класса или МНС II класса) с пептидом, связанным в известном в данной области техники пептидсвязывающем кармане МНС.

[0093] Применяемые в данном документе термины «лечить», «подвергать лечению» и «лечение» относятся к терапевтическим или предупредительным мерам, описанным в данном документе. Способы «лечения» включают введение антитела субъекту, страдающему заболеванием или нарушением или предрасположенному к такому заболеванию или нарушению, для предупреждения, лечения, отсрочки, уменьшения тяжести или облегчения одного или более симптомов заболевания или нарушения, или рецидивирующего заболевания или нарушения, или для продления срока жизни субъекта сверх того, что ожидается в отсутствие такого лечения.

[0094] Применяемый в данном документе термин «эффективное количество» в контексте введения средства терапии субъекту относится к количеству средства терапии, которое обеспечивает требуемый профилактический или терапевтический эффект.

[0095] Применяемый в данном документе термин «интернализация» или «интернализироваться» относится к поглощению антитела во внутриклеточный компартмент клетки при связывании антитела с антигеном, экспрессируемым на поверхности клетки.

[0096] Применяемый в данном документе термин «субъект» охватывает любого человека или отличного от человека животного. В одном варианте осуществления субъектом является человек или отличное от человека млекопитающее. В одном варианте осуществления субъектом является человек.

[0097] Определение «процента идентичности» между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот) можно осуществить с помощью математического алгоритма. Конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87: 2264-2268, с его модифицированной версией в Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90: 5873-5877, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST от Altschul SF *et al.*, (1990) J Mol Biol 215: 403, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Поисковые запросы по нуклеотидным последовательностям BLAST можно осуществить с помощью набора параметров программы для нуклеотидных последовательностей NBLAST, например, показатель = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекуле нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Поисковые запросы по белковым последовательностям BLAST можно выполнить с помощью набора параметров программы XBLAST, например, показателя 50, длины слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковой молекуле, описанной в данном документе. Для получения результатов

выравнивания с использованием гэпов с целью сравнения можно использовать Gapped BLAST, который описан в Altschul SF *et al.*, (1997) Nuc Acids Res 25: 3389-3402, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В качестве альтернативы, для проведения итерированного поиска, который позволяет выявить отдаленные связи между молекулами, можно применять PSI BLAST (*там же*). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) во всемирной сети на сайте ncbi.nlm.nih.gov). Другим конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версии 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно применять таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за удлинение гэта 12 и штраф за гэта 4.

[0098] Процент идентичности между двумя последовательностями можно определить с помощью способов, аналогичных описанным выше, с использованием гэпов или без них. При вычислении процента идентичности обычно учитывают только точные совпадения.

5.2 Антитела к CD96

[0099] Согласно одному аспекту, в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и оказывают антагонистическое действие на функцию CD96. Аминокислотные последовательности иллюстративных антител представлены в данном документе в таблице 1.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности иллюстративных антител к CD96

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
консенсусная последовательность 1, CDRH1	X ₁ YX ₂ X ₃ X ₄ , где X ₁ представляет собой Q или S; X ₂ представляет собой A или S; X ₃ представляет собой M или I и X ₄ представляет собой S или H.	135
консенсусная последовательность 2, CDRH1	X ₁ YX ₂ MN, где X ₁ представляет собой Q или S и X ₂ представляет собой A или S.	136
консенсусная последовательность 1, CDRH2	X ₁ IX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ YX ₁₀ QKFQG, где X ₁ представляет собой W или G; X ₂ представляет собой N или I; X ₃ представляет собой A, E, V или P; X ₄ представляет собой V, G, W или I; X ₅ представляет собой S, Y, T, N или F; X ₆ представляет собой G или W; X ₇ представляет собой D, Y, N или T; X ₈ представляет собой T или A; X ₉ представляет собой K или N и X ₁₀ представляет собой S или A.	137
консенсусная последовательность 2, CDRH2	WINX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ TKYSQKFQG, где X ₁ представляет собой A, V или E; X ₂ представляет собой V, W или G; X ₃ представляет собой S, Y, T или N; X ₄ представляет собой G или W и X ₅ представляет собой D, N, Y или T.	138
консенсусная последовательность CDRH3	NWGX ₁ SYGX ₂ DV, где X ₁ представляет собой M или L и X ₂ представляет собой M или L.	180
консенсусная последовательность CDRL1	RASQSIX ₁ X ₂ YLN, где X ₁ представляет собой S, T или L и X ₂ представляет собой S, P или W.	139
консенсусная последовательность CDRL2	X ₁ X ₂ SSLQS, где X ₁ представляет собой S или A и X ₂ представляет собой A, S или E.	141
консенсусная последовательность CDRL3	QQX ₁ YSTPALX ₂ , где X ₁ представляет собой S или A и X ₂ представляет собой T или S.	143

CDRH1 - BA072, BA083, BA081, BA080, BA084, BA085, BA086, BA087, BA088, BA089, BA090, BA091, BA093, BA094, BA095, BA096, BA097, BA098, BA099, BA100	SYAMH	1
CDRH1 - BA074, BA073, BA075, BA077, BA076, BA079, BA078, BA082	QYAMH	2
CDRH1 - BA092	SYSMH	3
CDRH1 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106, BA107	SYAIS	4
CDRH2 - BA072, BA083, BA084, BA085, BA086, BA087, BA088, BA094, BA095, BA096, BA097, BA098, BA099, BA100	WINAGNGNTKYSQKFQG	5
CDRH2 - BA074, BA073	WINAVSGDTKYSQKFQG	6
CDRH2 - BA081, BA080	WINAGTGDTKYSQKFQG	7
CDRH2 - BA075	WINEGYGNTKYSQKFQG	8
CDRH2 - BA077, BA076	WINAGYGYTKYSQKFQG	9
CDRH2 - BA079, BA078	WINAGTGNTKYSQKFQG	10
CDRH2 - BA082	WINAGYGNTKYSQKFQG	11
CDRH2 - BA089	WINAWNGNTKYSQKFQG	12
CDRH2 - BA090	WINVGTGTTKYSQKFQG	13
CDRH2 - BA091	WINAVNGNTKYSQKFQG	14
CDRH2 - BA092	WINAGNWNTKYSQKFQG	15
CDRH2 - BA093	WINAWTGNTKYSQKFQG	16

CDRH2 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106, BA107	GIPIFGTANYAQKFQG	17
CDRH3 - BA072, BA083, BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA077, BA076, BA079, BA078, BA082, BA084, BA085, BA086, BA087, BA088, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093, BA094	NWGMSYGMDV	18
CDRH3 - BA095, BA098	NWGMSYGLDV	140
CDRH3 - BA096, BA099	NWGLSYGMDV	142
CDRH3 - BA097, BA100	NWGLSYGLDV	179
CDRH3 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106	GYDSRPLDV	19
CDRH3 - BA107	GYDSRPLDY	20
CDRL1 - BA072, BA083, BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA077, BA076, BA079, BA078, BA082, BA084, BA088, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093, BA095, BA096, BA097, BA098, BA099, BA100	RASQSISSYLN	21
CDRL1 - BA085	RASQSISSPYLN	22
CDRL1 - BA087	RASQSILSYLN	23
CDRL1 - BA086	RASQSISSWYLN	24
CDRL1 - BA094	RASQSITSYLN	25
CDRL1 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106, BA107	GGNNIGSKIVH	26

CDRL2 - BA072, BA083, BA084, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093, BA094, BA095, BA096, BA097, BA098, BA099, BA100	AASSLQS	28
CDRL2 - BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA079, BA078, BA085, BA086, BA087, BA088	SASSLQS	29
CDRL2 - BA077, BA076	SESSLQS	30
CDRL2 - BA082	SSSSLQS	31
CDRL2 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106, BA107	DDRDRPS	32
CDRL3 - BA072, BA083, BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA077, BA076, BA079, BA078, BA082, BA084, BA085, BA086, BA087, BA088, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093, BA095, BA096, BA097, BA098, BA099, BA100	QQSYSTPALT	33
CDRL3 - BA094	QQAYSTPALS	34
CDRL3 - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106, BA107	QVWDINVHHVI	35
VH - BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	36

VH - BA083, BA085, BA086, BA087, BA088, BA094	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	37
VH - BA074	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	38
VH - BA073	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	39
VH - BA081	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGDTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	40
VH - BA080	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGDTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	41
VH - BA075	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINEGYGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	42
VH - BA077	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	43
VH - BA076	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	44

VH - BA079	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	45
VH - BA078	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	46
VH - BA082	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	47
VH - BA084	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	48
VH - BA089	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAWNGNTK YSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED AVYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	49
VH - BA090	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINVGTGTTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	50
VH - BA091	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAVNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	51
VH - BA092	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFAS YSMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNWN TKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLR SED TA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGT TVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	52

VH - BA093	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAWTGNTKY SQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	53
VH - BA095	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGLDVWGQGTMTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	54
VH - BA096	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGLSYGMDVWGQGTMTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	55
VH - BA097	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGLSYGMDVWGQGTMTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	56
VH - BA098	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGLDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	57
VH - BA099	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGLSYGMDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	58
VH - BA100	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGLSYGLDVWGQGTTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	59
VH - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAIHWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGYDSRPLDVWGQGTLLTVTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	60

VH - BA107	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDATVY YCARGYDSRPLDYWGQGTLLTVSS, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	61
VL - BA072, BA083, BA084, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIK	62
VL - BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA079, BA078, BA088	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIK	63
VL - BA077, BA076	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSESSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIK	64
VL - BA082	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSSSSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIK	65
VL - BA085	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIK	66
VL - BA086	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIK	67
VL - BA087	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSILSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIK	68
VL - BA094	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSITSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYSTPALS FGGGTKVDIK	69
VL - BA101, BA107	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKSGQAPVLLVSDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGKVTVL	70
VL - BA102	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKPGQAPVLLVSDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGKLTVL	71

VL - BA103	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKSGQAPVLVIYDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGTKLTVL	72
VL - BA104	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKPGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGTKLTVL	73
VL - BA105	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKSGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGTKLTVL	74
VL - BA106	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKSGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGTKLTVL	75
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	76
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	144

полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA083, BA085, BA086, BA087, BA088, BA094	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	77
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA083, BA085, BA086, BA087, BA088, BA094	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	145
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA074	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	78

полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA074	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	146
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA073	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	79
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA073	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAVSGDTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	147

полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA081	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGDTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	80
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA081	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGDTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	148
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA080	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGDTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	81

полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA080	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	149
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA075	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINEGYGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	82
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA075	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINEGYGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	150

полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA077	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	83
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA077	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	151
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA076	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	84

полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA076	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGYTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	152
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA079	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	85
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA079	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	153

полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA078	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	86
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA078	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGTGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	154
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA082	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTRY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	87

полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA082	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDQ YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGYGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	155
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA084	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	88
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA084	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	156

полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA089	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAWNGNTK YSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED AVYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	89
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA089	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAWNGNTK YSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED AVYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	157
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA090	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINVGTGTTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	90

полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA090	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINVGTGTTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	158
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA091	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAVNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	91
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA091	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAVNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	159

полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA092	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFAS YSMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNWNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	92
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA092	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFAS YSMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNWNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	160
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA093	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAWTGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	93

полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA093	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAWTGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGMDVWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	161
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA095	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGLDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	94
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA095	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGLDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	162

полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA096	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGLSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	95
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA096	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGLSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	163
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA097	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGLSYGLDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	96

полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA097	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGLSYGLDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	164
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA098	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGLDVWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	97
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA098	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGMSYGLDVWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	165

полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA099	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGLSYGMDVWGQGTITVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	98
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA099	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGLSYGMDVWGQGTITVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	166
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA100	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGLSYGLDVWGQGTITVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	99

полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA100	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARNWGLSYGLDVWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	167
полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGYDSRPLDVWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	100
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA101, BA102, BA103, BA104, BA105, BA106	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGYDSRPLDVWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	168

полноразмерная тяжелая цепь (с С- концевым лизином) - BA107	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARGYDSRPLDYWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	101
полноразмерная тяжелая цепь (без С- концевого лизина) - BA107	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARGYDSRPLDYWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	169
полноразмерная легкая цепь - BA072, BA083, BA084, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	102
полноразмерная легкая цепь - BA074, BA073, BA081, BA080, BA075, BA079, BA078, BA088	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	103

полноразмерная легкая цепь - BA077, BA076	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSESSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	104
полноразмерная легкая цепь - BA082	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSSSSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	105
полноразмерная легкая цепь - BA085	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSSSSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	106
полноразмерная легкая цепь - BA086	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSSSSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	107
полноразмерная легкая цепь - BA087	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSILSYL NWYQQKPGKAPKLLIYSSSSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPALT FGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	108
полноразмерная легкая цепь - BA094	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSITSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAYSTPALS FGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	109

полноразмерная легкая цепь - BA101, BA107	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKSGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGTKVTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	110
полноразмерная легкая цепь - BA102	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKPGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	111
полноразмерная легкая цепь - BA103	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKSGQAPVLVIYDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	112
полноразмерная легкая цепь - BA104	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKPGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTINTVEAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	113
полноразмерная легкая цепь - BA105	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKSGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	114
полноразмерная легкая цепь - BA106	SYELTQPLSVSVALGQTASITCGGNNIGSKIVH WYQQKSGQAPVLVVSDDRDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDINVHH VIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	115

вариант полноразмерной тяжелой цепи IgG1 N297A (с С-концевым лизином) - BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	116
вариант полноразмерной тяжелой цепи IgG1 N297A (без С- концевого лизина) - BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	170
вариант полноразмерной тяжелой цепи IgG1 N297A (с С-концевым лизином) - BA101	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGYDSRPLDVWGQGTLLTVVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	117

вариант полноразмерной тяжелой цепи IgG1 N297A (без C- концевого лизина) - BA101	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARGYDSRPLDVWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLM SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	171
вариант полноразмерной тяжелой цепи IgG1 S239D/A330L/I332E (с C-концевым лизином) - BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	118
вариант полноразмерной тяжелой цепи IgG1 S239D/A330L/I332E (без C-концевого лизина) - BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPDVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	172

вариант полноразмерной тяжелой цепи IgG1 S239D/A330L/I332E (с С-концевым лизином) - BA101	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARGYDSRPLDVWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	119
вариант полноразмерной тяжелой цепи IgG1 S239D/A330L/I332E (без С-концевого лизина) - BA101	XVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVY YCARGYDSRPLDVWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKS LSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	173
вариант полноразмерной тяжелой цепи IgG1 S267E L328F (с С- концевым лизином) - BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMVDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	120

вариант полноразмерной тяжелой цепи IgG1 S267E L328F (без С- концевого лизина) - BA072	XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKY SQKFQGRVTITRDTSTSTAYMELRSLRSDDTA MYYCARNWGMSYGMDVWGQGTMTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG, где X представляет собой глутамин (Q) или пироглутамат (pE)	174
константная область тяжелой цепи (с С- концевым лизином) - BA072, BA101	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	121
константная область тяжелой цепи (без С- концевого лизина) - BA072, BA101	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	175
константная область легкой цепи - BA072	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC	122
константная область легкой цепи - BA101	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS	123

вариант константной области IgG1 N297A (с С-концевым лизином) - BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	124
вариант константной области IgG1 N297A (без С-концевого лизина) - BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	176
вариант константной области IgG1 S239D/A330L/I332E (с С-концевым лизином) - BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	125
вариант константной области IgG1 S239D/A330L/I332E (без С-концевого лизина) - BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	177

вариант константной области IgG1 S267E L328F (с С-концевым лизином) - BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWSNGALTSKVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	126
вариант константной области IgG1 S267E L328F (без С-концевого лизина) - BA072	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWSNGALTSKVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	178

Таблица 2. Иллюстративные последовательности CD96.

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Иллюстративная последовательность изоформы 1 внеклеточного домена человеческого CD96 ¹	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCTQTQTVGF FVQMQWSKVTNKIDLI VYHPQYGFYCA YGR PCESLVTFTETPENGSKWTLHLRNMSCSVSGR YECMLVLYPEGIQTKIYNLLIQTHVTADEWNS NHTIEIEINQTL EIPCFQNSSSKISSEFTYAWSVE NSSTD SWVLLSKGIKEDNGTQETLISQNHLSN STLLKDRVKLGT DYRLHLS PVQIFDDGRKFSC HIRVGP NKILRSSTTVKVFAKPEIPVIVENNSTD VLVERRFTCLLKNVFPKANITWFIDGSFLHDE KEGIYITNEERKKGKDGFL ELKSVL TRVHSNKP AQSDNLTIWCMALSPVPGNKVWNISSEKITFL LGSEISSDTPPLSVTESTLDTQPSPASSVSPARY PATSSVTLVDVSALRPNTTPQPSNSSMTTRGF NYPWTSSGTDTKKSVSRIPSETYSSSPSGAGST LHDNVFTSTARAFSEVPTTANGSTKTNHVHIT GIVVNKPKDGM	127

Иллюстративная последовательность изоформы 2 внеклеточного домена человеческого CD96 ¹	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCTQTQTVGF FVQMQWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCAAYGR PCESLVTFTETPENGSKWTLHLRNMSCSVSGR YECMLVLYPEGIQTKIYNLLIQTHVTADEWNS NHTIEIEINQTL EIPCFQNSSSKISSEFTYAWSVE DNGTQETLISQNHLSNSTLLKDRVKLGT DYR LHLSPVQIFDDGRKF SCHIRVGPNKILRSSTTV KVFAKPEIPVIVENNSTDVLVERRFTCLLKNVF PKANITW FIDGSFLHDEKEGIYITNEERK GKDG FLELKSVL TRVHSNKPAQSDNLT IWCMA LSPV PGNKVWNISSEKITFLLGSEISSTD PPLSVTEST LDTQPSPASSVSPARYPATSSVTLVDVSALRPN TTPQPSNSSMTTRGFNYPWTSSGTDTKKSVSR IPSETYSSSPSGAGSTLHDNVFTSTARAFSEVPT TANGSTKTNHVHITGIVVNKPKDGM	128
Иллюстративная C89S изоформы 2 внеклеточного домена человеческого CD96 ¹	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCTQTQTVGF FVQMQWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCAAYGR PCESLVTFTETPENGSKWTLHLRNMSSSVSGR YECMLVLYPEGIQTKIYNLLIQTHVTADEWNS NHTIEIEINQTL EIPCFQNSSSKISSEFTYAWSVE DNGTQETLISQNHLSNSTLLKDRVKLGT DYR LHLSPVQIFDDGRKF SCHIRVGPNKILRSSTTV KVFAKPEIPVIVENNSTDVLVERRFTCLLKNVF PKANITW FIDGSFLHDEKEGIYITNEERK GKDG FLELKSVL TRVHSNKPAQSDNLT IWCMA LSPV PGNKVWNISSEKITFLLGSEISSTD PPLSVTEST LDTQPSPASSVSPARYPATSSVTLVDVSALRPN TTPQPSNSSMTTRGFNYPWTSSGTDTKKSVSR IPSETYSSSPSGAGSTLHDNVFTSTARAFSEVPT TANGSTKTNHVHITGIVVNKPKDGM	129
Иллюстративный домен 1 человеческого CD96 ¹	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCTQTQTVGF FVQMQWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCAAYGR PCESLVTFTETPENGSKWTLHLRNMSCSVSGR YECMLVLYPEGIQTKIYNLLIQTHV	130
Иллюстративная C89S домена 1 человеческого CD96 ¹	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCTQTQTVGF FVQMQWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCAAYGR PCESLVTFTETPENGSKWTLHLRNMSSSVSGR YECMLVLYPEGIQTKIYNLLIQTHV	131

Иллюстративный внеклеточный домен CD96 яванского макака ²	VWGKPFNTEENIYATLGSDVNLTCTQAKGF LVQMQWSKVTDKADLIALYHPQYGFHCAYG SPCESLVTFTQTPENGSKWTLHLRNMSSSVSG RYECMLTLYPEGMQTKIYNLLIQTHVTPDEW KSNHTIEIEINQTL EIPCFQNSSSEISSEFTYAWL VVKNSSTD SWVLLSKGKRYDNGTQQTLISQD HLISSSTLLKDRVKVGIDYRLHLSPVQIFDDGR KFSCHIRVGPDKILRSSTTIKVFAPKEIPMIVEN NSTDVLVERTFTCLLKNVFPKANIIFIDGSFL HDEKEGIYITNEERKKGKDGFLKSVLTRVHS DKPAQSDNLTIWCMALSPVPGNKVWNISSEKI TFLLGSEMSTTDLPSPVTESTLDTQSPASSVSP TRYPATSSVTLADV SALRPNTTPQSSSSSVTTQ DFNYPWTSSGTD AKKSFSQIPSETYSSSPSGAG STLHDNVFTSTTRALSEVPTTANGSTKTNHVH ITGIVVSKPKDGM	132
Иллюстративная изоформа 2 последовательности внеклеточного домена CD96 яванского макака ²	VWGKPFNTEENIYATLGSDVNLTCTQAKGF LVQMQWSKVTDKADLIALYHPQYGFHCAYG SPCESLVTFTQTPENGSKWTLHLRNMSSSVSG RYECMLTLYPEGMQTKIYNLLIQTHVTPDEW KSNHTIEIEINQTL EIPCFQNSSSEISSEFTYAWL VEDNGTQQTLISQDHLISSSTLLKDRVKVGIDY RLHLSPVQIFDDGRKFSCHIRVGPDKILRSSTTI KVFAKPEIPMIVENNSTDVLVERTFTCLLKNV FPKANIIFIDGSFLHDEKEGIYITNEERKKGK DGFLKSVLTRVHSDKPAQSDNLTIWCMALSP VPGNKVWNISSEKITFLLGSEMSTTDLPSPVTE STLDTQSPASSVSPTRYPATSSVTLADV SALR PNTTPQSSSSSVTTQDFNYPWTSSGTD AKKSFS QIPSETYSSSPSGAGSTLHDNVFTSTTRALSEV PTTANGSTKTNHVHITGIVVSKPKDGM	133
Иллюстративный домен 1 CD96 яванского макака ²	VWGKPFNTEENIYATLGSDVNLTCTQAKGF LVQMQWSKVTDKADLIALYHPQYGFHCAYG SPCESLVTFTQTPENGSKWTLHLRNMSSSVSG RYECMLTLYPEGMQTKIYNLLIQTHV	134

¹ Домены обозначены на основе описания доменов UniProt для hCD96.

² В случае гомологии последовательности суCD96 между последовательностью hCD96 и последовательностью суCD96 ее использовали для определения домена 1, домена 2 или домена 3.

[00100] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит VH, содержащую одну, две или все три CDR VH, изложенные в данном документе в таблице 1. В определенных вариантах

осуществления антитело содержит CDRH1 VH, изложенную в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRH2 VH, изложенную в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRH3 VH, изложенную в таблице 1.

[00101] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит VL, содержащую одну, две или все три CDR VL, раскрытые в данном документе в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL1 VL, изложенную в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL2 VL, изложенную в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL3 VL, изложенную в таблице 1.

[00102] В определенных вариантах осуществления CDR антитела можно определить в соответствии с Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest (1991), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления CDR легкой цепи антитела определяют в соответствии с Kabat, а CDR тяжелой цепи антитела определяют в соответствии с MacCallum (выше). В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи и/или CDR легкой цепи определяют путем проведения структурного анализа антитела и выявления остатков в варибельной(-ых) области(-ях), которая(-ые), согласно предположениям, вступает(-ют) в контакт с эпитопной областью целевой молекулы (например, CD96 человека и/или яванского макака).

[00103] В определенных вариантах осуществления CDR антитела можно определить в соответствии с схемой нумерации Chothia, которая относится к расположению иммуноглобулиновых структурных петель (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B *et al.*, (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C *et al.*, (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; и патент США № 7709226, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Как правило, при

использовании нумерации по Kabat петля CDRH1 по Chothia присутствует на аминокислотах 26-32, 33 или 34 тяжелой цепи, петля CDRH2 по Chothia присутствует на аминокислотах 52-56 тяжелой цепи, а петля CDRH3 по Chothia присутствует на аминокислотах 95-102 тяжелой цепи, в то время как петля CDRL1 по Chothia присутствует на аминокислотах 24-34 легкой цепи, петля CDRL2 по Chothia присутствует на аминокислотах 50-56 легкой цепи, а петля CDRL3 по Chothia присутствует на аминокислотах 89-97 легкой цепи. Конец петли Chothia CDRH1 при нумерации с использованием системы нумерации по Kabat варьирует между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что схема нумерации по Kabat помещает вставки в H35A и H35B; если нет ни 35A, ни 35B, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют как 35A, так и 35B, петля заканчивается на 34).

[00104] В определенных вариантах осуществления CDR антитела можно определить в соответствии с MacCallum RM *et al.*, (1996) J Mol Biol 262: 732-745, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. См. также, например, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," in *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00105] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит CDR VH по Chothia из VH, раскрытые в данном документе в таблице 1. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит CDR VL по Chothia из VL, раскрытые в данном документе в таблице 1. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит CDR VH по Chothia и CDR VL по Chothia антитела, раскрытые в данном документе в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитела, которые

специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) содержат одну или несколько CDR, при этом CDR по Chothia и Kabat имеют одинаковую аминокислотную последовательность. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и содержит комбинации CDR по Kabat и CDR по Chothia.

[00106] В определенных вариантах осуществления CDR антитела можно определять в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в: Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136; Lefranc M-P *et al.*, (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте; и Lefranc M-P *et al.*, (2009) *Nucleic Acids Res* 37: D1006-D1012.

[00107] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и содержат CDR антитела, которые раскрыты в данном документе в таблице 1, которые определяются с помощью системы нумерации IMGT, например, как описано в Lefranc M-P (1999) выше и Lefranc M-P *et al.*, (1999) выше.

[00108] В определенных вариантах осуществления CDR антитела можно определять в соответствии со схемой нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным областям AbM, которые представляют собой компромисс между CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia и используются программным обеспечением для моделирования антител AbM Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.), включенным в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и содержат CDR антитела, которые раскрыты в данном документе в таблице 1, которые определяются с помощью схемы нумерации AbM.

[00109] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически

связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), где антитело содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности областей CDRH1, CDRH2 и CDRH3 VH, изложенные под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61, и VL, содержащую аминокислотные последовательности областей CDRL1, CDRL2 и CDRL3 VL, изложенные под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, или 75, где каждая CDR определяется в соответствии с определением по MacCallum, определением по Kabat, определением по Chothia, системой нумерации IMGT, определением CDR по AbM, структурным анализом или их комбинацией, где структурный анализ позволяет выявлять остатки в варибельной(-ых) области(-ях), которые, как предполагается, вступают в контакт с эпитопной областью CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака). В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и содержит комбинацию CDR, определенных по определению Kabat, и CDR, определенных с помощью структурного анализа антитела, где структурный анализ позволяет выявлять остатки в варибельной(-ых) области(-ях), которые, как предполагается, вступают в контакт с эпитопной областью CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака).

[00110] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело характеризуется следующими признаками:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность $X_1YX_2X_3X_4$ (SEQ ID NO: 135), где

X_1 представляет собой Q или S;

X_2 представляет собой A или S;

X_3 представляет собой M или I и

X_4 представляет собой H или S;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность $X_1IX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9YX_{10}QKFQG$ (SEQ ID NO: 137), где

X_1 представляет собой W или G;

X_2 представляет собой N или I;

X_3 представляет собой A, E, V или P;

X_4 представляет собой V, G, W или I;

X_5 представляет собой S, Y, T, N или F;

X_6 представляет собой G или W;

X_7 представляет собой D, Y, N или T;

X_8 представляет собой T или A;

X_9 представляет собой K или N и

X_{10} представляет собой S или A;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность $NWGX_1SYGX_2DV$ (SEQ ID NO: 180), $GYDSRPLDV$ (SEQ ID NO: 19) или $GYDSRPLDY$ (SEQ ID NO: 20), где

X_1 представляет собой M или L и

X_2 представляет собой M или L;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность $RASQSIX_1X_2YLN$ (SEQ ID NO: 139) или $GGNNIGSKIVH$ (SEQ ID NO: 26), где

X_1 представляет собой S, T или L и

X_2 представляет собой S, P или W;

(e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность X_1X_2SSLQS (SEQ ID NO: 141) или $DDRDRPS$ (SEQ ID NO: 32), где

X_1 представляет собой S или A и

X_2 представляет собой A, S или E; и/или

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность $QQX_1YSTPALX_2$ (SEQ ID NO: 143) или $QVWDINVHHVI$ (SEQ ID NO: 35), где

X₁ представляет собой S или A и

X₂ представляет собой T или S.

В определенных вариантах осуществления антител, раскрытых в данном документе, аминокислота, непосредственно находящаяся на N-конце CDRH1 (например, как описано в данном документе в таблице 1), представляет собой N, T, S, D или A.

[00111] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело характеризуется следующими признаками:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность X₁YX₂X₃X₄ (SEQ ID NO: 135), где

X₁ представляет собой Q или S;

X₂ представляет собой A или S;

X₃ представляет собой M или I и

X₄ представляет собой H или S;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность X₁IX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉YX₁₀QKFQG (SEQ ID NO: 137), где

X₁ представляет собой W или G;

X₂ представляет собой N или I;

X₃ представляет собой A, E, V или P;

X₄ представляет собой V, G, W или I;

X₅ представляет собой S, Y, T, N или F;

X₆ представляет собой G или W;

X₇ представляет собой D, Y, N или T;

X₈ представляет собой T или A;

X₉ представляет собой K или N и

X₁₀ представляет собой S или A;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность NWGX₁SYGX₂DV (SEQ ID NO: 180), GYDSRPLDV (SEQ ID NO: 19) или GYDSRPLDY (SEQ ID NO: 20), где

X₁ представляет собой M или L и

X₂ представляет собой M или L;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность RASQSIX₁X₂YLN (SEQ ID NO: 139) или GGNNIGSKIVH (SEQ ID NO: 26), где

X₁ представляет собой S, T или L и

X₂ представляет собой S, P или W;

(e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность X₁X₂SSLQS (SEQ ID NO: 141) или DDRDRPS (SEQ ID NO: 32), где

X₁ представляет собой S или A и

X₂ представляет собой A, S или E; и

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQX₁YSTPALX₂ (SEQ ID NO: 143) или QVWDINVHHVI (SEQ ID NO: 35), где

X₁ представляет собой S или A и

X₂ представляет собой T или S.

[00112] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), где антитело содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, изложенные под SEQ ID NO: 1, 5 и 18; 2, 6 и 18; 2, 8 и 18; 2, 9 и 18; 2, 10 и 18; 1, 7 и 18; 2, 11 и 18; 1, 12 и 18; 1, 13 и 18; 1, 14 и 18; 3, 15 и 18; 1, 16 и 18; 1, 5 и 140; 1, 5 и 142; 1, 5 и 179; 4, 17 и 19 или 4, 17 и 20 соответственно.

[00113] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), где

антитело содержит VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, изложенные под SEQ ID NO: 21, 28 и 33; 21, 29 и 33; 21, 30 и 33; 21, 31 и 33; 22, 29 и 33; 24, 29 и 33; 23, 29 и 33; 25, 28 и 34 или 26, 32 и 35 соответственно.

[00114] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), где антитело содержит VH, содержащую области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и VL, содержащую области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где области CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 1, 5, 18, 21, 28 и 33; 1, 5, 18, 21, 29 и 33; 1, 5, 18, 22, 29 и 33; 1, 5, 18, 23, 29 и 33; 1, 5, 18, 24, 29 и 33; 1, 5, 18, 25, 28 и 34; 1, 5, 140, 21, 28 и 33; 1, 5, 142, 21, 28 и 33; 1, 5, 179, 21, 28 и 33; 1, 7, 18, 21, 29 и 33; 1, 12, 18, 21, 28 и 33; 1, 13, 18, 21, 28 и 33; 1, 14, 18, 21, 28 и 33; 1, 16, 18, 21, 28 и 33; 2, 6, 18, 21, 29 и 33; 2, 8, 18, 21, 29 и 33; 2, 9, 18, 21, 30 и 33; 2, 10, 18, 21, 29 и 33; 2, 11, 18, 21, 31 и 33; 3, 15, 18, 21, 28 и 33; 4, 17, 19, 26, 32 и 35 или 4, 17, 20, 26, 32 и 35 соответственно.

[00115] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), содержащее VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, на по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), содержащее VH, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных

последовательностей под SEQ ID NO: 36-61 представляет собой глутамин. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36-61 представляет собой пироглутамат.

[00116] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), содержащее VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, на по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), содержащее VL, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75.

[00117] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), содержащее VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, на по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или 61, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, на по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически

связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), содержащее VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61; а аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36-61 представляет собой глутамин. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36-61 представляет собой пироглутамат.

[00118] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), содержащее аминокислотные последовательности VH и VL, изложенные под SEQ ID NO: 36 и 62; 37 и 62; 37 и 63; 37 и 66; 37 и 67; 37 и 68; 37 и 69; 38 и 63; 39 и 63; 40 и 63; 41 и 63; 42 и 63; 43 и 64; 44 и 64; 45 и 63; 46 и 63; 47 и 65; 48 и 62; 49 и 62; 50 и 62; 51 и 62; 52 и 62; 53 и 62; 54 и 62; 55 и 62; 56 и 62; 57 и 62; 58 и 62; 59 и 62; 60 и 70; 60 и 71; 60 и 72; 60 и 73; 60 и 74; 60 и 75 или 61 и 70 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и VL состоят из аминокислотных последовательностей VH и VL, изложенных под SEQ ID NO: 36 и 62; 37 и 62; 37 и 63; 37 и 66; 37 и 67; 37 и 68; 37 и 69; 38 и 63; 39 и 63; 40 и 63; 41 и 63; 42 и 63; 43 и 64; 44 и 64; 45 и 63; 46 и 63; 47 и 65; 48 и 62; 49 и 62; 50 и 62; 51 и 62; 52 и 62; 53 и 62; 54 и 62; 55 и 62; 56 и 62; 57 и 62; 58 и 62; 59 и 62; 60 и 70; 60 и 71; 60 и 72; 60 и 73; 60 и 74; 60 и 75 или 61 и 70 соответственно. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36-61 представляет собой глутамин. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36-61 представляет собой пироглутамат.

[00119] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) с антителом, содержащим аминокислотные последовательности VH и VL, изложенные под SEQ ID NO: 36 и 62; 37 и 62; 37 и 63; 37 и 66; 37 и 67; 37 и 68; 37 и 69; 38 и 63; 39 и 63; 40 и 63; 41 и 63; 42 и 63; 43 и 64; 44 и 64; 45 и 63; 46 и 63; 47 и 65; 48 и 62; 49 и 62; 50 и 62; 51 и 62; 52 и 62; 53 и 62; 54 и 62; 55 и 62; 56 и 62; 57 и 62; 58 и 62; 59 и 62; 60 и 70; 60 и 71; 60 и 72; 60 и 73; 60 и 74; 60 и 75 или 61 и 70 соответственно.

[00120] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое связывается с таким же или перекрывающимся эпитопом CD96 (например, эпитопом человеческого CD96 или эпитопом CD96 яванского макака), что и антитело, описанное в данном документе, например, антитело, содержащее аминокислотные последовательности VH и VL, изложенные под SEQ ID NO: 36 и 62; 37 и 62; 37 и 63; 37 и 66; 37 и 67; 37 и 68; 37 и 69; 38 и 63; 39 и 63; 40 и 63; 41 и 63; 42 и 63; 43 и 64; 44 и 64; 45 и 63; 46 и 63; 47 и 65; 48 и 62; 49 и 62; 50 и 62; 51 и 62; 52 и 62; 53 и 62; 54 и 62; 55 и 62; 56 и 62; 57 и 62; 58 и 62; 59 и 62; 60 и 70; 60 и 71; 60 и 72; 60 и 73; 60 и 74; 60 и 75 или 61 и 70 соответственно. В определенных вариантах осуществления эпитоп антитела может быть определен, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore[®]), рентген-дифракционных кристаллографических исследований, ELISA-анализов, водородно-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией с электрораспылением и масс-спектрометрией), анализов сканирования олигопептидов на матричной основе и/или картирования с помощью мутагенеза (например, картирования с помощью сайт-направленного мутагенеза). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно осуществить с применением любого из известных в данной области техники способов (например, Giegé R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Кристаллы антитело:антиген можно изучить с помощью хорошо известных методик рентгеновской дифракции и можно уточнить с помощью компьютерного

программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяемое Molecular Simulations, Inc.; см., например Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; U.S. Patent Application No. 2004/0014194), and BUSTER (Bricogne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 10): 1316-1323, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Исследования по картированию с помощью мутагенеза можно проводить с помощью любого способа, известного специалисту в данной области техники. Описание методик мутагенеза, в том числе методик сканирующего аланином мутагенеза, см., например, в Champe M *et al.*, (1995) выше и Cunningham BC & Wells JA (1989) выше. В конкретном варианте осуществления эпитоп антитела определяют с помощью исследований методом сканирующего аланином мутагенеза. Кроме того, антитела, которые распознают и связываются с одним и тем же или перекрывающимися эпитопами CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака), можно выявить с помощью стандартных методик, таких как иммуноанализ, например, при проявлении способности одного антитела блокировать связывание другого антитела с целевым антигеном, т. е. анализ конкурентного связывания. Анализы конкурентного связывания также можно применять для определения того, обладают ли два антитела схожей специфичностью связывания в отношении эпитопа. Конкурентное связывание можно определить в анализе, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака). Известны многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahl C *et al.*, (1983) Methods Enzymol 9: 242-253); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см. Kirkland TN *et al.*, (1986) J Immunol 137: 3614-9); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см. Harlow E & Lane D, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); твердофазный RIA с прямым мечением с помощью метки I-125 (см. Morel GA *et al.*, (1988) Mol Immunol 25(1): 7-15); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см.

Cheung RC *et al.*, (1990) *Virology* 176: 546-52); и RIA с прямым мечением (см. Moldenhauer G *et al.*, (1990) *Scand J Immunol* 32: 77-82), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Как правило, такой анализ предусматривает применение очищенного антигена (например, CD96, такого как человеческий CD96 или CD96 яванского макака), связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими любой из них, немеченного тестируемого иммуноглобулина и меченного эталонного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование можно измерить путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Обычно, тестируемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно, когда конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном на по меньшей мере 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или более. Анализ конкурентного связывания можно скорректировать по структуре для проведения в большом количестве различных форматов с применением либо меченого антигена, либо меченого антитела. В обычной версии этого анализа антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете. Способность немеченных антител блокировать связывание меченных антител с антигеном затем измеряют с помощью радиоактивных или ферментных меток. Для более подробно информации см., например, Wagener C *et al.*, (1983) *J Immunol* 130: 2308-2315; Wagener C *et al.*, (1984) *J Immunol Methods* 68: 269-274; Kuroki M *et al.*, (1990) *Cancer Res* 50: 4872-4879; Kuroki M *et al.*, (1992) *Immunol Invest* 21: 523-538; Kuroki M *et al.*, (1992) *Hybridoma* 11: 391-407 и *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow E & Lane D editors, выше, pp. 386-389, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00121] В определенных вариантах осуществления антитело ингибирует связывание человеческого CD96 с человеческим CD155 (также известным как полиовирусный рецептор (PVR)). В определенных вариантах осуществления связывание человеческого CD96 с человеческим CD155 уменьшаются более чем на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% в присутствии антитела по отношению к связыванию человеческого CD96 с человеческим CD155 при отсутствии антитела.

[00122] В определенных вариантах осуществления антитело ингибирует растворимый фрагмент человеческого CD96 от связывания с растворимым фрагментом человеческого CD155. В определенных вариантах осуществления связывание растворимого фрагмента человеческого CD96 с растворимым фрагментом человеческого CD155 уменьшается на более, чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии антитела по отношению к связыванию растворимого фрагмента человеческого CD96 с растворимым фрагментом человеческого CD155 при отсутствии антитела.

[00123] В определенных вариантах осуществления антитело ингибирует CD96-экспрессирующую клетку от связывания с растворимым фрагментом человеческого CD155. В определенных вариантах осуществления связывание CD96-экспрессирующей клетки с растворимым фрагментом человеческого CD155 уменьшается более чем на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% в присутствии антитела по отношению к связыванию CD96-экспрессирующей клетки с растворимым фрагментом человеческого CD155 при отсутствии антитела.

[00124] В определенных вариантах осуществления антитело ингибирует CD96-экспрессирующую клетку от связывания с клеткой, экспрессирующей человеческий CD155. В определенных вариантах осуществления связывание CD96-экспрессирующей клетки с CD155-экспрессирующей клеткой уменьшатся более чем на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% в присутствии антитела по отношению к связыванию CD96-экспрессирующей клетки с CD155-экспрессирующей клеткой при отсутствии антитела.

[00125] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 или 169. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую

[illegible]

[illegible]

[illegible]

содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 166.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 167.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 168.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 169.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

последовательностей под SEQ ID NO: 76-101 или 144-169 представляет собой пироглутамат.

[00127] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, или 115. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 и 115.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь и легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 76 и 102; 79 и 103; 78 и 103; 82 и 103; 84 и 104; 83 и 104; 86 и 103; 85 и 103; 81 и 103; 80 и 103; 87 и 105; 77 и 102; 88 и 102; 77 и 106; 77 и 107; 77 и 108; 77 и 103; 89 и 102; 90 и 102; 91 и 102; 92 и 102; 93 и 102; 77 и 109; 94 и 102; 95 и 102; 96 и 102; 97 и 102; 98 и 102; 99 и 102; 100 и 110; 100 и 111; 100 и 112; 100 и 113; 100 и 114; 100 и 115; 101 и 110; 144 и 102; 147 и 103; 146 и 103; 150 и 103; 152 и 104; 151 и 104; 154 и 103; 153 и 103; 149 и 103; 148 и 103; 155 и 105; 145 и 102; 156 и 102; 145 и 106; 145 и 107; 145 и 108; 145 и 103; 157 и 102; 158 и 102; 159 и 102; 160 и 102; 161 и 102; 145 и 109; 162 и 102; 163 и 102; 164 и 102; 165 и 102; 166 и 102; 167 и 102; 168 и 110; 168 и 111; 168 и 112; 168 и 113; 168 и 114; 168 и 115 или 169 и 110 соответственно. В определенных вариантах осуществления, где аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76 и 102; 79 и 103; 78 и 103; 82 и 103; 84 и 104; 83 и 104; 86 и 103; 85 и 103; 81 и 103; 80 и 103; 87 и 105; 77 и 102; 88 и 102; 77 и 106; 77 и 107; 77 и 108; 77 и 103; 89 и 102; 90 и 102; 91 и 102; 92 и 102; 93 и 102; 77 и 109; 94 и 102; 95 и 102; 96 и 102; 97 и 102; 98 и 102; 99 и 102; 100 и 110; 100 и 111; 100 и 112; 100 и 113; 100 и 114; 100 и 115; 101 и 110; 144 и 102; 147 и 103; 146 и 103; 150 и 103; 152 и 104; 151 и 104; 154 и 103; 153 и 103; 149 и 103; 148 и 103;

155 и 105; 145 и 102; 156 и 102; 145 и 106; 145 и 107; 145 и 108; 145 и 103; 157 и 102; 158 и 102; 159 и 102; 160 и 102; 161 и 102; 145 и 109; 162 и 102; 163 и 102; 164 и 102; 165 и 102; 166 и 102; 167 и 102; 168 и 110; 168 и 111; 168 и 112; 168 и 113; 168 и 114; 168 и 115 или 169 и 110 соответственно. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76-101 или 144-169 представляет собой глутамин. В определенных вариантах осуществления X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76-101 или 144-169 представляет собой пироглутамат.

[00128] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 79, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 78, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело

содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 84, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 104. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 83, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 104. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 86, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 85, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 81, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 80, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 87, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под

SEQ ID NO: 105. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 88, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 106. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 107. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96

(например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 89, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 90, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 93, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 77, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 109. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ

ID NO: 94, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 95, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 96, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 97, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 98, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 99, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 110. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 111. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 112. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 113. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 114. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 115. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 110. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело

содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 144, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 147, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 146, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 150, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 152, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 104. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 151, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 104. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 154, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под

SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 153, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 149, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 148, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 155, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 105. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 156, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96

(например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 106. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 107. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 103. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 158, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ

ID NO: 159, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 160, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 161, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 145, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 109. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 162, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 163, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 164, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 165, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 166, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 167, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 168, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 110. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 168, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 111. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 168, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 112. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело

содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 168, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 113. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 168, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 114. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 168, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 115. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 169, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 110.

[00129] В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76 и 102 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 79 и 103 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 78 и 103 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 82 и 103 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 84 и 104 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 168 и 114 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 168 и 115 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 169 и 110 соответственно.

[00130] В отношении антител, раскрытых в данном документе, можно применять любой формат антитела. В определенных вариантах осуществления антитело является одноцепочечным антителом или одноцепочечным Fv (scFv). В определенных вариантах осуществления антитело является scFv, слитым с Fc-областью (scFv-Fc). В определенных вариантах осуществления антитело является Fab-фрагментом. В определенных вариантах осуществления антитело является F(ab')₂-фрагментом.

[00131] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело является мультиспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом), которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и вторым антигеном.

[00132] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело является конъюгированным с цитотоксическим средством, цитостатическим средством, токсином, радионуклидом или детектируемой меткой. В определенных вариантах осуществления цитотоксическое средство способно индуцировать гибель или разрушение клетки при контакте с ней. В определенных вариантах осуществления цитостатическое средство способно предупреждать или существенно уменьшать пролиферацию и/или ингибировать активность или осуществление функции клетки при контакте с ней. В определенных вариантах осуществления цитотоксическое средство или цитостатическое средство является химиотерапевтическим средством. В определенных вариантах осуществления радионуклид выбран из группы, состоящей из isotopes ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹¹⁷Lu, ¹²¹I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁹⁸Au, ²¹¹At, ²¹³Bi, ²²⁵Ac и ¹⁸⁶Re.

В определенных вариантах осуществления детектируемая метка содержит флуоресцентную частицу или концевую группу для клик-химии.

[00133] В антителах, раскрытых в данном документе, можно применять любую константную область иммуноглобулина (Ig). В определенных вариантах осуществления область Ig относится к человеческой молекуле иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY, любому классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любому подклассу (например, IgG2a и IgG2b) молекулы иммуноглобулина.

[00134] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 121 или 175. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 122 или 123.

[00135] В определенных вариантах осуществления в Fc-область описанного в данном документе антитела (например, домен CH2 (остатки 231-340 человеческого IgG1) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG1) и/или шарнирную область, которая пронумерована в соответствии с системой нумерации EU), внесена одна, две или более мутаций (например, аминокислотных замен) для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке крови, реакция связывания комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность.

[00136] В определенных вариантах осуществления одна, две или более мутаций (например, аминокислотные замены) внесены в шарнирную область Fc-области (домен CH1) так, чтобы изменялось количество цистеиновых остатков в шарнирной области (например, увеличивалось или уменьшалось), как описано, например, в патенте США № 5677425, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Количество цистеиновых остатков в шарнирной

области домена CH1 может быть изменено, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для изменения (например, увеличения или уменьшения) стабильности антитела.

[00137] В конкретном варианте осуществления одна, две или более аминокислотных мутаций (например, замен, вставок или делеций) внесены в константный домен IgG или его связывающийся с FcRn фрагмент (предпочтительно Fc-фрагмент или шарнир-Fc-доменный фрагмент) для изменения (например, уменьшения или увеличения) периода полужизни антитела в условиях *in vivo*. См., например, международные публикации США №№ WO 02/060919, WO 98/23289 и WO 97/34631; а также патенты США №№ 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, например, мутации, которые будут изменять (например, увеличивать или уменьшать) период полужизни антитела в условиях *in vivo*. В определенных вариантах осуществления, одна, две или более аминокислотных мутаций (например, замен, вставок или делеций) внесены в константный домен IgG или его связывающийся с FcRn фрагмент (предпочтительно Fc-фрагмент или шарнир-Fc-доменный фрагмент) для уменьшения периода полужизни антитела в условиях *in vivo*. В других вариантах осуществления, одна, две или более аминокислотных мутаций (например, замен, вставок или делеций) внесены в константный домен IgG или его связывающийся с FcRn фрагмент (предпочтительно Fc-фрагмент или шарнир-Fc-доменный фрагмент) для увеличения периода полужизни антитела в условиях *in vivo*. В конкретном варианте осуществления антитела могут иметь одну или более аминокислотных мутаций (например, замен) во втором константном (CH2) домене (остатки 231-340 человеческого IgG1) и/или в третьем константном (CH3) домене (остатки 341-447 человеческого IgG1), которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В конкретном варианте осуществления константная область IgG1 описанного в данном документе антитела, содержит замену метионина (M) на тирозин (Y) в положении 252, замену серина (S) на треонин (T) в положении 254 и замену треонина (T) на глутаминовую кислоту (E) в положении 256, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. См. патент США № 7658921, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Было показано, что такой тип мутантного IgG, называемый «мутантом YTE»,

демонстрирует четырехкратно увеличенный период полужизни по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. Dall'Acqua WF *et al.*, (2006) J Biol Chem 281: 23514-24, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных вариантах осуществления антитело содержит константный домен IgG, содержащий одну, две, три или более аминокислотных замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[00138] В определенных вариантах осуществления одна, две или более мутаций (например, аминокислотных замен) внесены в Fc-область описанного в данном документе антитела (например, домен CH2 (остатки 231-340 человеческого IgG1) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG1) и/или шарнирную область, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU), для увеличения или уменьшения аффинности антитела к Fc-рецептору (например, активированному Fc-рецептору) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-области антитела, которые уменьшают или увеличивают аффинность антитела к Fc-рецептору, и методики внесения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалистам в данной области техники. Примеры мутаций в Fc-области антитела, которые можно произвести для изменения аффинности антитела к Fc-рецептору, описаны, например, в Smith P *et al.*, (2012) PNAS 109: 6181-6186, патенте США № 6737056 и международных публикациях №№ WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00139] В определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, которая является вариантом константной области тяжелой цепи дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи дикого типа связывается с FcγRIIB с большей аффинностью, чем константная область тяжелой цепи дикого типа связывается с FcγRIIB. В определенных вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи дикого типа является вариантом человеческой константной области тяжелой цепи, например, вариантом константной области тяжелой цепи человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В определенных вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG содержит одну или несколько из

следующих аминокислотных мутаций в соответствии с системой нумерации EU: G236D, P238D, S239D, S267E, L328F и L328E. В определенных вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG содержит набор аминокислотных мутаций, выбранных из группы, состоящей из: S267E и L328F; P238D и L328E; P238D и одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из E233D, G237D, H268D, P271G и A330R; P238D, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R; G236D и S267E; S239D и S267E; V262E, S267E и L328F; и V264E, S267E и L328F, в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления Fc γ RIIB экспрессируется на клетке, выбранной из группы, состоящей из макрофагов, моноцитов, В-клеток, дендритных клеток, эндотелиальных клеток и активированных Т-клеток.

[00140] В дополнительном варианте осуществления одна, две или более аминокислотных замен внесены в Fc-область константного домена IgG для изменения эффекторной(-ых) функции(-ий) антитела. Например, одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 239, 243, 267, 292, 297, 300, 318, 320, 322, 328, 330, 332 и 396, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, можно заменить на отличающийся аминокислотный остаток с тем, чтобы антитело имело измененную аффинность в отношении эффекторного лиганда, но сохраняло антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 системы комплемента. Такой подход более подробно описан в патентах США №№ 5624821 и 5648260, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления делеция или инактивация (с помощью точечных мутаций или других средств) домена константной области может уменьшать связывание циркулирующего в кровотоке антитела с Fc-рецептором, тем самым повышая опухолевую локализацию. Описание мутаций, которые удаляют или инактивируют константный домен и тем самым повышают опухолевую локализацию, см., например, в патентах США №№ 5585097 и 8591886, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления одну или несколько аминокислотных замен можно внести в Fc-область описанного в данном документе антитела, для удаления сайтов

потенциального гликозилирования на Fc-области, которая может снижать связывание с Fc-рецептором (см., например, Shields RL *et al.*, (2001) J Biol Chem 276: 6591-604, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В различных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать одну или более из следующих мутаций: замену N297A; замену N297Q; замену L234A; замену L234F; замену L235A; замену L235F; замену L235V; замену L237A; замену S239D; замену E233P; замену L234V; замену L235A; делецию C236; замену P238A; замену S239D; замену F243L; замену D265A; замену S267E; замену L328F; замену R292P; замену Y300L; замену A327Q; замену P329A; замену A332L; замену I332E; или замену P396L, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[00141] В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из D265A, P329A и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из L235A, L237A и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из S267E, L328F и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из S239D, I332E, необязательно A330L и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из L235V, F243L, R292P, Y300L, P396L и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из S267E, L328F и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[00142] В конкретном варианте осуществления описанное в данном документе антитело содержит константный домен IgG1 с аминокислотной заменой N297Q или N297A, пронумерованной в соответствии с системой нумерации EU. В одном варианте осуществления описанное в данном документе антитело содержит константный домен IgG1 с мутацией, выбранной из группы, состоящей из D265A, P329A и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В другом варианте осуществления описанное в данном документе антитело содержит константный домен IgG1 с мутацией, выбранной из группы, состоящей из L234A, L235A и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В другом варианте осуществления описанное в данном документе антитело содержит константный домен IgG1 с мутацией, выбранной из группы, состоящей из L234F, L235F, N297A и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления аминокислотные остатки в константной области описанного в данном документе антитела в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, не являются L, L и D соответственно. Такой подход подробно описан в международной публикации № WO 14/108483, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В конкретном варианте осуществления аминокислоты, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, представляют собой F, E и A; или A, A и A соответственно.

[00143] В определенных вариантах осуществления одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322 в константной области описанного в данном документе антитела, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, можно заменить на отличающийся аминокислотный остаток с тем, чтобы антитело обладало измененным связыванием с C1q и/или обладало уменьшенной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC) или не обладало ею. Такой подход более подробно описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al.), который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления изменяют один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных положений 231-238 в N-

концевой области домена CH2 описанного в данном документе антитела, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, тем самым изменяя способность антитела фиксировать систему комплемента. Такой подход дополнительно описан в международной публикации № WO 94/29351, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления для повышения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или повышения аффинности антитела к Fcγ-рецептору Fc-область описанного в данном документе антитела модифицируют путем мутации одной или нескольких аминокислот (например, внесения аминокислотных замен) в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. Такой подход дополнительно описан в международной публикации № WO 00/42072, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00144] В определенных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело содержит модифицированный константный домен IgG1, при этом данная модификация повышает способность антитела опосредовать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC). В определенных вариантах осуществления 0,1, 1 или 10 мкг/мл антитела способны индуцировать клеточную гибель по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или 60% CD96-экспрессирующих клеток в пределах 1, 2 или 3 часов, что измеряют способами, которые описаны в данном документе и/или известны специалисту в данной области техники. В определенных вариантах осуществления модифицированный константный домен IgG1 содержит замены S239D и I332E, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления модифицированный константный домен IgG1 содержит замены S239D, A330L и I332E, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления модифицированный константный домен IgG1 содержит замены L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L,

которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления антитело способно индуцировать клеточную гибель эффекторных Т-клеток и регуляторных Т-клеток, при этом процент регуляторных Т-клеток, которые подвергаются клеточной гибели, превышает процент эффекторных Т-клеток, которые подвергаются клеточной гибели, в по меньшей мере 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раз, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза или 5 раз.

[00145] В определенных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело содержит константную область антитела IgG₄, а серин в аминокислотном остатке 228 тяжелой цепи, который пронумерован в соответствии с системой нумерации EU, заменен на пролин. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), при этом антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

[00146] В определенных вариантах осуществления любую из описанных в данном документе мутаций или модификаций константной области можно внести в одну или обе константные области тяжелой цепи описанного в данном документе антитела, имеющего две константные области тяжелой цепи.

[00147] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и выполняет функцию антагониста (например, уменьшает или ингибирует активность CD96).

[00148] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и уменьшает или ингибирует активность CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, или 99%, что измеряют способами, описанными в данном документе и/или известными

специалисту в данной области техники, относительно активности CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и уменьшает или ингибирует активность CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз или более, что измеряют способами, описанными в данном документе и/или известными специалисту в данной области техники, относительно активности CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96)). Неограничивающие примеры активности CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) могут включать передачу сигналов CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака); связывание CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) с его лигандом (например, CD155) или его фрагментом и/или слитым белком); активацию Т-клетки (например, Т-клетки, экспрессирующей человеческий CD96); активацию натурального киллера (NK-клетки); уменьшение или ингибирование регуляторной Т-клетки; увеличение продуцирования цитокинов (например, IL-2); увеличение активности CD155 (например, человеческого CD155). В конкретных вариантах осуществления, увеличение активности CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) оценивают так, как описано в примерах.

[00149] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и уменьшает или ингибирует связывание CD96 (например, человеческого или CD96 яванского макака) с его лигандом (например, CD155) или его фрагментом и/или слитым белком) на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно связывания CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) с таким лигандом без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим или CD96 яванского макака)). В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим или CD96 яванского макака) и повышает связывание CD96 (например, человеческого или CD96 яванского макака) с его лигандом (например, CD155 (например, человеческим CD155 или CD155 яванского макака) его фрагментом и/или слитым белком) в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно связывания CD96 (например, человеческого CD96) с таким лигандом без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим или CD96 яванского макака)).

[00150] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и активирует Т-клетку (например, Т-клетку, экспрессирующую человеческий CD96). В определенных вариантах осуществления Т-клетка является Т-клеткой памяти. В определенных вариантах осуществления Т-клетка является первичной CD3-экспрессирующей Т-клеткой. В определенных вариантах осуществления Т-клетка является CD96-экспрессирующей клеткой Jurkat. В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает активность ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, или 99%, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно активности

NFAT без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает активность NFAT в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или более, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно активности NFAT без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления антитело повышает активность NFAT в присутствии лиганда CD96 (например, CD155) его фрагмента, и/или слитого белка, и/или клетки, экспрессирующей лиганд CD96 (например, моноцита или дендритной клетки).

[00151] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2) на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, или 99%, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)). В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2) в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или более, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту

в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления антитело повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2) в присутствии лиганда CD96 (например, CD155), или его фрагмента и/или слитого белка, и/или клетки, экспрессирующей лиганд CD96 (например, моноцита или дендритной клетки). В определенных вариантах осуществления антитело повышает продуцирование IL-2 относительно продуцирования IL-2 без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)).

[00152] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и которое либо отдельно, либо в комбинации с антителом к PD-1 (например, пембролизумабом или ниволумабом) повышает продуцирование IFN γ и/или IL-2 в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) в ответ на стимуляцию энтеротоксином А стафилококка (SEA) в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования IFN γ и/или IL-2 без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)).

[00153] В определенных вариантах осуществления стимулированные энтеротоксином А стафилококка (SEA) мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека в присутствии описанного в данном документе антитела, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), характеризуются увеличенным продуцированием IFN γ и/или IL-2 в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз,

20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз относительно продуцирования IFN γ и/или IL-2 из PBMC, простимулированных только SEA без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)), что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники.

[00154] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и повышает или стимулирует вторичный иммунный ответ Т-клеткой памяти. В определенных вариантах осуществления Т-клеткой памяти является CD8 эффекторная Т-клетка памяти. В определенных вариантах осуществления Т-клеткой памяти является CD4 эффекторная Т-клетка памяти. В определенных вариантах осуществления антитело повышает количество пролиферирующих Т-клеток памяти при контакте Т-клеток памяти с их родственным(-ыми) антигеном(-ами) в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно количества пролиферирующих Т-клеток памяти при контакте Т-клеток памяти с их родственным(-ыми) антигеном(-ами) при отсутствии какого-либо антитела или в присутствии неродственного антитела (например, антитела, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления антитело повышает продуцирование цитокина (например, IFN γ , TNF α) из Т-клетки памяти при контакте Т-клетки памяти с ее родственным антителом в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокина из Т-клетки памяти при контакте Т-клетки памяти с ее родственным антителом при отсутствии какого-либо антитела или

в присутствии неродственного антитела (например, антитела, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)).

[00155] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и активирует NK-клетку. В определенных вариантах осуществления NK-клетки являются выделенными. В определенных вариантах осуществления NK-клетки находятся в смешанной культуре PBMC. В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает уровень экспрессии CD107a в NK-клетках по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, или 99%, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно уровня экспрессии CD107a в NK-клетках без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает уровень экспрессии CD107a в NK-клетках в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или более, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно уровня экспрессии CD107a в NK-клетках без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает продуцирование цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, или 99%, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не

связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает продуцирование цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или более, что оценивают способами, описанными в данном документе или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток без каких-либо антител или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака))).

5.3 Фармацевтические композиции

[00156] В данном документе предусмотрены композиции, содержащие раскрытое в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака), имеющее требуемую степень чистоты, в физиологически приемлемом носителе, вспомогательном веществе или стабилизирующем веществе (см, например, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизирующее вещества являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, в том числе аскорбиновая кислота и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид, бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метилпарабен или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы Zn-белок);

и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG).

[00157] В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат раскрытое в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) и необязательно одно или более дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат эффективное количество описанного в данном документе антитела и необязательно одно или более дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В определенных вариантах осуществления антитело является единственным активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть полезны при увеличении или стимуляции активности CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) и лечения такого состояния, как рак или инфекционное заболевание. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению, содержащей антитело к CD96 по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного препарата. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака или инфекционного заболевания.

[00158] Фармацевтически приемлемые носители, применяемые в препаратах для парентерального применения, включают водные среды-носители, безводные среды-носители, противомикробные средства, изотонические средства, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие средства, эмульгирующие средства, секвестранты или хелатообразующие средства и другие фармацевтические приемлемые вещества. Примеры водных сред-носителей включают раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций, растворы Рингера для инъекций с добавлением декстрозы и лактата. Безводные среды-носители для парентерального применения включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло

и арахисовое масло. К лекарственным препаратам для парентерального применения, упакованным в контейнеры для множества доз, можно добавить противомикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях, которые включают фенолы или крезолы, ртуть-содержащие вещества, бензиловый спирт, хлоробутанол, метиловые и пропиловые сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, бензалкония хлорид и бензетония хлорид. Изотонические средства включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфатный и цитратный. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаин-гидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие средства включают натрий-карбогидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгирующие средства включают полисорбат 80 (TWEEN® 80). Секвестрант или хелатирующее ионы металлов средство включают EDTA. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для водорастворимых сред-носителей и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для корректировки pH.

[00159] Фармацевтическую композицию можно составить для любого пути введения субъекту. Конкретные примеры путей введения включают интраназальный, пероральный, пульмональный, трансдермальный, интрадермальный и парентеральный. Также в данном документе предусмотрено парентеральное введение, характеризующееся либо подкожной, либо внутримышечной, либо внутривенной инъекцией. Инъекционные препараты могут быть приготовлены в традиционных формах, в виде либо водных растворов или суспензий, либо твердых форм, пригодных для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Инъекционные препараты, растворы и эмульсии также содержат одно или более вспомогательных веществ. Подходящими вспомогательными веществами являются, например, вода, солевой раствор, декстроза, глицерол или этанол. Кроме того, в случае необходимости, подлежащие введению фармацевтические композиции также могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных материалов, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, буферизирующие средства для регулирования pH, стабилизирующие вещества, усилители растворимости и другие подобные средства,

такие как, например, ацетат натрия, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат и циклодекстрины.

[00160] Препараты для парентерального введения антител включают стерильные растворы, готовые для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые к смешиванию с растворителем непосредственно перед применением, в том числе таблетки для подкожных инъекций, стерильные суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые к смешиванию со средой-носителем непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть как водными, так и неводными.

[00161] При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический раствор или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) и растворы, содержащие загустители и солюбилизирующие средства, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, а также их смеси.

[00162] Смеси для местного применения, содержащие антитела, получают так, как описано для местного и системного введения. Полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсии и т. п. и может быть составлена в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, крепких настоев, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей, препаратов для промывания, спреев, суппозиториев, повязок, кожных пластырей или любых других составов, подходящих для местного применения.

[00163] Антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака), описанное в данном документе, может быть составлено в виде аэрозоля для местного применения, например, путем ингаляции (см., например, патенты США №№ 4044126, 4414209 и 4364923, в которых описаны аэрозоли для доставки стероида, применимые для лечения воспалительных заболеваний, особенно астмы, и они включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Такие составы для введения в дыхательные пути могут быть представлены в форме аэрозоля или раствора для небулайзера или в виде мелкодисперсного порошка для инсуффляции, отдельно или в комбинации с инертным носителем, таким

как лактоза. В таком случае частицы состава в одном варианте осуществления будут иметь диаметр менее 50 микрон, в одном варианте осуществления менее 10 микрон.

[00164] Антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака), описанное в данном документе, может быть составлено для очагового или местного применения, например, для местного применения на коже и слизистых оболочках, например, в глаз, в форме гелей, кремов и лосьонов и для нанесения на глаз или для интрацестерального или интраспинального применения. Предусмотрено местное применение для чрескожной доставки, а также для введения в глаза или на слизистую оболочку или для вариантов ингаляционной терапии. Также назальные растворы антитела можно вводить отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

[00165] Трансдермальные пластыри, в том числе устройства для ионофореза и электрофореза, хорошо известны специалистам в данной области техники, и их можно применять для введения антитела. Например, такие пластыри раскрыты в патентах США №№ 6,267,983, 6,261,595, 6,256,533, 6,167,301, 6,024,975, 6,010,715, 5,985,317, 5,983,134, 5,948,433 и 5,860,957, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00166] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая описанное в данном документе антитело, представляет собой лиофилизированный порошок, который можно восстановить для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Он также может быть восстановлен и составлен в виде твердых веществ или гелей. Лيوфилизированный порошок получают путем растворения описанного в данном документе антитела или его фармацевтически приемлемого производного в подходящем растворителе. В определенных вариантах осуществления лиофилизированный порошок является стерильным. Растворитель может содержать вспомогательное вещество, которое повышает стабильность, или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, полученного из порошка. Вспомогательные вещества, которые можно применять, включают без ограничения декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузную патоку, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другое подходящее средство. Растворитель также может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат

натрия или калия, или другой подобный буфер, известный специалистам в данной области техники, в одном варианте осуществления приблизительно с нейтральным рН. В результате последующего стерилизующего фильтрования раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, получают требуемый состав. В одном варианте осуществления полученный раствор будут распределять по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать одну дозу или несколько доз соединения. Лيوфилизированный порошок можно хранить в соответствующих условиях, например, при температуре от приблизительно 4°C до комнатной температуры. В результате восстановления такого лиофилизированного порошка водой для инъекций получают состав для применения при парентеральном введении. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляют в стерильную воду или другой подходящий носитель. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество можно определить опытным путем.

[00167] Раскрытые в данном документе антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) и другие композиции, представленные в данном документе, также могут быть составлены таким образом, чтобы они были нацелены на конкретную ткань, рецептор или другую область тела подлежащего лечению субъекта. Многие такие способы нацеливания хорошо известны специалистам в данной области техники. Все такие способы нацеливания предусмотрены в данном документе для применения в композициях по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры способов нацеливания см., например, в патентах США №№ 6,316,652, 6,274,552, 6,271,359, 6,253,872, 6,139,865, 6,131,570, 6,120,751, 6,071,495, 6,060,082, 6,048,736, 6,039,975, 6,004,534, 5,985,307, 5,972,366, 5,900,252, 5,840,674, 5,759,542 и 5,709,874, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В конкретном варианте осуществления описанное в данном документе антитело нацелено на опухоль.

[00168] Композиции, предназначенные для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через, например, мембраны для стерилизующего фильтрования.

5.4 Способы применения и варианты применения

[00169] Согласно другому аспекту, в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта с применением раскрытых в данном документе антител к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака). С помощью раскрытых в данном документе антител к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) можно лечить любое заболевание или нарушение у субъекта, который получит полезный результат от уменьшения функции CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака). В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение устойчиво к средству, нацеливающемуся на контрольную точку иммунного ответа (например, антагонистическому антителу к CTLA-4, антагонистическому антителу к PD-L1, антагонистическому антителу к PD-L2 или антагонистическому антителу к PD-1). В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение рецидивирует после лечения средством, нацеливающимся на контрольную точку иммунного ответа (например, антагонистическим антителом к CTLA-4, антагонистическим антителом к PD-L1, антагонистическим антителом к PD-L2 или антагонистическим антителом к PD-1).

[00170] Раскрытые в данном документе антитела к CD96 (например, человеческому CD96), в частности, пригодны для ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям, и, соответственно, их можно применять в качестве средства иммунотерапии для субъектов, болеющих раком. Например, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ увеличения активации Т-клеток (например, CD8⁺ цитотоксических Т-клеток, CD4⁺ хелперных Т-клеток, NKT-клеток, эффекторных Т-клеток или Т-клеток памяти) в ответ на антиген у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или фармацевтической композиции на его основе, которые раскрыты в данном документе. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, которые раскрыты в данном документе.

[00171] Формы рака, которые можно лечить с помощью антител к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, включают без ограничения солидную опухоль, гемобластоз (например, лейкоз, лимфому, миелому, например, множественную миелому) и метастатическое поражение. В одном варианте осуществления рак является солидной опухолью. Примеры солидных опухолей включают злокачественные новообразования, например, саркомы и карциномы, например, аденокарциномы различных систем органов, таких как поражающие легкое, молочную железу, яичник, лимфоузел, желудочно-кишечный тракт (например, толстую кишку), анальный канал, гениталии и мочеполовой тракт (например, клетки почки, уротелия, мочевого пузыря, предстательную железу), глотку, ЦНС (например, головной мозг, нервные или глиальные клетки), голову и шею, кожу (например, меланома) и поджелудочную железу, а также аденокарциномы, которые включают злокачественные новообразования, такие как формы рака толстой кишки, рак прямой кишки, почечно-клеточную карциному, рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого), рак тонкого кишечника и рак пищевода. Рак может находиться на ранней, средней, поздней стадии или быть метастатическим раком. В определенных вариантах осуществления рак устойчив к средству, нацеливающемуся на контрольную точку иммунного ответа (например, антагонистическому антителу к CTLA-4, антагонистическому антителу к PD-L1, антагонистическому антителу к PD-L2 или антагонистическому антителу к PD-1). В определенных вариантах осуществления рак рецидивирует после лечения средством, нацеливающимся на контрольную точку иммунного ответа (например, антагонистическим антителом к CTLA-4, антагонистическим антителом к PD-L1, антагонистическим антителом к PD-L2 или антагонистическим антителом к PD-1).

[00172] В одном варианте осуществления рак выбран из рака легкого (например, аденокарциномы легкого или немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) (например, NSCLC с плоскоклеточной и/или не плоскоклеточной гистологией, или NSCLC-аденокарциномы)), меланомы (например, меланомы на поздних стадиях), почечного рака (например, почечно-клеточной карциномы), рака печени (например, гепатоклеточной карциномы), миеломы (например, множественной миеломы), рака

предстательной железы, рака молочной железы (например, рака молочной железы, при котором не экспрессируется один, два или все рецепторы эстрогена, рецептор прогестерона или Her2/neu, например, трижды отрицательного рака молочной железы), рака яичника, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи (например, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), рака анального канала, рака желудка и пищевода (например, плоскоклеточной карциномы пищевода), мезотелиомы, рака носоглотки, рака щитовидной железы, рака шейки матки, эпителиального рака, перитониального рака или лимфопролиферативного заболевания (например, посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания). В конкретном варианте осуществления рак является раком шейки матки.

[00173] В одном варианте осуществления рак является гематологическим раком, например, лейкозом, лимфомой или миеломой. В одном варианте осуществления рак является лейкозом, например, острым лимфобластным лейкозом (ALL), острым миелогенным лейкозом (AML), острым миелобластным лейкозом (AML), хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL), хроническим миелогенным лейкозом (CML), хроническим миелоидным лейкозом (CML), хроническим миеломоноцитарным лейкозом (CMML), хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) или волосатоклеточным лейкозом. В одном варианте осуществления рак представляет собой лимфому, например, В-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому с активированными В-клетками (ABC), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому зародышевого центра (GCB), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рецидивирующую неходжкинскую лимфому, рефрактерную неходжкинскую лимфому, рецидивирующую фолликулярную неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, малую лимфоцитарную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфоплазмоцитарную лимфому или экстранодальную лимфому маргинальной зоны. В одном варианте осуществления рак является миеломой, например, множественной миеломой.

[00174] В другом варианте осуществления рак выбран из карциномы (например, метастатической карциномы или карциномы на поздних стадиях), меланомы или карциномы легкого, например, немелкоклеточной карциномы легкого.

[00175] В одном варианте осуществления рак является раком легкого, например, аденокарциномой легкого, немелкоклеточным раком легкого или мелкоклеточным раком легкого.

[00176] В одном варианте осуществления рак является меланомой, например, меланомой на поздних стадиях. В одном варианте осуществления рак является меланомой на поздних стадиях или неоперабельной меланомой, которая не отвечает на другие варианты терапии. В других вариантах осуществления рак является меланомой с мутацией BRAF (например, мутацией V600 BRAF). В еще одних вариантах осуществления антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или фармацевтическую композицию, раскрытые в данном документе, вводят после лечения антителом к CTLA-4 (например, ипилимумабом) с ингибитором BRAF (например, вемурафенибом или дабрафенибом) или без него.

[00177] В другом варианте осуществления рак является гепатокарциномой, *например*, гепатокарциномой на поздних стадиях, с вирусной инфекцией или без нее, например, хроническим вирусным гепатитом.

[00178] В другом варианте осуществления рак является раком предстательной железы, например, раком предстательной железы на поздних стадиях.

[00179] В еще одном варианте осуществления рак является миеломой, например, множественной миеломой.

[00180] В еще одном варианте осуществления рак является раком почки, например, почечно-клеточной карциномой (RCC) (например, метастатической RCC, светлоклеточным раком почки (CCRCC) или папиллярной почечно-клеточной карциномой).

[00181] В еще одном варианте осуществления рак выбран из рака легкого, меланомы, рака почки, рака молочной железы, колоректального рака, лейкоза или метастатического поражения раковым заболеванием.

[00182] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ предупреждения или лечения инфекционного заболевания у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или фармацевтической композиции на его основе, которые раскрыты в данном документе. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены способы предупреждения и/или лечения инфекции (например, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, протозойной инфекции или паразитарной инфекции). Инфекция, которую предупреждают и/или лечат в соответствии с данными способами, может быть вызвана возбудителем инфекции, указанным в данном документе. В конкретном варианте осуществления описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или композиция на его основе являются единственным активным средством, вводимым субъекту. В определенных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или композицию на его основе применяют в комбинации с противоинфекционными мерами (например, противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми или противогельминтными средствами) для лечения инфекционных заболеваний. Следовательно, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе предупреждения и/или лечения инфекционного заболевания, необязательно где антитело или фармацевтическая композиция являются единственным активным средством, вводимым субъекту, или где антитело или фармацевтическую композицию применяют в комбинации с противоинфекционными мерами.

[00183] Инфекционные заболевания, которые можно лечить и/или предупреждать с помощью антител к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, вызываются возбудителями инфекции, в том числе без ограничения бактериями, паразитами, грибами, простейшими и вирусами. В конкретном варианте осуществления инфекционное заболевание, которое лечат и/или предупреждают с помощью антител к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского

макака) или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, вызывается вирусом. Вирусные заболевания или вирусные инфекции, которые можно предупредить и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают без ограничения заболевания, вызванные гепатитом типа А, гепатитом типа В, гепатитом типа С, гриппом (например, гриппом А или гриппом В), ветряной оспой, аденовирусом, простым герпесом типа I (HSV-I), простым герпесом типа II (HSV-II), чумой крупного рогатого скота, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом папилломы, паповавирусом, цитомегаловирусом, эхиновирусом, арбовирусом, хантавирусом, вирусом Коксаки, эпидемическим вирусом паротита, вирусом кори, вирусом краснухи, вирусом полиомиелита, натуральной оспой, вирусом Эпштейна-Барр, вирусом иммунодефицита человека типа I (ВИЧ-I), вирусом иммунодефицита человека типа II (ВИЧ-II) и возбудителями вирусных заболеваний, таких как вирусный менингит, энцефалит, лихорадка денге или натуральная оспа.

[00184] Бактериальные инфекции, которые можно предупредить и/или лечить, включают инфекции, вызванные *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериальные заболевания, вызванные бактериями (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*), которые можно предупредить и/или лечить в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают без ограничения *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (болезнь Лайма), *Bacillus anthracis* (сибирская язва), столбняк, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, микобактерии, коклюш, холеру, чуму, дифтерию, хламидию, *S. aureus* и легионеллу.

[00185] Вызванные простейшими протозойные заболевания или протозойные инфекции, которые можно предупредить и/или лечить в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают без ограничения лейшманию, кокцидоз, трипаномозу, шистозому или малярию. Вызванные паразитами паразитические заболевания или паразитические инфекции, которые можно предупредить и/или лечить в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают без ограничения хламидию и рекеттсию.

[00186] Грибковые заболевания или грибковые инфекции, которые можно предупредить и/или лечить в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают без ограничения заболевания, вызванные инфекциями *Candida*, зигомикоз, *Candida mastitis*, прогрессирующий диссеминированный трихоспороноз с латентной трихоспорономией, диссеминированный кандидоз, паракокцидиомикоз легких, аспергиллез легких, пневмонию *Pneumocystis carinii*, криптококковый менингит, *кокцидиоидный* менингоэнцефалит и цереброспинальный васкулит, инфекцию *Aspergillus niger*, *Fusarium keratitis*, микозы придаточных пазух носа, эндокардит, вызванный *Aspergillus fumigatus*, дисхондроплазию большеберцовой кости, вагинит, вызванный *Candida glabrata*, кандидоз ротоглотки, X-сцепленную хроническую гранулематозную болезнь, микоз стоп, кандидоз кожи, микотический плацентит, диссеминированный трихоспороноз, аллергический бронхолегочный аспергиллез, микотический кератит, инфекцию *Cryptococcus neoformans*, грибковый перитонит, инфекцию *Curvularia geniculata*, стафилококковый эндофтальмит, споротрихоз и дерматофитоз.

[00187] В определенных вариантах осуществления данные способы дополнительно включают введение дополнительного терапевтического средства субъекту. В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является химиотерапевтическое, радиотерапевтическое или средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления химиотерапевтическим средством является гипометилирующее средство (например, азацитидин). В определенных вариантах осуществления химиотерапевтическим средством является индуцирующее повреждение ДНК средство (например, гемцитабин). В определенных вариантах осуществления средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа, выбрано из группы, состоящей из антагонистического антитела к CTLA-4, антагонистического антитела к PD-L1, антагонистического антитела к PD-L2, антагонистического антитела к PD-1, антагонистического антитела к TIM-3, антагонистического антитела к LAG-3, антагонистического антитела к VISTA, антагонистического антитела к CD96, антагонистического антитела к CEACAM1, агонистического антитела к CD137, агонистического антитела к GITR и агонистического антитела к OX40. В определенных вариантах осуществления

средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа, выбрано из группы, состоящей из антагонистического антитела к CTLA-4, антагонистического антитела к PD-L1, антагонистического антитела к PD-L2 и антагонистического антитела к PD-1, где антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, обеспечивают синергический эффект с средством, нацеливающимся на контрольную точку иммунного ответа.

[00188] В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе по настоящему изобретению, где способ дополнительно включает введение дополнительного терапевтического средства субъекту. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к (a) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в качестве лекарственного препарата. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к (a) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в способе лечения рака. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплекту компонентов, содержащему (a) антитело и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) дополнительное терапевтическое средство. В одном варианте осуществления дополнительным терапевтическим средством является химиотерапевтическое, радиотерапевтическое или средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа.

[00189] В определенных вариантах осуществления в способах, раскрытых в данном документе, применяют антитело к PD-1. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является ниволумаб, также известный как BMS-936558 или MDX1106, разработанный Bristol-Myers Squibb. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является пембролизумаб, также известный как ламбролизумаб или MK-3475, разработанный Merck & Co. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является пидилизумаб, также известный как CT-011, разработанный CureTech. В определенных вариантах

осуществления антителом к PD-1 является MEDI0680, также известное как AMP-514, разработанное Medimmune. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является PDR001 разработанное Novartis Pharmaceuticals. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является REGN2810 разработанное Regeneron Pharmaceuticals. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является PF-06801591, разработанное Pfizer. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является BGB-A317 разработанное BeiGene. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является TSR-042 разработанное AnaptysBio и Tesaro. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является SHR-1210 разработанное Hengrui.

[00190] Дополнительные неограничивающие примеры антител к PD-1, которые можно применять при лечении способами, раскрытыми в данном документе, раскрыты в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей: патент США № 6808710; патент США № 7332582; патент США № 7488802; патент США № 8008449; патент США № 8114845; патент США № 8168757; патент США № 8354509; патент США № 8686119; патент США № 8735553; патент США № 8747847; патент США № 8779105; патент США № 8927697; патент США № 8993731; патент США № 9102727; патент США № 9205148; патентная публикация США № US 2013/0202623 A1; патентная публикация США № US 2013/0291136 A1; патентная публикация США № US 2014/0044738 A1; патентная публикация США № US 2014/0356363 A1; патентная публикация США № US 2016/0075783 A1; и патентная публикация PCT № WO 2013/033091 A1; патентная публикация PCT № WO 2015/036394 A1; патентная публикация PCT № WO 2014/179664 A2; патентная публикация PCT № WO 2014/209804 A1; патентная публикация PCT № WO 2014/206107 A1; патентная публикация PCT № WO 2015/058573 A1; патентная публикация PCT № WO 2015/085847 A1; патентная публикация PCT № WO 2015/200119 A1; патентная публикация PCT № WO 2016/015685 A1 и патентная публикация PCT № WO 2016/020856 A1.

[00191] В определенных вариантах осуществления в способах, раскрытых в данном документе, применяют антитело к PD-L1. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-L1 является атезолизумаб, разработанное Genentech.

В определенных вариантах осуществления антителом к PD-L1 является дурвалумаб, разработанное AstraZeneca, Celgene и Medimmune. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-L1 является авелумаб, также известное как MSB0010718C, разработанное Merck Serono и Pfizer. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-L1 является MDX-1105, разработанное Bristol-Myers Squibb. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-L1 является AMP-224, разработанное Amplimmune и GSK.

[00192] Неограничивающие примеры антител к PD-L1, которые можно применять при лечении способами, раскрытыми в данном документе, раскрыты в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей: патент США № 7943743; патент США № 8168179; патент США № 8217149; патент США № 8552154; патент США № 8779108; патент США № 8981063; патент США № 9175082; патентная публикация США № US 2010/0203056 A1; патентная публикация США № US 2003/0232323 A1; патентная публикация США № US 2013/0323249 A1; патентная публикация США № US 2014/0341917 A1; патентная публикация США № US 2014/0044738 A1; патентная публикация США № US 2015/0203580 A1; патентная публикация США № US 2015/0225483 A1; патентная публикация США № US 2015/0346208 A1; патентная публикация США № US 2015/0355184 A1; и патентная публикация PCT № WO 2014/100079 A1; патентная публикация PCT № WO 2014/022758 A1; патентная публикация PCT № WO 2014/055897 A2; патентная публикация PCT № WO 2015/061668 A1; патентная публикация PCT № WO 2015/109124 A1; патентная публикация PCT № WO 2015/195163 A1; патентная публикация PCT № WO 2016/000619 A1; и патентная публикация PCT № WO 2016/030350 A1.

[00193] В определенных вариантах осуществления в способах, раскрытых в данном документе, применяют антитело к CTLA-4. В определенных вариантах осуществления антителом к CTLA-4 является ипилимумаб, разработанный Bristol-Myers Squibb.

[00194] В определенных вариантах осуществления антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака), раскрытое в данном

документе, вводят субъекту в комбинации с соединением, которое нецелено на иммуномодулирующий(-ие) фермент(-ы), такой(-ие) как IDO (индолеамин-(2,3)-диоксигеназа) и/или TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа). Таким образом, в одном варианте осуществления дополнительным терапевтическим средством является соединение, которое нецелено на иммуномодулирующий(-ие) фермент(-ы), такой(-ие) как ингибитор индолеамин-(2,3)-диоксигеназы (IDO). В определенных вариантах осуществления такое соединение выбрано из группы, состоящей из эпикадостата (Incyte Corp; см., например, WO 2010/005958, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), F001287 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), индоксимода (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). В одном варианте осуществления соединением является эпикадостат. В другом варианте осуществления соединением является F001287. В другом варианте осуществления соединением является индоксимод. В другом варианте осуществления соединением является NLG919. В конкретном варианте осуществления антитело к CD96 (например, человеческому CD96), раскрытое в данном документе, вводят субъекту в комбинации с ингибитором IDO для лечения рака. Описанный в данном документе ингибитор IDO для применения при лечении рака представлен в такой твердой лекарственной форме фармацевтической композиции, как таблетка, пилюля или капсула, где фармацевтическая композиция включает ингибитор IDO и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Таким образом, описанное в данном документе антитело и описываемый в данном документе ингибитор IDO можно вводить отдельно, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. В одном варианте осуществления антитело вводят парентерально, а ингибитор IDO вводят перорально. В конкретных вариантах осуществления ингибитор выбран из группы, состоящей из эпикадостата (Incyte Corporation), F001287 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), индоксимода (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). Эпикадостат был описан в публикации согласно PCT № WO 2010/005958, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. В одном варианте осуществления ингибитором является эпикадостат. В другом варианте осуществления ингибитором является F001287. В другом варианте осуществления ингибитором

является индоксимод. В другом варианте осуществления ингибитором является NLG919.

[00195] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) вводят субъекту в комбинации с вакциной. Вакцина может представлять собой, например, пептидную вакцину, ДНК-вакцину или РНК-вакцину. В определенных вариантах осуществления вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока или противопатогенную вакцину на основе белка теплового шока. В конкретном варианте осуществления раскрытое в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) вводят субъекту в комбинации с противоопухолевой вакциной на основе белка теплового шока. Белки теплового шока (HSP) представляют собой семейство высококонсервативных белков, встречающихся повсеместно у всех видов. Их экспрессия может сильно индуцироваться до гораздо более высоких уровней в результате теплового шока или других форм стресса, в том числе воздействия токсинов, окислительного стресса или депривации глюкозы. Были классифицированы пять семейств в соответствии с их молекулярной массой: HSP-110, -90, -70, -60 и -28. HSP доставляют иммуногенные пептиды через путь перекрестной презентации в антигенпрезентирующих клетках (APC), таких как макрофаги и дендритные клетки (DC), что приводит к активации Т-клеток. HSP выполняет роль шаперонов-переносчиков опухоль-ассоциированных антигенных пептидов, образуя комплексы, способные индуцировать опухолеспецифический иммунитет. После высвобождения из погибающих опухолевых клеток комплексы HSP-антиген поглощаются антигенпрезентирующими клетками (APC), где антигены процессируются в пептиды, которые связывают молекулы MHC I класса и II класса, что приводит к активации противоопухолевых CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток. Иммунитет, опосредуемый комплексами HSP, полученными из опухолевых препаратов, специфически направлен на уникальный репертуар антигенных пептидов, экспрессируемых раковым образованием каждого субъекта. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к (а) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) вакцине для применения в качестве лекарственного препарата, например, для применения в

способе лечения рака. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплекту компонентов, содержащему (а) антитело и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) вакцину. В одном варианте осуществления вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока. В одном варианте осуществления вакцина представляет собой противопатогенную вакцину на основе белка теплового шока. В определенных вариантах осуществления вакцина является такой, как описано в WO 2016/183486, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00196] Комплекс пептида и белка теплового шока (HSPPC) представляет собой комплекс пептида и белка, состоящий из белка теплового шока, нековалентно связанного в комплекс с антигенными пептидами. HSPPC вызывают как врожденные, так и адаптивные иммунные ответы. В конкретном варианте осуществления антигенный(-ые) пептид(-ы) проявляет(-ют) антигенность в отношении подвергаемого лечению рака. HSPPC эффективно захватываются посредством APC через мембранные рецепторы (в основном CD91) или путем связывания с Toll-подобными рецепторами. Интернализация HSPPC приводит к функциональному созреванию APC с продуцированием хемокинов и цитокинов, что приводит к активации натуральных киллеров (NK-клеток), моноцитов и Th1- и Th2-опосредованных иммунных ответов. В определенных вариантах осуществления HSPPC, применяемые в раскрытых в данном документе способах, содержат один или более белков теплового шока из семейства белков стресса hsp60, hsp70 или hsp90 в комплексе с антигенными пептидами. В определенных вариантах осуществления HSPPC содержат hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, grp96, кальретикулин или комбинации из двух или более из них.

[00197] В конкретном варианте осуществления комплекс пептида и белка теплового шока (HSPPC) содержит рекомбинантные белки теплового шока (например, hsp70 или hsc70) или их пептид-связывающий домен в комплексе с рекомбинантными антигенными пептидами. Рекомбинантные белки теплового шока можно получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК, например, с помощью последовательности hsc70 человека, которая описана в Dworniczak and Miraault, Nucleic Acids Res. 15:5181-5197 (1987) и имеет регистрационный № GenBank P11142

и/или Y00371, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления последовательности Hsp70 являются такими, как описано в Hunt and Morimoto Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 (19), 6455-6459 (1985), и имеют регистрационный № GenBank P0DMV8 и/или M11717, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Антигенные пептиды также можно получить способами рекомбинантной ДНК, известными в данной области техники.

[00198] В определенных вариантах осуществления антигенные пептиды содержат модифицированную аминокислоту. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота содержит посттрансляционную модификацию. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота содержит миметик посттрансляционной модификации. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота представляет собой Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которая фосфорилирована по гидроксилу или амину боковой цепи. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота представляет собой миметик аминокислоты Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, который фосфорилирован по гидроксилу или амину боковой цепи.

[00199] В конкретном варианте осуществления раскрытое в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) вводят субъекту в комбинации с комплексом пептида и белка теплового шока (HSPPC), например комплексом пептида и белка теплового шока-96 (HSPPC-96), для лечения рака. HSPPC-96 содержит 96-кДа белок теплового шока (Hsp) gp96 в комплексе с антигенными пептидами. HSPPC-96 представляет собой средство противораковой иммунотерапии, изготовленное из опухоли субъекта и содержащее раковый антигенный «отпечаток». В определенных вариантах осуществления такой отпечаток содержит уникальные антигены, которые присутствуют только в специфических раковых клетках данного конкретного субъекта, и инъекция вакцины предназначена для стимуляции иммунной системы субъекта к распознаванию и атаке любых клеток со специфическим раковым отпечатком. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в комбинации с

комплексом пептида и белка теплового шока (HSPPC) для применения в качестве лекарственного препарата и/или для применения в способе лечения рака.

[00200] В определенных вариантах осуществления HSPPC, например HSPPC-96, получают из опухолевой ткани субъекта. В конкретном варианте осуществления, HSPPC (например, HSPPC-96) получают из опухоли определенного типа рака или его метастазов, подвергаемых лечению. В другом конкретном варианте осуществления, HSPPC (например, HSPPC-96) является аутологичным для субъекта, проходящего лечение. В определенных вариантах осуществления опухолевая ткань представляет собой не некротическую опухолевую ткань. В определенных вариантах осуществления для осуществления схемы вакцинации применяют по меньшей мере 1 грамм (*например*, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 грамм) не некротической опухолевой ткани. В определенных вариантах осуществления после хирургической резекции не некротическую опухолевую ткань замораживают перед применением при получении вакцины. В определенных вариантах осуществления HSPPC, например HSPPC-96, выделяют из опухолевой ткани методиками очистки, фильтруют и готовят для инъекционной вакцины. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят 6-12 доз HSPPC, например HSPPC-96. В таких вариантах осуществления дозы HSPPC, например HSPPC-96, можно вводить еженедельно для первых 4 доз, а затем раз в две недели для 2-8 дополнительных доз.

[00201] Дополнительные примеры HSPPC, которые можно применять в соответствии с описанными в данном документе способами, раскрыты в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей: патентах США №№ 6,391,306, 6,383,492, 6,403,095, 6,410,026, 6,436,404, 6,447,780, 6,447,781 и 6,610,659.

[00202] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) вводят субъекту в комбинации с адъювантом. В зависимости от контекста лечения можно применять различные адъюванты. Неограничивающие примеры

подходящих адъювантов включают без ограничения полный адъювант Фрейнда (CFA), неполный адъювант Фрейнда (IFA), монтанид ISA (неполный адъювант Seppic), систему адъювантов Ribi (RAS), Titer Max, мурамиловые пептиды, состав адъюванта Syntex (SAF), квасцы (гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия), адъюванты на основе солей алюминия, адъюванты Gerbu[®], абсорбированный на нитроцеллюлозе антиген, инкапсулированный или захваченный антиген, 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3 D-MPL), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, лиганды toll-подобного рецептора (TLR), лиганды маннан-связывающего лектина (MBL), агонисты STING, иммуностимулирующие комплексы, такие как сапонины, Quil A, QS-21, QS-7, ISCOMATRIX и другие. Другие адъюванты включают олигонуклеотиды CpG и молекулы двухнитевой РНК, такие как поли(А) и поли(У). Также можно применять комбинации вышеуказанных адъювантов. См., например, патенты США № 6645495, 7029678 и 7858589, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В одном варианте осуществления применяемый в данном документе адъювант представляет собой QS-21 STIMULON.

[00203] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) вводят субъекту в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, содержащим TCR. В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является растворимый TCR. В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является клетка, экспрессирующая TCR. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, содержащим TCR, для применения в качестве лекарственного препарата и/или для применения в способе лечения рака.

[00204] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) вводят субъекту в комбинации с клетками, экспрессирующими химерный антигенный рецептор (CAR). В определенных вариантах осуществления клетка является Т-клеткой.

[00205] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) вводят субъекту в комбинации с имитирующим TCR антителом. В определенных вариантах осуществления имитирующее TCR антитело является антителом, которое специфически связывается с комплексом пептид-MHC. Неограничивающие примеры имитирующих TCR антител, см., например, в патенте США № 9074000 и публикациях США №№ US 2009/0304679 A1 и US 2014/0134191 A1, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00206] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) вводят субъекту в комбинации с биспецифическим активатором Т-клеток (BiTE) (например, который описан в WO2005061547A2, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и/или антителом с двойной аффинностью для повторного нацеливания (DART) (например, которое описано в WO2012162067A2, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных вариантах осуществления BiTE и/или DART специфически связываются с опухоли-ассоциированным антигеном (например, полипептидом, сверхэкспрессируемым в опухоли, полипептидом, полученным из онковируса, полипептидом, содержащим посттрансляционную модификацию, специфичную для опухоли, полипептидом, специфически мутировавшим в опухоли) и молекулой на эффекторной клетке (например, CD3 или CD16). В определенных вариантах осуществления опухоли-ассоциированный антиген, представляет собой EGFR (например, человеческий EGFR), необязательно где BiTE и/или DART содержат последовательности VH и VL цетуксимаба. В определенных вариантах осуществления опухоли-ассоциированный антиген, представляет собой Her2 (например, человеческий Her2), необязательно где BiTE и/или DART содержат последовательности VH и VL трастузумаба. В определенных вариантах осуществления опухоли-ассоциированный антиген представляет собой CD20 (например, человеческий CD20).

[00207] Антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) и дополнительное терапевтическое средство (например,

химиотерапевтическое, радиотерапевтическое, средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа, ингибитор IDO, вакцина, адъювант, растворимый TCR, клетка, экспрессирующая TCR, клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, и/или имитирующее TCR антитело) можно вводить отдельно, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. В одном варианте осуществления антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) вводят парентерально, а ингибитор IDO вводят перорально.

[00208] Антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, можно доставлять субъекту различными путями. К ним относятся без ограничения парентеральный, интраназальный, интратрахеальный, пероральный, внутрикожный, местный, внутримышечный, внутрибрюшинный, трансдермальный, внутривенный, внутриопухолевый, конъюнктивальный, внутриартериальный и подкожный пути введения. Также можно использовать легочное введение, например с помощью ингалятора или небулайзера, и состав с аэрозольным средством для применения в виде спрея. В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, доставляют подкожно или внутривенно. В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, доставляют внутриартериально. В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, доставляют внутриопухолевым путем. В определенных вариантах осуществления антитело или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, доставляют в лимфатический узел, дренирующий опухоль,.

[00209] Количество антитела или композиции, которое будет эффективным при лечении и/или предупреждении патологического состояния, будет зависеть от природы заболевания и может быть определено стандартными клиническими методиками.

[00210] Точная доза, которую следует использовать в композиции, также будет зависеть от пути введения и серьезности вызванной им инфекции или заболевания и должна определяться в соответствии с мнением практикующего врача

и обстоятельствами для каждого субъекта. Например, эффективные дозы могут также варьировать в зависимости от способа введения, целевого участка, физиологического состояния пациента (включая возраст, вес тела и состояние здоровья), того, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарственных препаратов или является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но также можно лечить отличных от человека млекопитающих, в том числе трансгенных млекопитающих. Для оптимизации безопасности и эффективности оптимально подбирают лечебные дозы.

[00211] Антитело к описанному в данном документе CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) можно также применять для анализа уровней белка CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) в биологическом образце с помощью классических иммуногистологических способов, известных специалистам в данной области техники, включая иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализа антител известны в данной области техники и включают ферментативные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие метки можно применять для мечения описанного в данном документе антитела. Альтернативно, можно пометить второе антитело, которое распознает описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака), и применять его в комбинации с антителом к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) для выявления уровней белка CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака). Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению антитела по настоящему изобретению для выявления *in vitro* белка CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) в биологическом образце. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению антитела к CD96 по настоящему изобретению для оценки и/или детекции уровней белка CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) в биологическом образце *in vitro*, при этом антитело к CD96 необязательно

конъюгировано с радионуклидом или детектируемой меткой и/или несет метку, описанную в данном документе, и/или при этом применяют иммуногистологический способ.

[00212] Подразумевается, что анализ уровня экспрессии белка CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) включает качественное или количественное измерение или оценку уровня белка CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) в первом биологическом образце либо непосредственно (например, путем определения или оценки абсолютного уровня белка), либо относительно (например, путем сравнения с уровнем белка, ассоциированного с заболеванием, во втором биологическом образце). Можно измерить или оценить уровень экспрессии полипептида CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) в первом биологическом образце и сравнить со стандартным уровнем белка CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака), при этом стандарт берут, например, из второго биологического образца, полученного от индивидуума, не страдающего данным нарушением, или определяют путем усреднения уровней из популяции индивидуумов, не страдающих данным расстройством. Специалистам в данной области техники будет понятно, что после того, как станет известен уровень «стандартного» полипептида CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака), его можно многократно применять в качестве стандарта для сравнения. Таким образом, в дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу анализа и/или выявления уровней белка CD96 *in vitro*, например уровней белка человеческого CD96, в биологическом образце, предусматривающему качественное или количественное измерение или оценку уровня белка CD96, например белка человеческого CD96, в биологическом образце иммуногистологическим способом.

[00213] Применяемый в данном документе термин «биологический образец» относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта, клеточной линии, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующему CD96 (например, человеческий CD96 или CD96 яванского макака). Способы получения биоптатов тканей и биологических жидкостей животных (например, людей или яванских макаков) хорошо известны в данной области техники.

Биологические образцы включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC).

[00214] Описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) можно применять для прогностических, диагностических, мониторинговых и скрининговых применений, включая применения *in vitro* и *in vivo*, хорошо известные и стандартные для специалистов в данной области техники и основанные на настоящем описании. Прогностический, диагностический, мониторинговый и скрининговый анализы и наборы для оценки *in vitro* и оценки состояния иммунной системы и/или иммунного ответа можно использовать для прогнозирования, диагностики и мониторинга для оценки образцов пациентов, включая тех, у которых известно или подозревается наличие дисфункции иммунной системы, или в отношении ожидаемого или требуемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину. Оценка и анализ статуса иммунной системы и/или иммунного ответа также применимы при определении пригодности пациента для клинического испытания лекарственного средства или для введения конкретного химиотерапевтического средства, радиотерапевтического средства или антитела, в том числе их комбинации, по сравнению с другим средством или антителом. Такой тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки уже используют на практике с использованием антител к белку HER2 при раке молочной железы (HercepTest™, Dako), при этом данный анализ также применяют для оценки пациентов в отношении терапии антителами с применением препарата Herceptin®. Применения *in vivo* включают направленную клеточную терапию и модуляцию иммунной системы, а также радиовизуализацию иммунных ответов. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу к CD96 и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве диагностического средства. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу к CD96 и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе прогнозирования, диагностики и/или мониторинга субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии дисфункции иммунной системы и/или в отношении ожидаемого или требуемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину. В другом варианте осуществления

настоящее изобретение относится к применению антитела к CD96 по настоящему изобретению для прогнозирования, диагностики и/или мониторинга за субъектом, имеющим или подозреваемым в наличии дисфункции иммунной системы, и/или в отношении ожидаемого или требуемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину путем анализа и/или выявления уровней человеческого белка CD96 в биологическом образце субъекта *in vitro*.

[00215] В одном варианте осуществления антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) можно применять при иммуногистохимическом анализе образцов биопсии. В одном варианте осуществления способ является способом *in vitro*. В другом варианте осуществления антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) можно применять для выявления уровней CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) или уровней клеток, содержащих CD96 (например, человеческий CD96 или CD96 яванского макака) на поверхности своих мембран, уровни которых затем можно связать с определенными симптомами заболевания. Описанные в данном документе антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) могут нести выявляемую или функциональную метку и/или могут быть конъюгированы с радионуклидной или выявляемой меткой. При применении флуоресцентных меток для выявления и количественного определения членов специфического связывания можно применять доступную в настоящее время микроскопию и анализ с помощью сортера флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или комбинацию обоих способов, т. е. процедур, которые известны в данной области техники. Описанные в данном документе антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) могут нести флуоресцентную метку или могут быть конъюгированы с ней. Примеры флуоресцентных меток включают, например, реактивные и конъюгированные зонды, например, аминокумарин, флуоресцеин и техасский красный, красители Alexa Fluor, красители Cy и красители DyLight. Антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) может нести или может быть конъюгировано с радиоактивной меткой или радионуклидом, таким как изотопы ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{186}Re . При применении радиоактивных меток для идентификации и количественного

определения специфического связывания антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) можно использовать доступные в настоящее время процедуры подсчета, известные в данной области техники. В случае, когда метка представляет собой фермент, выявление можно выполнить любой из используемых в настоящее время колориметрических, спектрофотометрических, флуороспектрофотометрических, амперометрических или газометрических методик, известных в данной области техники. Это может осуществиться путем приведения в контакт образца или контрольного образца с антителом к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) в условиях, которые обеспечивают образование комплекса между антителом и CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака). Выявляют любые комплексы, образованные между антителом и CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), и сравнивают их в образце и контроле. В свете специфического связывания описанных в данном документе антител с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), такие антитела можно применять для специфического выявления экспрессии CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) на поверхности клеток. Описанные в данном документе антитела также можно применять для очистки CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) посредством иммуноаффинной очистки. Сюда также относятся аналитическая система, которая может быть получена в форме набора для тестирования, набора или комплекта компонентов для количественного анализа степени присутствия, например, CD96 (например, человеческого CD96 или яванского макака) или комплексов CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака)/лиганда CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака). Система, набор для тестирования, набор или комплект компонентов могут содержать меченый компонент, например меченое антитело, и один или более дополнительных иммунохимических реагентов.

5.5 Полинуклеотиды, векторы и способы получения антител к CD96

[00216] Согласно другому аспекту, в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе антитело или его часть или его фрагмент (например,

VL и/или VH; и легкую цепь и/или тяжелую цепь), которое специфически связывается с антигеном CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), и векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, *E. coli* и клетках млекопитающих). В данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь любого из представленных в данном документе антител, а также векторы, содержащие такие полинуклеотидные последовательности, например, векторы экспрессии для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например, клетках млекопитающих.

[00217] Применяемый в данном документе термин «выделенный» полинуклеотид или "выделенная" молекула нуклеиновой кислоты обозначает молекулу, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, присутствующих в природном источнике (например, у мыши или человека) молекулы нуклеиновой кислоты. Более того, «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может практически не содержать другой клеточный материал или культуральную среду при получении рекомбинантными методиками или практически не содержать химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Например, формулировка «практически не содержит» включает препараты полинуклеотида или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие менее приблизительно 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (в частности, менее приблизительно 10%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновых кислот, химических предшественников и/или других химических веществ. В конкретном варианте осуществления молекула(-ы) нуклеиновой кислоты, кодирующая(-ие) описанное в данном документе антитело, является(-ются) выделенной(-ыми) или очищенной(-ыми).

[00218] Согласно конкретным аспектам, в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, которые специфически связываются с полипептидом CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и содержат описываемую в данном документе аминокислотную последовательность, а также антитела, которые конкурируют с такими антителами за связывание с полипептидом

CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) (например, дозозависимым образом) или которые связываются с тем же эпитопом, что и такие антитела.

[00219] Согласно определенным аспектам, в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь описанного в данном документе антитела. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, содержащую FR и CDR VL описанных в данном документе антител (см., например, таблицу 1), или нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, содержащую FR VH и CDR описанных в данном документе антител (см., например, таблицу 1).

[00220] Также в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака), которые оптимизированы, например, путем оптимизации кодонов/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и устранения элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, домен VH или домен VL), для рекомбинантной экспрессии путем внесения изменений в кодоны и/или устранения ингибирующих областей в мРНК, можно осуществить путем адаптации способов оптимизации, описанных, *например*, в патентах США №№ 5965726; 6174666; 6291664; 6414132; и 6794498 соответственно, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Например, потенциальные сайты сплайсинга и элементы нестабильности (например, элементы, богатые A/T или A/U) в РНК можно подвергнуть мутации без изменения аминокислот, кодируемых последовательностями нуклеиновых кислот, для повышения стабильности РНК в ходе рекомбинантной экспрессии. При изменениях используют вырожденность генетического кода, например, с использованием альтернативного кодона для идентичной аминокислоты. В определенных вариантах осуществления может быть необходимым изменить один или более кодонов для кодирования консервативной мутации, например, аналогичной аминокислоты с аналогичной химической структурой и свойствами и/или функцией

исходной аминокислоты. Такие способы могут обеспечивать повышение экспрессии антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или его фрагмента в по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или более относительно экспрессии антитела к CD96 (*например*, человеческому CD96 или CD96 яванского макака), кодируемого с помощью полинуклеотидов, которые не были оптимизированы.

[00221] В определенных вариантах осуществления оптимизированная полинуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH), можно гибридизовать с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом с неоптимизированной полинуклеотидной последовательностью, кодирующей описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH). В конкретных вариантах осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или его фрагмент, гибридизируется в условиях высокой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или яванского макака CD96) или его фрагмент. В конкретном варианте осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или его фрагмент, гибридизируется в условиях высокой жесткости, промежуточной или более низкой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом с неоптимизированной нуклеотидной последовательностью, кодирующей описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или его фрагмент. Информация относительно условий гибридизации была описана, см., например, публикацию заявки на патент США № US 2005/0048549 (например, абзацы 72-73), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00222] Полинуклеотиды можно получить и определить нуклеотидную последовательность полинуклеотидов любым способом, известным в данной области техники. Нуклеотидные последовательности, кодирующие описанные в данном документе антитела, например, антитела, описанные в таблице 1, и модифицированные варианты таких антител, можно определить с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, т. е. нуклеотидные кодоны, о которых известно, что они кодируют определенные аминокислоты, собирают таким образом, чтобы получить нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, можно собрать из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано у Kutmeier G *et al.*, (1994), *BioTechniques* 17: 242-6, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), что, вкратце, предусматривает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование таких олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

[00223] Альтернативно, полинуклеотид, кодирующий описанное в данном документе антитело, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с помощью способов, хорошо известных в данной области техники (например, ПЦР и других способов молекулярного клонирования). Например, ПЦР-амплификацию с применением синтетических праймеров, способных гибридизоваться с 3'- и 5'-концами известной последовательности, можно осуществить с применением геномной ДНК, полученной из гибридомных клеток, продуцирующих представляющее интерес антитело. Такие способы ПЦР-амплификации можно применять для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие способы ПЦР-амплификации можно применять для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для получения химерных и гуманизированных антител.

[00224] Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, не доступен, но известна последовательность молекулы антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин, можно синтезировать химическими методами или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител или библиотеки кДНК, полученной из или нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли-A+ РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело, таких как гибридомные клетки, выбранные для экспрессии описанного в данном документе антитела, путем ПЦР-амплификации с помощью синтетических праймеров, способных гибридизоваться с 3'- и 5'-концами последовательности, или путем клонирования с применением олигонуклеотидного зонда, специфичного к конкретной последовательности гена, для выявления, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, который кодирует антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные с помощью ПЦР, затем можно клонировать в реплицируемые клонирующие векторы с помощью любого способа, хорошо известного в данной области техники.

[00225] ДНК, кодирующая описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака), можно легко выделить и секвенировать с помощью обычных процедур (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака). Источником такой ДНК могут служить гибридомные клетки. После выделения ДНК можно поместить в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомяка (CHO) (например, клетки CHO из системы CHO GS System™ (Lonza)) или клетки миеломы, которые в ином случае не продуцируют белок иммуноглобулина, для обеспечения синтеза антител к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) в рекомбинантных клетках-хозяевах.

[00226] Для получения полных антител для амплификации последовательностей VH или VL в клонах scFv можно применять ПЦР-праймеры, включающие нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции. Используя

методики клонирования, известные специалистам в данной области техники, домены VH, амплифицированные с помощью ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область тяжелой цепи, например, человеческую константную область гамма-1 или гамма-4, а домены VL, амплифицированные с помощью ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область легкой цепи, например, человеческие константные области каппа- или лямбда-цепи. В определенных вариантах осуществления векторы для экспрессии доменов VH или VL содержат промотор EF-1 α , сигнал секреции, участок клонирования вариабельной области, константные домены и маркер для отбора, такой как неомициновый. Домены VH и VL также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем с помощью методов, известных специалистам в данной области техники, векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи совместно трансфицируют в клеточные линии с получением стабильных или временных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например IgG.

[00227] ДНК также можно модифицировать, например, путем замены последовательности, кодирующей человеческие константные домены тяжелой и легкой цепей, на мышиные последовательности или путем ковалентного присоединения к последовательности, кодирующей иммуноглобулин, ко всей или части последовательности, кодирующей отличный от иммуноглобулина полипептид.

[00228] Также предусмотрены полинуклеотиды, которые гибридизируются в условиях гибридизации высокой жесткости, промежуточной или более низкой жесткости с полинуклеотидами, кодирующими описанное в данном документе антитело. В конкретных вариантах осуществления описанные в данном документе полинуклеотиды гибридизируются в условиях гибридизации высокой жесткости, промежуточной или более низкой жесткости с полинуклеотидами, кодирующими домен VH и/или домен VL, представленные в данном документе.

[00229] Условия гибридизации описаны в данной области техники и известны специалистам в данной области техники. Например, гибридизация в жестких условиях может включать гибридизацию со связанной на фильтре ДНК в 6-кратном растворе хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) при температуре

приблизительно 45°C с последующей одной или более промывками в 0,2xSSC/0,1% SDS при температуре приблизительно 50-65°C; гибридизация в очень жестких условиях может включать гибридизацию со связанной на фильтре нуклеиновой кислотой в 6xSSC при температуре приблизительно 45°C с последующей одной или более промывками в 0,1xSSC/0,2% SDS при температуре приблизительно 68°C. Гибридизация в других жестких условиях гибридизации известна специалистам в данной области техники и была описана, см., например, Ausubel FM *et al.*, eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York, на страницах 6.3.1-6.3.6 и 2.10.3, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00230] Согласно определенным аспектам, в данном документе предусмотрены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантно) описанные в данном документе антитела, которые специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) и родственными полинуклеотидами и векторами экспрессии. В данном документе предусмотрены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или их фрагмент, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих (например, клетках CHO). В данном документе также предусмотрены клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии описанного в данном документе антитела (например, человеческого или гуманизированного антитела) к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака). Согласно конкретному аспекту, в данном документе предусмотрены способы получения описанного в данном документе антитела, предусматривающие экспрессию такого антитела из клетки-хозяина.

[00231] Рекомбинантная экспрессия описанного в данном документе антитела (например, полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела или одноцепочечного описанного в данном документе антитела), которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), обычно предусматривает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело. После получения

полинуклеотида, кодирующего молекулу описанного в данном документе антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела или их фрагмент (например, переменные области тяжелой и/или легкой цепи), вектор для продуцирования молекулы антитела можно получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК с применением методик, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, в данном документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь). Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, можно применять для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Такие способы включают, например, методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетической рекомбинации *in vivo*. Также предусмотрены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу описываемую в данном документе антитела, тяжелую или легкую цепь антитела, переменную область тяжелой или легкой цепи антитела или их фрагмент или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанную с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, международные публикации №№ WO 86/05807 и WO 89/01036 и патент США № 5122464, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и переменные области антитела, которые можно клонировать в такой вектор для экспрессии всей тяжелой, всей легкой цепи или как всей тяжелой, так и легкой цепей.

[00232] Вектор экспрессии можно перенести в клетку (например, клетку-хозяина) с помощью традиционных методик, а полученные клетки затем можно культивировать с помощью традиционных методик с получением описанного в данном документе антитела или его фрагмента. Таким образом, в данном документе предусмотрены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий описанное в данном документе антитело, или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь, или ее фрагмент, или описанное в данном документе одноцепочечное антитело, функционально связанное с промотором для экспрессии таких последовательностей в

клетке-хозяине. В определенных вариантах осуществления для экспрессии двухнитевых антител векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи по отдельности, можно совместно экспрессировать в клетке-хозяине для экспрессии всей молекулы иммуноглобулина, как подробно описано ниже. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий как тяжелую цепь, так и легкую цепь описанного в данном документе антитела, или его фрагмент. В конкретных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит два разных вектора: первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи описанного в данном документе антитела, или его фрагмент, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельную область легкой цепи описанного в данном документе антитела, или его фрагмент. В других вариантах осуществления первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи описанного в данном документе антитела, или его фрагмент, а вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или вариабельную область легкой цепи описанного в данном документе антитела. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь/вариабельная область тяжелой цепи, экспрессируемая первой клеткой, связана с легкой цепью/вариабельной областью легкой цепи второй клетки с образованием описанного в данном документе антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака). В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрена популяция клеток-хозяев, включающая такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

[00233] В конкретном варианте осуществления в данном документе предусмотрена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/вариабельную область легкой цепи описанного в данном документе антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака), и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи описанного в данном документе антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака).

[00234] Для экспрессии молекул описанных в данном документе антител можно использовать различные системы векторов экспрессии и хозяев (см., например, патент США № 5807715, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Такие системы векторов экспрессии и хозяев представляют собой среды-носители, с помощью которых могут быть получены и впоследствии очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые могут при трансформации или трансфекции соответствующими кодирующими нуклеотидными последовательностями экспрессировать описанную в данном документе молекулу антитела *in situ*. Они включают без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные, например, векторами экспрессии на основе рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие антитела; дрожжи (например, *Saccharomyces* и *Pichia*), трансформированные, например, рекомбинантными векторами экспрессии у дрожжей, содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы клеток насекомых, инфицированные, например, рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими последовательности, кодирующие антитела; системы растительных клеток (например, зеленые водоросли, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные, например, рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированные, например, рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Ti-плазмидой), содержащими антитела, кодирующие последовательности; или системы клеток млекопитающих (например, COS (например, COS1 или COS), клетки CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, BW, LM, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), содержащие, например, рекомбинантные конструкции экспрессии, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металlothioneина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор 7,5K вируса коровьей оспы). В конкретном варианте осуществления клетки для экспрессии описанных в данном документе антител

представляют собой клетки яичника китайского хомяка (CHO), например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza). В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь и/или легкая цепь антитела, продуцируемого клеткой CHO, может иметь N-концевой остаток глутамина или глутамата, замененный пироглутаматом. В конкретном варианте осуществления клетки для экспрессии описанных в данном документе антител представляют собой человеческие клетки, например, человеческие клеточные линии. В конкретном варианте осуществления вектор экспрессии у млекопитающего представляет собой pOptiVEC™ или pcDNA3.3.. В конкретном варианте осуществления для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела применяют бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), особенно для экспрессии полной молекулы рекомбинантного антитела. Например, эффективной системой экспрессии антител являются клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, в сочетании с вектором, таким как промоторный элемент основного промежуточного раннего гена человеческого цитомегаловируса (Foecking MK & Hofstetter H (1986) Gene 45: 101-5; и Cockett MI *et al.*, (1990) Biotechnology 8(7): 662-7, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела продуцируются клетками CHO или клетками NS0. В конкретном варианте осуществления экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих описанные в данном документе антитела, которые специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), регулируется конститутивным промотором, индуцируемым промотором или тканеспецифическим промотором.

[00235] В бактериальных системах можно предпочтительно выбрать ряд векторов экспрессии в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемой молекулы антитела. Например, при необходимости получения большого количества такого антитела для получения фармацевтических композиций молекулы антитела могут быть необходимы векторы, которые управляют экспрессией высоких уровней продуктов слитых белков, которые легко очищаются. Такие векторы включают без ограничения вектор экспрессии у *E. coli* pUR278 (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) EMBO J 2: 1791-1794), в котором последовательность, кодирующая антитело, может быть лигирована индивидуально в вектор в рамке считывания с кодирующей

областью lac Z, так чтобы образовывался слитый белок; векторы pIN (Inouye S & Inouye M (1985) Nuc Acids Res 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) J Biol Chem 24: 5503-5509); и т. п., все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей полноте. Например, векторы pGEX также можно применять для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-5-трансферазой (GST). Как правило, такие слитые белки растворимы и могут быть легко очищены от лизированных клеток путем адсорбции и связывания с с гранулами матрикса глутатион-агарозы с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX сконструированы так, чтобы они включали сайты расщепления протеазой по типу тромбина или фактора Ха с тем, чтобы из фрагмента GST мог быть высвобожден клонированный продукт целевого гена.

[00236] В системе для насекомых в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов может быть использован, например, вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV). Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Последовательность, кодирующую антитело, можно клонировать по отдельности в несущественные области (например, ген полиэдрина) вируса и поместить под контроль промотора AcNPV (например, промотора гена полиэдрина).

[00237] В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд систем экспрессии на основе вирусов. В случаях, когда в качестве вектора экспрессии применяют аденовирус, представляющая интерес последовательность, кодирующая антитело, может быть лигирована с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например, с поздним промотором и трехкомпонентной лидерной последовательностью. Затем такой химерный ген может быть встроен в геном аденовируса посредством рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способен экспрессировать молекулу антитела в инфицированных хозяевах (например, см., Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81(12): 3655-9, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Для эффективной трансляции встроенных последовательностей, кодирующих антитела, также могут быть необходимы специфические иницирующие сигналы. Такие сигналы включают кодон

инициации ATG и смежные последовательности. Более того, кодон инициации должен быть синхронизирован с рамкой считывания требуемой кодирующей последовательности для обеспечения трансляции всей вставки. Такие экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут иметь различное происхождение, как естественное, так и синтетическое. Эффективность экспрессии можно повысить путем включения соответствующих энхансерных элементов транскрипции, терминаторов транскрипции и т. д (см., *например*, Bitter G *et al.*, (1987) *Methods Enzymol.* 153: 516-544, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00238] Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или модифицирует и процессирует генный продукт требуемым специфическим образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важны для функции белка. Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого чужеродного белка можно выбрать подходящие клеточные линии или системы-хозяева. С этой целью можно применять эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают без ограничения CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O и T47D, NS0 (линия мышинных клеток миеломы, которая эндогенно не продуцирует какие-либо цепи иммуноглобулина), CRL703O, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и клетки HsS78Bst. В определенных вариантах осуществления антитела к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака), описанные в данном документе, получают в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

[00239] В конкретном варианте осуществления описанные в данном документе антитела имеют пониженное содержание фукозы или вовсе не содержат фукозу. Такие антитела можно получить с помощью методик, известных

специалистам в данной области техники. Например, антитела можно экспрессировать в клетках, дефицитных по способности к фукозилрованию или вовсе лишенных такой способности. В конкретном примере для получения антител с пониженным содержанием фукозы можно применять линии клеток с нокаутом по обоим аллелям $\alpha 1,6$ -фукозилтрансферазы. Примером такой системы, которую можно применять для получения антител с пониженным содержанием фукозы, является система Potelligent® (Lonza).

[00240] Для долгосрочного высокопродуктивного продуцирования рекомбинантных белков можно создать клетки со стабильной экспрессией. Например, можно сконструировать клеточные линии, которые стабильно экспрессируют описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака). В конкретных вариантах осуществления представленная в данном документе клетка стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельную область легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи, которые связываются с образованием описанного в данном документе антитела.

[00241] Согласно определенным аспектам, вместо применения векторов экспрессии, которые содержат вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева можно трансформировать посредством ДНК, находящейся под контролем соответствующих элементов контроля экспрессии (например, промотора, энхансера, последовательностей, терминаторов транскрипции, сайтов полиаденилирования и т. д.) и содержащей селективируемый маркер. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированные клетки можно оставить расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем перенести их в селективную среду. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и расти с образованием очагов, которые, в свою очередь, можно клонировать и размножить в клеточные линии. Такой способ можно с успехом применять для создания линий клеток, которые экспрессируют описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака) или его фрагмент. Такие сконструированные линии клеток могут быть особенно применимы для скрининга и оценки композиций, которые прямо или косвенно взаимодействуют с молекулой антитела.

[00242] Можно применять множество систем селекции, включая без ограничения гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M *et al.*, (1977) Cell 11(1): 223-32), гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy I *et al.*, (1980) Cell 22(3): 817-23) в tk-, hgp^{rt}- или ap^{rt}-клетках соответственно, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Также можно применять устойчивость к антиметаболитам в качестве основы для селекции по следующим генам: *dhfr*, придающему устойчивость к метотрексату (Wigler M *et al.*, (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K *et al.*, (1981) PNAS 78: 1527-31); *gpt*, придающему устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, придающему устойчивость к аминогликозидам, G-418 (Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932; and Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-5); и *hygro*, придающему устойчивость к гигромицину (Santerre RF *et al.*, (1984) Gene 30(1-3): 147-56), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Для отбора требуемого рекомбинантного клона обычно можно применять методы, широко известные в области технологии рекомбинантных ДНК, и такие способы описаны, например, в Ausubel FM *et al.*, (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); и в главах 12 и 13, Dracopoli NC *et al.*, (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F *et al.*, (1981) J Mol Biol 150: 1-14, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00243] Уровни экспрессии молекулы антитела можно увеличить путем векторной амплификации (обзор см. в Bebbington CR & Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Когда маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, является амплифицируемым, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет увеличивать

количество копий маркерного гена. Поскольку амплифицированная область связана с геном антитела, также будет увеличиваться продуцирование антитела (Crouse GF *et al.*, (1983) Mol Cell Biol 3: 257-66, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00244] Клетку-хозяина можно совместно трансфицировать двумя или более векторами экспрессии, описанными в данном документе, при этом первый вектор кодирует полипептид, полученный из тяжелой цепи, а второй вектор, кодирует полипептид, полученный из легкой цепи. Два вектора могут содержать идентичные селектируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепей. Клетки-хозяева можно совместно трансфицировать различными количествами двух или более векторов экспрессии. Например, клетки-хозяева можно трансфицировать любым из следующих соотношений первого вектора экспрессии и второго вектора экспрессии: приблизительно 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

[00245] В качестве альтернативы можно применять один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи. В таких ситуациях легкая цепь должна быть помещена перед тяжелой цепью во избежание избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot NJ (1986) Nature 322: 562-565; и Köhler G (1980) PNAS 77: 2197-2199, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Кодировующие последовательности для тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК. Вектор экспрессии может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более генов/нуклеотидных последовательностей или в диапазоне 2-5, 5-10 или 10-20 генов/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может содержать в следующем порядке: промотор, первый ген (например, тяжелую цепь описанного в данном документе антитела), второй ген (например, легкую цепь описанного в данном документе антитела). В таком векторе экспрессии транскрипция обоих генов может управляться промотором, тогда как трансляция мРНК первого гена может осуществляться с помощью кэп-зависимого механизма сканирования, а трансляция

мРНК второго гена может осуществляться с помощью кэпа-независимого механизма, например, с помощью IRES.

[00246] После получения путем рекомбинантной экспрессии описанной в данном документе молекулы антитела ее можно очистить любым способом, известным в данной области техники для очистки молекулы иммуноглобулина, например, хроматографией (например, ионообменной, аффинной, в частности, аффинной к конкретному антигену после белка А, и эксклюзионной колоночной хроматографией), центрифугированием, методикой дифференциальной растворимости или любой другой стандартной методикой очистки белков. Кроме того, для облегчения очистки описанные в данном документе антитела можно слить с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе или иным образом известными в данной области техники.

[00247] В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, является выделенным или очищенным. Как правило, выделенное антитело представляет собой такое антитело, которое практически не содержит других антител с антигенной специфичностью, отличной от специфичности выделенного антитела. Например, в конкретном варианте осуществления препарат на основе описанного в данном документе антитела практически не содержит клеточного материала и/или химических предшественников. Формулировка «практически не содержит клеточный материал» включает препараты антитела, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых оно выделено или рекомбинантно получено. Таким образом, антитело, которое практически не содержит клеточный материал, включает препараты антитела, содержащие менее приблизительно 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (по сухому весу) гетерологичного белка (также называемого в данном документе «загрязняющим белком») и/или вариантов антитела, например, разных посттрансляционно модифицированных форм антитела или других разных вариантов антитела (например, фрагментов антител). При рекомбинантном получении антитела оно также, как правило, практически не содержит культуральной среды, т. е. культуральная среда составляет менее приблизительно 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% объема белкового препарата. При получении антитела путем химического синтеза оно обычно практически не содержит химических предшественников или

других химических веществ, т. е. оно отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые участвуют в синтезе белка. Соответственно, такие препараты антитела имеют менее приблизительно 30%, 20%, 10% или 5% (по сухому весу) химических предшественников или соединений, отличных от представляющего интерес антитела. В конкретном варианте осуществления описанные в данном документе антитела являются выделенными или очищенными.

[00248] Антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), можно получить любым известным в данной области способом синтеза антител, например, путем химического синтеза или методиками рекомбинантной экспрессии. В описанных в данном документе способах используют, если не указано иное, традиционные методики молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областей в данной области техники. Такие методики описаны, например, в упомянутых в данном документе источниках и полностью объяснены в литературе. См., например, Maniatis T *et al.*, (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные дополнения); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные дополнения) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B *et al.*, (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00249] В конкретном варианте осуществления описанное в данном документе антитело представляет собой антитело (например, рекомбинантное антитело), полученное, экспрессированное, созданное или выделенное любыми способами, которые включают создание, например путем синтеза, генной инженерии последовательностей ДНК. В определенных вариантах осуществления такое антитело

содержит последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые не существуют в природе в репертуаре зародышевой линии антител животного или млекопитающего (например, человека) в условиях *in vivo*.

[00250] Согласно одному аспекту, в данном документе предусмотрен способ получения антитела, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), предусматривающий культивирование описанной в данном документе клетки или клетки-хозяина. В одном варианте осуществления способ осуществляют в условиях *in vitro*. Согласно определенному аспекту, в данном документе предусмотрен способ получения антитела, которое специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), предусматривающий экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела с помощью описанной в данном документе клетки или клетки-хозяина (например, клетки или клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие описанное в данном документе антитело). В конкретном варианте осуществления клетка является выделенной клеткой. В конкретном варианте осуществления в клетку были введены экзогенные полинуклеотиды. В конкретном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию очистки антитела, полученного из клетки или клетки-хозяина.

[00251] Способы получения поликлональных антител известны в данной области техники (см., например, главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, eds., John Wiley и Sons, New York, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00252] Моноклональные антитела можно получить с помощью широкого спектра методик, известных в данной области техники, включая применение гибридомы, рекомбинантных методик и методик фагового дисплея или их комбинации. Например, моноклональные антитела можно получить с помощью методик с применением гибридомы, в том числе известных в данной области техники и описанных, например, в Harlow E & Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ *et al.*, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981), каждая из которых

включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Применяемый в данном документе термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Например, моноклональные антитела можно получить рекомбинантными методами из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих описанное в данном документе антитело или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

[00253] В конкретных вариантах осуществления термин «моноклональное антитело», применяемый в данном документе, обозначает антитело, продуцируемое одной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), где антитело специфически связывается с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), что определяют, например, с помощью ELISA или другого анализа связывания антигена или конкурентного связывания, известного в данной области техники или описанного в представленных в данном документе примерах. В конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело может быть химерным антителом или гуманизированным антителом. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой моновалентное антитело или поливалентное (например, бивалентное) антитело. В конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой моноспецифическое или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело). Описанные в данном документе моноклональные антитела можно получить, например, с помощью гибридомного способа, который описан у Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, или можно, например, выделить из фаговой библиотеки с помощью, например, описанных в данном документе методик. Другие способы получения клональных линий клеток и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны из уровня техники (см., например, главу 11 в: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, *выше*).

[00254] В контексте данного документа антитело связывается с антигеном поливалентно (например, бивалентно), когда антитело содержит по меньшей мере два (например, два или более) моновалентных связывающих домена, причем каждый

моновалентный связывающий домен способен связываться с эпитопом на антигене. Каждый моновалентный связывающий домен может связываться с одним и тем же или разными эпитопами на антигене.

[00255] Способы получения и скрининга специфических антител с помощью гибридной технологии являются общепринятыми и хорошо известны в данной области техники. Например, в гибридном способе для выработки лимфоцитов иммунизируют мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как овца, коза, кролик, крыса, хомяк или макака, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком (например, CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)), применяемым для иммунизации. В качестве альтернативы, лимфоциты можно иммунизировать в условиях *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с помощью подходящего средства для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием гибридной клетки (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Кроме того, для иммунизации животного можно применять методику RIMMS (повторная иммунизация в несколько мест) (Kilpatrick KE *et al.*, (1997) *Hybridoma* 16:381-9, включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00256] В определенных вариантах осуществления мышей (или других животных, таких как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомяки или собаки) можно иммунизировать антигеном (например, CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)), а после выявления иммунного ответа, например выработки специфичных к антигену антител в мышинной сыворотке крови, собирают мышиную селезенку и выделяют спленоциты. Затем спленоциты сливают с помощью хорошо известных методик с любыми подходящими клетками миеломы, например клетками клеточной линии SP20, доступными из Американской коллекции типовых культур (ATCC®) (Манассас, Вирджиния), с получением гибридом. Гибридомы отбирают и клонируют путем ограниченного разведения. В определенных вариантах осуществления собирают лимфатические узлы иммунизированных мышей и сливают их с клетками миеломы NS0.

[00257] Полученные таким образом гибридомные клетки высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, подавляющих рост или выживание неслитых исходных клеток миеломы. Например, если в исходных клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом обычно будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), такие вещества предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

[00258] В конкретных вариантах осуществления используют клетки миеломы, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильное продуцирование антител на высоком уровне выбранными клетками, продуцирующими антитела, и чувствительны к такой среде, как среда HAT. К таким линиям клеток миеломы относятся линии мышинной миеломы, такие как линия клеток NS0 или линии, полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, доступные в Центре распространения клеток Института Солка, Сан-Диего, Калифорния, США, и SP-2 или клетки X63-Ag8.653, доступные в Американской коллекции типовых культур, Роквилл, Мэриленд, США. Также были описаны линии клеток человеческой миеломы и мышино-человеческой гетеромиеломы, продуцирующие человеческие моноклональные антитела (Kozbor D (1984) J Immunol 133: 3001-5; Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00259] Культуральную среду, в которой растут клетки гибридомы, анализируют в отношении продуцирования моноклональных антител, направленных против CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака). Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют способами, известными в данной области техники, например, иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммунный анализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

[00260] После выявления гибридомных клеток, которые продуцируют антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны можно подвергнуть субклонированию с помощью процедур ограничивающих

разведений и вырастить стандартными способами (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, выше). Подходящие для такой цели питательные среды включают, например, среду D-МЕМ или RPMI 1640. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать в условиях *in vivo* в виде асцитных опухолей у животных.

[00261] Секретируемые субклонами моноклональные антитела подходящим образом выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки крови с помощью традиционных процедур очистки иммуноглобулина, таких как, например, с применением сефарозы с белком А, хроматография на гидроксилапатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

[00262] Описанные в данном документе антитела включают, например, фрагменты антител, которые распознают специфический CD96 (например, человеческий CD96 или CD96 яванского макака) и которые можно получить с помощью любой методики, известной специалистам в данной области техники. Например, описанные в данном документе Fab- и F(ab')₂-фрагменты можно получить с помощью протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с применением таких ферментов, как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения F(ab')₂-фрагментов). Fab-фрагмент соответствует одному из двух идентичных плеч молекулы антитела и содержит полную легкую цепь в паре с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. F(ab')₂-фрагмент содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы антитела, связанные дисульфидными связями в шарнирной области.

[00263] Кроме того, описанные в данном документе антитела также можно получить с помощью различных способов фагового дисплея, известных из уровня техники. В способах фагового дисплея функциональные домены антител экспонируются на поверхности фаговых частиц, которые несут кодирующие их полинуклеотидные последовательности. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, библиотек человеческих или мышинных кДНК пораженных тканей). ДНК, кодирующую домены VH и VL, рекомбинируют вместе с линкером scFv с помощью ПЦР и клонируют в фагмидный вектор. Вектор посредством электропорации вводят в

E. coli и инфицируют *E. coli* вспомогательным фагом. Фаг, применяемый в данных способах, обычно представляет собой нитевидный фаг, в том числе fd и M13, а домены VH и VL обычно рекомбинантно сливают либо с геном III, либо с геном VIII фага. Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с конкретным антигеном, можно отобрать или выявить с помощью антигена, например, с помощью меченого антигена или антигена, связанного с твердой поверхностью или микроносителем или иммобилизованного на них. Примеры способов фагового дисплея, которые можно применять для получения описанных в данном документе антител, включают способы, раскрытые в Brinkman U *et al.*, (1995) J Immunol Methods 182: 41-50; Ames RS *et al.*, (1995) J Immunol Methods 184: 177-186; Kettleborough CA *et al.*, (1994) Eur J Immunol 24: 952-958; Persic L *et al.*, (1997) Gene 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) Advan Immunol 57: 191-280; заявке согласно PCT № PCT/GB91/001134; международных публикациях №№ WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, и WO 97/13844; и патентах США №№ 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743 и 5,969,108, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00264] В приведенных выше литературных источниках описано, что после фагового отбора области, кодирующие антитела, из фага можно выделить и использовать для получения полноразмерных антител, в том числе человеческих антител или любого другого требуемого антигенсвязывающего фрагмента, и экспрессировать в любом требуемом хозяине, в том числе клетках млекопитающих, клетках насекомых, клетках растений, дрожжах и бактериях, например, как описано ниже. Методики рекомбинантного получения фрагментов антител, таких как Fab-, Fab'- и F(ab')₂-фрагменты, также можно использовать с помощью способов, известных в данной области техники, таких как раскрытые в публикации согласно PCT № WO 92/22324; Mullinax RL *et al.*, (1992) BioTechniques 12(6): 864-9; Sawai H *et al.*, (1995) Am J Reprod Immunol 34: 26-34; и Better M *et al.*, (1988) Science 240: 1041-1043, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00265] В определенных вариантах осуществления для получения полноразмерных антител можно применять ПЦР-праймеры, включающие

нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, для амплификации последовательностей VH или VL с матрицы, например, клонов scFv. Используя методики клонирования, известные специалистам в данной области техники, домены VH, амплифицированные с помощью ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область VH, а домены VL, амплифицированные с помощью ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область VL, например, константные области каппа или лямбда. Домены VH и VL также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем с помощью методов, известных специалистам в данной области техники, векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи совместно трансфицируют в клеточные линии с получением стабильных или временных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например IgG.

[00266] Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части антитела получены из разных молекул иммуноглобулина. Например, химерное антитело может содержать вариабельную область мышиного или крысиного моноклонального антитела, слитую с константной областью человеческого антитела. Способы получения химерных антител известны из уровня техники. См., например, Morrison SL (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies SD *et al.*, (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202; и патенты США №№ 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00267] Гуманизированное антитело способно связываться с заданным антигеном и содержит каркасную область, имеющую практически аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и CDR, имеющие практически аминокислотную последовательность отличного от человеческого иммуноглобулина (например, мышиного иммуноглобулина). В конкретных вариантах осуществления гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина. Антитело также может включать CH1, шарнирные, CH2, CH3 и CH4 области тяжелой цепи. Гуманизированное антитело может быть выбрано из иммуноглобулинов любого

класса, в том числе IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, в том числе IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Гуманизированные антитела можно получить с помощью ряда методик, известных в данной области техники, в том числе без ограничения прививания CDR (европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967; и патенты США №№ 5225539, 5530101 и 5585089), винирования или изменения поверхности (европейские патенты №№ EP 592106 и EP 519596; Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498; Studnicka GM *et al.*, (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814; and Roguska MA *et al.*, (1994) *PNAS* 91: 969-973), перетасовки цепей (патент США № 5565332) и методик, раскрытых, например, в патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации №WO 93/17105; Tan P *et al.*, (2002) *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas C *et al.*, (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V *et al.*, (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Baca M *et al.*, (1997) *J Biol Chem* 272(16): 10678-84; Roguska MA *et al.*, (1996) *Protein Eng* 9(10): 895 904; Couto JR *et al.*, (1995) *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR *et al.*, (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10 и Pedersen JT *et al.*, (1994) *J Mol Biol* 235(3): 959-73, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. См. также публикацию заявки на патент США № US 2005/0042664 A1 (24 февраля 2005 г.), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00268] Были описаны способы получения мультиспецифических (например, биспецифических антител), см., например, патенты США №№ 7,951,917; 7,183,076; 8,227,577; 5,837,242; 5,989,830; 5,869,620; 6,132,992 и 8586713, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00269] Однодоменные антитела, например, антитела, лишённые легких цепей, можно получить способами, хорошо известными из уровня техники. См. Riechmann L & Muyldermans S (1999) *J Immunol* 231: 25-38; Nuttall SD *et al.*, (2000) *Curr Pharm Biotechnol* 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) *J Biotechnol* 74(4): 277-302; патент США № 6005079 и международные публикации №№ WO 94/04678; WO 94/25591; и WO 01/44301, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00270] Кроме того, антитела, которые специфически связываются с антигеном CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), можно, в свою очередь, использовать для получения антиидиотипических антител, которые «имитируют» антиген, с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. См., например, Greenspan NS & Bona CA (1989) FASEB J 7(5): 437-444; и Nissinoff A (1991) J Immunol 147(8): 2429-2438, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00271] В конкретных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело, которое связывается с тем же эпитопом CD96 (например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака), что и описанное в данном документе антитело к CD96 (например, человеческому CD96 или CD96 яванского макака), представляет собой человеческое антитело. В конкретных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело, которое конкурентно блокирует (например, дозозависимым образом) любое из описанных в данном документе антител от связывания с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), представляет собой человеческое антитело. Человеческие антитела можно получить любым способом, известным из уровня техники. Например, можно применять трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но могут экспрессировать человеческие гены иммуноглобулинов. В частности, в эмбриональные мышечные стволовые клетки можно ввести случайным образом или путем гомологичной рекомбинации комплексы генов тяжелой и легкой цепей человеческого иммуноглобулина. Альтернативно, в дополнение к человеческим генам тяжелой и легкой цепи в эмбриональные мышечные стволовые клетки можно ввести человеческую переменную область, константную область и область, отвечающую за разнообразие. Мышечные гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина можно сделать нефункциональными по отдельности или одновременно с введением человеческих локусов иммуноглобулина путем гомологичной рекомбинации. В частности, продуцирование эндогенных антител предотвращает гомозиготная делеция области J_H. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и вводят посредством микроинъекции в бластоцисты с получением химерных мышей. Затем химерных мышей скрещивают для получения гомозиготного

потомства, экспрессирующего человеческие антитела. Трансгенных мышей иммунизируют обычным образом выбранным антигеном, например, всем или частью антигена (например, CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)). Моноклональные антитела, направленные против данного антигена, можно получить от иммунизированных трансгенных мышей с помощью традиционной гибридомной технологии. Трансгены человеческого иммуноглобулина, содержащиеся в трансгенных мышах, перестраиваются во время дифференцировки В-клеток и впоследствии подвергаются переключению классов и соматической мутации. Таким образом, с помощью данной методики можно получить терапевтически применимые антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор данной технологии получения человеческих антител, см. в Lonberg N & Huszar D (1995) Int Rev Immunol 13:65-93, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Подробное рассмотрение данной технологии получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител и протоколов получения таких антител см., например, в международных публикациях №№ WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735; и патентах США № 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318 и 5,939,598, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Примеры мышей, способных продуцировать человеческие антитела, включают XenomouseTM (Abgenix, Inc.; патенты США №№ 6075181 и 6150184), HuAb-MouseTM (Medarex, Inc./Gen Pharm; патенты США №№ 5545806 и 5569825), Trans Chromo MouseTM (Kirin) и KM MouseTM (Medarex/Kirin), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00272] Человеческие антитела, которые специфически связываются с CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака), можно получить различными способами, известными в области техники, в том числе описанными выше способами фагового дисплея с применением библиотек антител, полученных из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. См. также патенты США №№ 4444887, 4716111 и 5885793; и международные публикации №№ WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, и WO 91/10741, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00273] В определенных вариантах осуществления человеческие антитела можно получить с помощью гибридом мыши и человека. Например, человеческие лимфоциты периферической крови, трансформированные вирусом Эпштейна-Барр (EBV), можно слить с клетками мышинной миеломы с получением гибридом мыши и человека, секретирующих человеческие моноклональные антитела, и такие гибридомы мыши и человека можно подвергнуть скринингу для определения тех гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с целевым антигеном (например, CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака)). Такие способы известны и описаны в уровне техники, см., например, Shinmoto H *et al.*, (2004) *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa Y *et al.*, (2005) *Human Antibodies* 14: 27-31, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

5.6 Наборы

[00274] Также предусмотрены наборы, содержащие одно или более описанных в данном документе антител или содержащие их фармацевтические композиции или их конъюгаты. В конкретном варианте осуществления в данном документе предусмотрена фармацевтическая упаковка или набор, которые содержат один или более контейнеров, наполненных одним или более ингредиентами описанных в данном документе фармацевтических композиций, такими как одно или более представленных в данном документе антител. В определенных вариантах осуществления наборы содержат описываемую в данном документе фармацевтическую композицию и любое профилактическое или терапевтическое средство, такое как описанное в данном документе. В определенных вариантах осуществления наборы могут содержать митоген Т-клеток, такой как, например, фитогемагглютинин (РНА) и/или форболмиристатацетат (РМА), или антитело, стимулирующее комплекс TCR, такое как антитело к CD3 и антитело к CD28. С таким(-ими) контейнером(-ами) необязательно может быть связана запись в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, в которой отражено выданное органом разрешение производства, применения или продажи для применения на людях.

[00275] Также предусмотрены наборы, которые можно применять в вышеуказанных способах. В одном варианте осуществления набор содержит описанное в данном документе антитело, предпочтительно очищенное антитело, в одном или нескольких контейнерах. В конкретном варианте осуществления описанные в данном документе наборы содержат практически выделенный антиген CD96 (например, человеческий CD96 или CD96 яванского макака) в качестве контроля. В другом конкретном варианте осуществления описанные в данном документе наборы дополнительно содержат контрольное антитело, которое не вступает в реакцию с антигеном CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака). В другом конкретном варианте осуществления описанные в данном документе наборы содержат один или более элементов для выявления связывания антитела с антигеном CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) (например, антитело может быть конъюгировано с выявляемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или второе антитело, которое распознает первое антитело, может быть конъюгировано с выявляемым субстратом). В конкретных вариантах осуществления предусмотренный в данном документе набор может включать полученный рекомбинантными методами или синтезированный химическими методами антиген CD96 (например, человеческий CD96 или CD96 яванского макака). Представленный в наборе антиген CD96 (например, человеческий CD96 или CD96 яванского макака) также может быть присоединен к твердой подложке. В более конкретном варианте осуществления средства выявления из описанного выше набора включают твердую подложку, к которой присоединен антиген CD96 (например, человеческий CD96 или CD96 яванского макака). Такой набор также может включать неприсоединенное, меченное репортерной меткой антитело к антителам человека или антитело к антителам мыши/крысы. В данном варианте осуществления связывание антитела с антигеном CD96 (например, человеческим CD96 или CD96 яванского макака) можно выявлять с помощью связывания указанного меченого репортерной метком антитела. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению набора по настоящему изобретению для анализа *in vitro* и/или выявления антигена CD96

(например, человеческого CD96 или CD96 яванского макака) в биологическом образце.

6. ПРИМЕРЫ

[00276] Примеры в данном разделе (т. е. в разделе 6) предложены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

6.1 Пример 1. Изучение характеристик антител к CD96

[00277] В данном примере описаны результаты изучения характеристик антител, которые специфически связываются с человеческим CD96. Аминокислотные последовательности данных антител представлены в таблице 1.

6.1.1 Антитела к человеческому CD96 связываются с очищенным белком CD96 человека и яванского макака

Связывание исходных антител к CD96 и антител зародышевого типа к CD96 с His-меченой изоформой 2 человеческого CD96 с мутацией C89S

[00278] Аффинность связывания исходного антитела BA072 и вариантов BA083 и BA084 зародышевой линии с полноразмерной изоформой 2 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 129) с His-меткой оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

[00279] Вкратце: эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (K_a), скорость диссоциации (K_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00280] Примерно 4 мкг/мл BA072, BA083, BA084, BA0833 и BA0834, разведенных в рабочем буфере (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), иммобилизовали в отдельных проточных кюветах сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, кат. № 29-1275-56), оставив одну проточную кювету в качестве эталона. Антитела иммобилизовали с помощью 15-секундной инъекции со скоростью потока 10 мкл/мин. до достижения приблизительно 150 резонансных единиц (RU). Полноразмерную изоформу 2 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 129) с His-меткой, разведенную в рабочем буфере в концентрации 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3, 100, 300 нМ, пропускали по поверхности чипа со скоростью потока 30 мкл/мин. с 3-минутной фазой ассоциации и

10-минутной или 15-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали с помощью 30-секундной инъекции 10 мМ глицина, pH 1,5. Сенсограммы оценивали и аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием опции глобального анализа данных из программного обеспечения BIAevaluation 3.1. Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров $R_{\max}$, χ^2 и T_c . Кинетику связывания (K_a , K_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Кинетические параметры связывания антитела к CD96 с полноразмерной изоформой 2 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 129)

Антитело	K_a (1/Мс)	K_d (1/с)	K_D (М)
BA072	8,95E+04	3,08E-04	4,34E-09
BA083	1,71E+05	2,98E-04	3,11E-09
BA084	8,98E+04	4,03E-04	4,80E-09

Связывание исходных антител к CD96 и антител зародышевого типа к CD96 с His-меченой изоформой 2 человеческого CD96 с мутацией C89S

[00257] Аффинность связывания исходного антитела BA101 и вариантов BA102, BA103, BA104, BA105, BA106 и BA107 зародышевой линии с полноразмерной изоформой 2 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 129) с His-меткой оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

[00258] Вкратце: эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (K_a), скорость диссоциации (K_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00259] Примерно 4 мкг/мл BA102, BA103, BA104, BA105, BA106 и BA107, разведенных в рабочем буфере (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), иммобилизовали на отдельных проточных кюветах сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, кат. № 29-1275-56), оставив одну проточную кювету в качестве эталона. Антитела

иммобилизировали с помощью 15-секундной инъекции со скоростью потока 10 мкл/мин. до достижения приблизительно 200 резонансных единиц (RU). Полноразмерную изоформу 2 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 129) с His-меткой, разведенную в рабочем буфере в концентрации 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3, 100, 300 нМ, пропускали по поверхности чипа со скоростью потока 30 мкл/мин. с 3-минутной фазой ассоциации и 10-минутной (в случае gl6) или 15-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали с помощью 30-секундной инъекции 10 мМ глицина, pH 1,5. Сенсограммы оценивали и аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием опции глобального анализа данных из программного обеспечения BIAevaluation 3.1. Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров R_{max} , χ^2 и T_c . Кинетику связывания (K_a , K_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Кинетические параметры связывания антитела к CD96 с полноразмерной изоформой 2 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 129)

Антитело	K_a (1/Mc)	K_d (1/c)	K_D (M)
BA101	2,77E+05	9,57E-04	4,52E-09
BA102	3,19E+05	8,34E-04	2,61E-09
BA103	3,53E+05	0,001272	3,61E-09
BA104	3,36E+05	9,90E-04	2,95E-09
BA105	3,28E+05	8,41E-04	2,56E-09
BA106	3,08E+05	8,72E-04	2,83E-09
BA107	1,15E+05	1,59E-03	1,38E-08

Связывание антител к CD96 с созревшей аффинностью с His-меченым доменом 1 человеческого CD96 с мутацией C89S или с His-меченым доменом 1 CD96 яванского макака

[00260] Аффинность связывания исходного антитела BA072, антитела зародышевого типа BA083 и вариантов BA093, BA092, BA091, BA089, BA086,

BA094, BA088, BA090, BA087 и BA085 с созревшей аффинностью с доменом 1 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 131) с His-меткой или с доменом 1 CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 134) с His-меткой оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Варианты с созревшей аффинностью отбирали по повышенной аффинности к CD96 яванского макака.

[00261] Вкратце: эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (K_a), скорость диссоциации (K_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00262] В частности, антитела, разведенные в рабочем буфере (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), иммобилизовали на отдельных проточных кюветах сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, кат. № 29-1275-56), оставив одну проточную кювету в качестве эталона. Антитела иммобилизовали с помощью 15-секундной инъекции со скоростью потока 10 мкл/мин. до достижения уровней иммобилизации, оптимальных для анализа кинетики (приблизительно 430 RU). Концентрацию антитела для достижения оптимального уровня иммобилизации определяли отдельно для каждого эксперимента (приблизительно 8 мкг/мл для каждого антитела). Домен 1 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 131) с His-меткой или домен 1 CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 134) с His-меткой, разведенные в рабочем буфере в концентрации 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3, 100, 300 нМ, пропускали по поверхности чипа со скоростью потока 30 мкл/мин. с 3-минутной фазой ассоциации и 15-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали с помощью 30-секундной инъекции 10 mM глицина, pH 1,5. Сенсограммы оценивали и аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием опции глобального анализа данных из программного обеспечения BIAevaluation 3.1. Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров R_{max} , χ^2 и T_c . Кинетику связывания (K_a , K_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты представлены в таблице 5 (человека) и таблице 6 (яванского макака).

Таблица 5. Кинетические параметры связывания антитела к CD96 с доменом 1 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 131)

Антитело	K_a (1/Mc)	K_d (1/c)	K_D (M)
BA093	3,33E+05	4,32E-04	1,30E-09
BA092	9,46E+05	4,66E-04	4,93E-10
BA091	8,13E+05	4,35E-04	5,35E-10
BA089	1,23E+07	2,16E-03	1,76E-09
BA086	9,80E+05	4,40E-04	4,49E-10
BA083	1,02E+06	4,99E-05	4,88E-10
BA094	8,23E+05	4,53E-04	5,51E-10
BA088	7,79E+05	4,04E-04	5,18E-10
BA090	7,75E+05	4,58E-04	9,13E-10
BA087	6,43E+05	4,10E-04	6,39E-10
BA085	6,43E+05	3,94E-04	6,12E-10
BA072	6,87E+05	4,20E-04	6,11E-10

Таблица 6. Кинетические параметры связывания антитела к CD96 с доменом 1 CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 134)

Антитело	K_a (1/Mc)	K_d (1/c)	K_D (M)
BA093	3,95E+05	4,10E-04	1,04E-09
BA092	2,33E+05	5,46E-04	2,44E-09
BA091	3,36E+05	3,70E-04	1,10E-09
BA089	4,72E+05	4,14E-04	8,77E-09
BA086	3,03E+05	7,69E-04	2,54E-09
BA083	4,23E+05	3,39E-03	8,03E-09
BA094	3,69E+05	5,42E-04	1,47E-09
BA088	3,43E+05	7,73E-04	2,26E-09
BA090	3,57E+05	1,40E-03	3,93E-09
BA087	3,67E+05	3,94E-04	1,075-9
BA085	3,14E+05	5,33E-04	1,70E-09
BA072	4,33E+05	5,09E-03	1,18E-08

Связывание антител к CD96 с созревшей аффинностью с His-меченым доменом 1 человеческого CD96 с мутацией C89S или с His-меченым доменом 1 CD96 яванского макака

[00263] Аффинность связывания исходного антитела BA072, антитела зародышевого типа BA083 и вариантов BA073, BA074, BA078, BA079, BA080, BA081, BA076, BA077, BA082, BA075 с созревшей аффинностью с доменом 1 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 131) с His-меткой или с доменом 1 CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 134) с His-меткой оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Варианты с созревшей аффинностью отбирали по повышенной аффинности к CD96 яванского макака.

[00264] Вкратце: эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (K_a), скорость диссоциации (K_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00265] В частности, антитела, разведенные в рабочем буфере (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), иммобилизовали на отдельных проточных кюветах сенсорного чипа с белком A серии S (GE Healthcare Ltd, кат. № 29-1275-56), оставив одну проточную кювету в качестве эталона. Антитела иммобилизовали с помощью 15-секундной инъекции со скоростью потока 10 мкл/мин. до достижения уровней иммобилизации, оптимальных для анализа кинетики (приблизительно 250 RU). Концентрацию антитела для достижения оптимального уровня иммобилизации определяли отдельно для каждого эксперимента (приблизительно 4 мкг/мл для каждого антитела). Домен 1 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 131) с His-меткой или домен 1 CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 134) с His-меткой, разведенные в рабочем буфере в концентрации 0,75, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 нМ, пропускали по поверхности чипа со скоростью потока 30 мкл/мин. с 3-минутной фазой ассоциации и 15-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали с помощью 30-секундной инъекции 10 mM глицина, pH 1,5. Сенсограммы оценивали и

аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием опции глобального анализа данных из программного обеспечения BIAevaluation 3.1. Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров $R_{\max}$, χ^2 и T_c . Кинетику связывания (K_a , K_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты представлены в таблице 7 (человека) и таблице 8 (яванского макака).

Таблица 7. Кинетические параметры связывания антитела к CD96 с доменом 1 человеческого CD96 с мутацией C89S (SEQ ID NO: 131)

Антитело	K_a (1/Mc)	K_d (1/c)	K_D (M)
BA073	9,32E+05	3,25E-04	3,48E-10
BA074	9,15E+05	4,42E-04	4,83E-10
BA078	8,32E+05	3,57E-04	4,29E-10
BA079	5,54E+05	3,18E-04	5,75E-10
BA080	9,95E+05	4,41E-04	4,43E-10
BA081	7,80E+05	4,60E-04	5,90E-10
BA076	6,67E+05	2,77E-04	4,15E-10
BA077	5,65E+05	3,01E-04	5,32E-10
BA082	7,53E+05	4,39E-04	5,83E-10
BA075	5,29E+05	3,83E-04	7,25E-10
BA083	1,14E+06	4,91E-04	4,31E-10
BA072	9,69E+05	5,01E-04	5,17E-10

Таблица 8. Кинетические параметры связывания антитела к CD96 с доменом 1 CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 134)

Антитело	K_a (1/Mc)	K_d (1/c)	K_D (M)
BA073	5,38E+05	2,36E-04	4,38E-10
BA074	4,59E+05	2,18E-04	4,74E-10
BA078	5,11E+05	2,79E-04	5,46E-10
BA079	4,46E+05	2,66E-04	5,97E-10
BA080	5,31E+05	2,86E-04	5,40E-10

BA081	4,05E+05	3,06E-04	7,55E-10
BA076	3,46E+05	2,25E-04	6,50E-10
BA077	2,90E+05	2,17E-04	7,47E-10
BA082	4,91E+05	2,85E-04	5,81E-10
BA075	2,81E+05	2,75E-04	9,78E-10
BA083	4,40E+05	0,003536	8,04E-09
BA072	5,18E+05	0,006013	1,16E-08

6.1.2 Антитела к человеческому CD96 связываются с клетками, экспрессирующими CD96 человека и яванского макака

[00266] Способность человеческих антител IgG1 к CD96 связываться с клетками, экспрессирующими человеческий CD96 или CD96 яванского макака, тестировали на различных типах клеток.

Связывание антител к CD96 с клетками Jurkat, экспрессирующими изоформу 2 человеческого CD96

[00267] Оценивали способность исходных антител BA072 и BA101 связываться с изоформой 2 человеческого CD96, экспрессируемой на поверхности клеток Jurkat. Вкратце: клетки Jurkat трансфицировали вектором, кодирующим полноразмерную изоформу 2 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 128), и отбирали клон, стабильно экспрессирующий высокий уровень CD96. Эту стабильную клеточную линию культивировали в среде RPMI-1640, дополненной 10% термоинактивированной FBS и 1% пуромицина (среде R10).

[00268] Для анализа связывания антител клетки высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур с U-образным дном при плотности 5×10^4 клеток на лунку и инкубировали в течение 30 минут при 4°C с серией разведений BA072, BA101 или с антителами изотипического контроля в концентрациях от 10 мкг/мл до 0,3 нг/мл, разведенных в PBS, дополненном 2% термоинактивированной FBS (буфер для FACS).

[00269] Для окрашивания антител клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем меченное R-фикоэритрином козье антитело к человеческому IgG (Fab'2) (Fitzgerald/43C-CJ0123) в

разведении 1:20. После 10-минутной инкубации при 4°C клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали с помощью проточной цитометрии (проточным цитометром BD LSR Fortessa). Неокрашенные контрольные клетки применяли для гейтирования популяции лимфоцитов с помощью графика площади прямого рассеяния (FSC-A) относительно площади бокового рассеяния (SSC-A) и другого графика FSC-A относительно FSC-высоты (FSC-H) для отбора одиночных клеток. Образцы анализировали путем последовательного гейтирования следующих популяций: FSC-A относительно SSC-A, FSC-H относительно FSC-A и SSC-A относительно PE. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

[00270] Как показано на фигуре 1A и фигуре 1B, BA072 (фигура 1A) и BA101 (фигура 1B) связывались с экспрессирующими человеческий CD96 клетками Jurkat дозозависимым образом. Расчетные значения площади под кривой (AUC) и EC50 для антител к CD96, представленные на фигурах 1A и 1B, представлены в таблице 9 и таблице 10.

Таблица 9. Значения AUC для антител к CD96 на фигурах 1A и 1B

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA072	417270	2658
BA101	733360	10440
Изотип	4763	359,5

Таблица 10. Значения EC50 для антител к CD96 на фигурах 1A и 1B*

Антитело	EC ₅₀ (нг/мл)	95% CI (нг/мл)
BA072	28,23	23,45-33,91
BA101	157,2	144-171,6

* Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Связывание антител к CD96 с клетками CHO, экспрессирующими изоформу 1 человеческого CD96 или изоформу 2 человеческого CD96

[00271] Оценивали способность исходных антител BA072 и BA101 связываться с человеческим CD96, экспрессируемым на поверхности клеток CHO. Вкратце: клетки CHO трансфицировали вектором, кодирующим полноразмерную изоформу 1 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 127) или полноразмерную изоформу 2 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 128), и отбирали клоны, стабильно экспрессирующие изоформу 1 или изоформу 2 CD96. Данные стабильные клеточные линии культивировали в среде Power CHO-2, содержащей 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1х НТ-добавку и 2,5 мкг/мл пурамицина.

[00272] Для анализа связывания антител замороженную аликвоту клеток CHO, экспрессирующих человеческий CD96 (изоформу 1 или изоформу 2), оттаивали при 37°C, а затем переносили в пробирку, содержащую PBS, дополненную 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% азида натрия (буфер для FACS). Клетки центрифугировали при 300g в течение пяти минут. Удаляли супернатант, а клетки, ресуспендированные в буфере для FACS, высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур с U-образным дном при плотности 2×10^5 клеток на лунку в 50 мкл. В отдельном микропланшете готовили 2х концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела (т. е. BA072, BA101 и изотипического контроля). Антитела серийно разводили в соотношении 1 к 3 в буфере для FACS. Всего получали 11 рабочих разведений в диапазоне концентраций от 60 мкг/мл до 0,000339 мкг/мл. Затем пятьдесят мкл каждого разведения переносили в микропланшет, содержащий клетки CHO, экспрессирующие человеческий CD96. Затем клетки инкубировали в течение 30 минут при 4°C. Для окрашивания антител клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем козье антитело к человеческому IgG, меченное R-фикоэритрином (PE), в форме F(ab')₂-фрагмента AffiniPure, который специфичен к Fcγ-фрагменту (Jackson, кат. №№ 109-116-098), в конечном разведении 1:800. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали с помощью проточной цитометрии (проточным цитометром BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием

программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Данное программное обеспечение использовали для определения концентрации антитела, приводящей к 50% от максимального связывания (эффективная концентрация 50, [EC50]), путем аппроксимации кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения.

[00273] Как показано на фигуре 2А и фигуре 2В, ВА072 (фигура 2А) и ВА101 (фигура 2В) связывались с клетками CHO, экспрессирующими полноразмерную изоформу 1 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 127), дозозависимым образом. Расчетные значения площади под кривой (AUC) и EC50 для антител к CD96, представленные на фигурах 2А и 2В, представлены в таблице 11 и таблице 12.

Таблица 11. Значения AUC для антител к CD96 на фигурах 2А и 2В

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
ВА072	548231	12784
ВА101	257360	6734
Изотип	43478	9434

Таблица 12. Значения EC50 для антител к CD96 на фигурах 2А и 2В.*

Антитело	EC ₅₀ (нг/мл)	95% CI (нг/мл)
ВА072	258	169-393
ВА101	393	185-834

* Рассчитано по результатам 4 экспериментов.

[00274] Как показано на фигуре 3А и фигуре 3В, ВА072 (фигура 3А) и ВА101 (фигура 3В) связывались с клетками CHO, экспрессирующими полноразмерную изоформу 2 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 128), дозозависимым

образом. Расчетные значения площади под кривой (AUC) и EC50 для антител к CD96, представленные на фигурах 3А и 3В, представлены в таблице 13 и таблице 14.

Таблица 13. Значения AUC для антител к CD96 на фигурах 3А и 3В

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA072	122641	3382
BA101	115846	2318
Изотип	5811	851.6

Таблица 14. Значения EC50 для антител к CD96 на фигурах 3А и 3В*

Антитело	EC ₅₀ (нг/мл)	95% CI (нг/мл)
BA072	221	17-2932
BA101	348	89 - 1352

* Рассчитано по результатам 3 экспериментов.

Связывание антител к CD96 с клетками CHO, экспрессирующими изоформу 2 CD96 яванского макака

[00275] В экспериментах, схожих с описанными в данном разделе выше, тестировали способность исходных антител BA072 и BA101 связываться с клетками CHO, сконструированными для экспрессии изоформы 2 CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 133) на их клеточных поверхностях. Вкратце: клетки CHO трансфицировали вектором, кодирующим изоформу 2 CD96 яванского макака, и отбирали клон, стабильно экспрессирующий CD96. Данную стабильную клеточную линию культивировали в среде Power CHO-2, содержащей 4 мМ L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1х НТ-добавку и 2,5 мкг/мл пурамицина. Способность антител BA072 и BA101 связываться с клетками CHO, экспрессирующими изоформу 2 CD96 яванского макака, определяли так, как описано выше для клеток CHO, экспрессирующих человеческий CD96.

[00276] Как показано на фигуре 4А и фигуре 4В, BA072 (фигура 4А) и BA101 (фигура 4В) связывались с клетками CHO, экспрессирующими изоформу 2 CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 133), дозозависимым образом. Расчетные

значения площади под кривой (AUC) и EC50 для антител к CD96, представленные на фигурах 4А и 4В, представлены в таблице 15 и таблице 16.

Таблица 15. Значения AUC для антител к CD96 на фигурах 4А и 4В

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA072	160331	3674
BA101	21400	689,3
Изотип	6028	1824

Таблица 16. Значения EC50 для антител к CD96 на фигурах 4А и 4В*

Антитело	EC ₅₀ (нг/мл)	95% CI (нг/мл)
BA072	29	4-200
BA101	N/A	N/A

* Рассчитано по результатам 3 экспериментов.

Связывание антител к CD96 с активированными первичными человеческими клетками

[00277] В данном эксперименте тестировали способность антител к CD96 связываться с активированными человеческими Т-клетками.

[00278] В случае активированных Т-клеток замороженную аликвоту человеческих РВМС извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде с температурой 37°C до тех пор, пока не наблюдалось появление плавающего льда. Т-клетки выделяли с применением набора для выделения Т-клеток Pan (Miltenyi Biotec/130-096-535). Затем Т-клетки переносили в 10 мл предварительно нагретой среды R10. Забирали 20 мкл и добавляли к 380 мкл красителя для определения жизнеспособности для подсчета клеток и проверки жизнеспособности с применением прибора Muse. Образцы центрифугировали при 1200 об./мин. в течение пяти минут, а затем суспендировали до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде R10.

[00279] Добавляли конканавалин А (Sigma/C-5275) к выделенным Т-клеткам, подготовленным так, как описано выше, до конечной концентрации 5 мкг/мл с 50 ед. IL-2 (R&D Systems/202-IL), и пипеткой вносили по 100 мкл

простимулированных клеток в каждую лунку 96-луночного круглодонного планшета для тканевых культур, и инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение восьми дней.

[00280] Получали диапазон доз антител в 96-луночном круглодонном планшете. Сначала получали 600 мкл 50 мкг/мл каждого антитела (т. е. BA072, BA101 или изотипического контроля IgG1) в буфере. Затем антитела титровали трехкратными разведениями путем перенесения пипеткой 200 мкл предыдущего разведения в 400 мкл буфера для образцов. Всего получали 9 разведений в диапазоне от 10 мкг/мл до 0,3 нг/мл.

[00281] Спустя восемь дней планшет с образцами центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин. и удаляли супернатанты. Образцы окрашивали красящим фиксированные клетки красителем LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (Life Technologies/L10119) в PBS в течение 10 минут. Затем планшеты с образцами центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин. и удаляли супернатант. Затем клетки ресуспендировали в 100 мкл BA072, BA101 или изотипического контроля IgG1 в концентрациях, показанных на фигуре 5, фигуре 6 и фигуре 7. Планшеты с образцами инкубировали в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали путем добавления холодного буфера для образцов, и центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин., и удаляли супернатант. Данную промывку повторяли еще раз.

[00282] Получали конечную смесь PE-меченых вторичных антител к человеческому IgG (Fab'2) в 11 мл буфера для FACS. Добавляли 50 мкл вторичного антитела на лунку в круглодонный 96-луночный планшет. После 10-минутной инкубации при 4°C клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в 1,6% параформальдегиде в PBS.

[00283] Связывание антител измеряли методом проточной цитометрии с применением проточного цитометра BD LSR Fortessa. Неокрашенные контрольные клетки применяли для гейтирования популяции лимфоцитов с помощью графика FSC-A относительно площади бокового рассеяния SSC-A и другого графика FSC-A относительно FSC-H для отбора одиночных клеток. Пробирки с клетками, окрашенными каждым отдельным антителом, использовали для расчета компенсации различных цветов, использованных в эксперименте. Для каждого образца

регистрировали 50000 событий. Образцы анализировали путем последовательного гейтирования следующих популяций: FSC-A относительно SSC-A, FSC-H относительно FSC-A, SSC-A относительно LIVE/DEAD и SSC-A относительно PE. Рассчитывали MFI.

[00284] Как показано на фигуре 5A и фигуре 5B, BA072 (фигура 5A) и BA101 (фигура 5B) связывались с активированными первичными человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD96, дозозависимым образом. Расчетные значения площади под кривой (AUC) и EC50 для антител к CD96, представленные на фигурах 5A и 5B, представлены в таблице 17 и таблице 18.

Таблица 17. Значения AUC для антител к CD96 на фигурах 5A и 5B

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA072	5587	57,92
BA101	11603	207,5
Изотип	1409	90,83

Таблица 18. Значения EC50 для антител к CD96 на фигурах 5A и 5B

Антитело	EC ₅₀ (нг/мл)	95% CI (нг/мл)
BA072	6,67	3,61-14,74
BA101	10,54	8,58-12,95

[00285] Как показано на фигурах 6A-6C, BA072 (фигура 6A), BA083 (фигура 6B) и BA084 (фигура 6C) связывались с активированными первичными человеческими Т-клетками дозозависимым образом. Расчетные значения площади под кривой (AUC) для антител к CD96, представленные на фигурах 6A-С, представлены в таблице 19.

Таблица 19. Значения AUC для антител к CD96 на фигурах 6A-С

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
----------	--------------------------	--------------------

BA072	71147	714,2
BA083	68546	2250
BA084	69040	775,7
Изотип	23135	515,5

[00286] Как показано на фигурах 7A-F, BA101 (фигура 7A), BA102 (фигура 7B), BA103 (фигура 7C), BA104 (фигура 7D), BA105 (фигура 7E) и BA106 (фигура 7F) связывались с активированными первичными человеческими Т-клетками дозозависимым образом. Расчетные значения площади под кривой (AUC) для антител к CD96, представленные на фигурах 7A-F, представлены в таблице 20.

Таблица 20. Значения AUC для антител к CD96 на фигурах 7A-F

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA101	120826	1037
BA102	124947	2067
BA103	123323	1053
BA104	122312	1367
BA105	123476	1864
BA106	125241	4917
Изотип	23135	515.5

Связывание антител к CD96 с созревшей аффинностью с активированными первичными человеческими клетками

[00287] Тестировали способность BA072, BA083, BA073, BA074, BA078, BA079, BA080, BA081, BA076, BA077, BA075, BA082 и BA101 связываться с CD8⁺ Т-клетками, трансфицированными посредством NY-ESO-1. Вкратце: замороженную аликвоту Т-клеток, трансдуцированных посредством NY-ESO-1, извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде с температурой 37°C до тех пор, пока не наблюдалось появление плавающего льда. Затем клетки переносили в 9 мл предварительно нагретой среды R10 NY-ESO-1. Образцы центрифугировали при 300g в течение 5 минут, а затем суспендировали до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде R10. Т-клетки добавляли в разведении 1:1 в колбы для

тканевых культур, содержащие облученные клетки U251MG, трансдуцированные пептидом NY-ESO-1, и инкубировали в инкубаторе для тканевых культур при 37°C в 5% CO₂ до тех пор, пока не погибали все клетки U251MG. Т-клетки переносили в колбу со свежими облученными клетками U251MG NYESO и повторяли инкубацию. Данный цикл повторяли 3 раза в течение 8 дней.

[00288] Получали диапазон доз антител в 96-луночном круглодонном планшете. Сначала получали 300 мкл 40 мкг/мл каждого антитела в буфере. Затем антитела серийно разводили в соотношении 1 к 5 путем перенесения пипеткой 62,5 мкл предыдущего разведения в 250 мкл буфера для образцов. Всего получали 8 разведений в диапазоне от 40 мкг/мл до 0,000512 мкг/мл. Описанные выше активированные Т-клетки окрашивали 2 мкл красящего фиксированные клетки красителя LIVE/DEAD[®] Fixable Near-IR (Life Technologies, кат. № L10119) в 500 мкл PBS в течение 15 минут при 4°C. Клетки доводили до 10 мл с помощью PBS, а затем центрифугировали при 300g в течение 5 минут и удаляли супернатант. Клетки ресуспендировали в 500 мкл холодного буфера для FACS и инкубировали с Human TruStain FcX[™] (раствор, блокирующий Fc-рецептор, BioLegend, кат. № 422302), разведенным 1:10, в течение 15 минут при 4°C. Клетки затем ресуспендировали в 15 мл холодного буфера для FACS и 50 инкубировали с Human TruStain FcX[™] (раствор, блокирующий Fc-рецептор, BioLegend, кат. № 422302), разведенным в соотношении 1:50, добавленным к 50 мкл антитела к CD96 или соответствующего изотипического контроля при концентрациях, показанных на фигурах 8А-8М. Планшеты с образцами инкубировали в течение 60 минут при 4°C. Клетки промывали путем добавления холодного буфера для образцов, и центрифугировали в течение 5 минут при 300g, и удаляли супернатант. Данную промывку повторяли еще раз.

[00289] Затем клетки ресуспендировали в смеси из меченных флуоресцентной меткой антител. Для окрашивания антител клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS. Получали смесь меченных флуоресцентной меткой антител, достаточных для всех образцов, в буфере FACS. 50 мкл буфера, содержащего антитело осла к человеческому IgG, меченное R-фикоэритрином, в форме F(ab')₂-фрагмента AffiniPure (H+L) (Jackson, кат. № 09-116-149), в разведении 1:100 и CD4 BUV496 в разведении 1:200 и CD8 APC в разведении 1:200 затем добавляли в планшет для

образцов. Планшет с образцами инкубировали в течение 30 минут на льду. Клетки промывали путем добавления холодного буфера для образцов, центрифугировали в течение 5 минут при 300g и удаляли супернатанты. Данную промывку повторяли еще раз. Клетки ресуспендировали в 1,6% PFA в буфере для FACS.

[00290] Связывание антител измеряли методом проточной цитометрии с применением проточного цитометра BD LSR Fortessa. Неокрашенные контрольные клетки применяли для гейтирования популяции лимфоцитов с помощью графика площади прямого рассеяния (FSC-A) относительно площади бокового рассеяния (SSC-A) и другого графика FSC-A относительно FSC-высоты (FSC-H) для отбора одиночных клеток. Пробирки с клетками, окрашенными каждым отдельным антителом, использовали для расчета компенсации различных цветов, использованных в эксперименте. Для каждого образца регистрировали 20000 событий. Образцы анализировали путем последовательного гейтирования следующих популяций: FSC-A относительно SSC-A, FSC-H относительно FSC-A, SSC-A относительно LIVE/DEAD и CD4 относительно CD8. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) PE.

[00291] Как показано на фигурах 8A-8M, BA072 (фигура 8A), BA083 (фигура 8B), BA074 (фигура 8C), BA073 (фигура 8D), BA079 (фигура 8E), BA078 (фигура 8F), BA081 (фигура 8G), BA080 (фигура 8H), BA077 (фигура 8I), BA076 (фигура 8J), BA082 (фигура 8K), BA075 (фигура 8L) и BA101 (фигура 8M) связывались с CD8⁺ Т-клетками, трансфицированными NY-ESO-1, дозозависимым образом. Расчетные значения площади под кривой (AUC) для антител к CD96, представленные на фигурах 8A-8M, представлены в таблице 21. Эксперимент проводили дважды, и результаты, представленные для одного повтора, были репрезентативными.

Таблица 21. Значения AUC для антител к CD96 на фигурах 8A-8M

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA072	146011	2840
BA083	153719	705,1
BA073	152117	1510

202		
BA074	153273	847,4
BA078	152808	731,6
BA079	152593	1000
BA080	150253	736,6
BA081	146170	1925
BA076	168753	777,1
BA077	166930	1468
BA082	168052	853
BA075	170820	1379
BA101	248634	3574
Изотип	35746	647,6

Связывание антител к CD96 с активированными первичными клетками яванского макака

[00292] В данном примере тестировали способность BA072 и BA101 связываться с активированными клетками яванского макака.

[00293] Замороженную аликвоту мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) яванского макака извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде с температурой 37°C до тех пор, пока не наблюдалось появление плавающего льда. Затем клетки переносили в 9 мл предварительно нагретой среды R10. Забирали 20 мкл и добавляли к 380 мкл красителя для определения жизнеспособности для подсчета клеток и проверки жизнеспособности с применением прибора Muse. Образцы центрифугировали при 2000 об./мин. в течение двух минут, а затем суспендировали до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде R10.

[00294] Добавляли конканавалин А (Sigma/C-5275) к PBMC-клеткам, подготовленным так, как описано выше, до конечной концентрации 5 мкг/мл с 50 ед. IL-2 (R&D Systems/202-IL), и пипеткой вносили по 100 мкл простимулированных клеток в каждую лунку 96-луночного круглодонного планшета для тканевых культур, и инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение восьми дней.

[00295] Получали диапазон доз антител в 96-луночном круглодонном планшете. Сначала получали 600 мкл 50 мкг/мл каждого антитела (т. е. BA072, BA101 или изотипического контроля IgG1) в буфере. Затем антитела титровали

трехкратными разведениями путем перенесения пипеткой 200 мкл предыдущего разведения в 400 мкл буфера для образцов. Всего получали 9 разведений в диапазоне от 10 мкг/мл до 0,3 нг/мл. Спустя восемь дней планшет с образцами центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин. и удаляли супернатанты. Образцы окрашивали красящим фиксированные клетки красителем LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (Life Technologies/L10119) в PBS в течение 10 минут. Затем планшеты с образцами центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин. и удаляли супернатант. Затем клетки ресуспендировали в 100 мкл BA072, BA101 или изотипического контроля IgG1 в концентрациях, показанных на фигурах 9А и 9В. Планшеты с образцами инкубировали в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали путем добавления холодного буфера для образцов, и центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин., и удаляли супернатант. Данную промывку повторяли еще раз.

[00296] Получали конечную смесь РЕ-меченых вторичных антител к человеческому IgG (Fab'2) в 11 мл буфера для FACS. Добавляли 50 мкл вторичного антитела на лунку в круглодонный 96-луночный планшет. После 10-минутной инкубации при 4°C клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в 1,6% параформальдегиде в PBS.

[00297] Связывание антител измеряли методом проточной цитометрии с применением проточного цитометра BD LSR Fortessa. Неокрашенные контрольные клетки применяли для гейтирования популяции лимфоцитов с помощью графика FSC-A относительно SSC-A и другого графика FSC-A относительно FSC-H для отбора одиночных клеток. Пробирки с клетками, окрашенными каждым отдельным антителом, использовали для расчета компенсации различных цветов, использованных в эксперименте. Для каждого образца регистрировали 50000 событий. Образцы анализировали путем последовательного гейтирования следующих популяций: FSC-A относительно SSC-A, FSC-H относительно FSC-A, SSC-A относительно LIVE/DEAD и SSC-A относительно PE. Рассчитывали MFI.

[00298] Как показано на фигурах 9А и 9В, BA072 (фигура 9А) и BA101 (фигура 9В) связывались с активированными первичными Т-клетками яванского

макака, экспрессирующими CD96. Расчетные значения площади под кривой (AUC) для антител к CD96, представленные на фигурах 9А и 9В, представлены в таблице 22.

Таблица 22. Значения AUC для антител к CD96 на фигурах 9А и 9В

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA072	2484	114,7
BA101	1494	57,97
Изотип	1274	76,96

6.1.3 Антитела к CD96 блокируют связывание лиганда с CD96

[00299] В данном примере тестировали способность антител к CD96 блокировать связывание между CD96 и его лигандом PVR (также называемым CD155).

Исходные антитела к CD96 блокируют связывание CD155/PVR-Fc с клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96

[00300] Клетки CHO, экспрессирующие CD96, ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл с PBS. Аликвоты по 100 мкл клеток помещали в 96-луночный круглодонный планшет, центрифугировали при 1200 об./мин в течение пяти минут и удаляли супернатант. Получали каждое антитело (т. е. BA07, BA101 или изотипический контроль IgG1) в 30 мкг/мл в буфере для FACS. Затем антитела титровали трехкратными разведениями путем перенесения пипеткой 112 мкл предыдущего разведения в 224 мкл буфера для образцов. Всего получали 7 рабочих разведений в диапазоне концентраций от 30 мкг/мл до 0,033 мкг/мл. Вносили по 50 мкл антител каждой концентрации к клеткам в 96-луночном планшете и инкубировали в течение 1 часа при 4°C.

[00301] PVR-Fc (Sino Biological/10109-H02H-100) конъюгировали с R-фикоэритрином с применением набора для конъюгирования антител LYNX Rapid R-PE (Bio-Rad/LNK022RPE). PVR-Fc-PE ресуспендировали в концентрации 5 мкг/мл в PBS, и 50 мкл раствора добавляли к клеткам с антителом, и инкубировали в течение 1 часа при 4°C. Клетки промывали путем добавления холодного буфера для FACS.

Данную промывку повторяли еще раз и клетки ресуспендировали в 1,6% параформальдегиде в PBS.

[00302] Связывание антител измеряли методом проточной цитометрии с применением проточного цитометра BD LSR Fortessa. Неокрашенные контрольные клетки применяли для гейтирования популяции лимфоцитов с помощью графика FSC-A относительно SSC-A и другого графика FSC-A относительно FSC-H для отбора одиночных клеток. Пробирки с клетками, окрашенными каждым отдельным антителом, использовали для расчета компенсации различных цветов, использованных в эксперименте. Для каждого образца регистрировали 50000 событий. Образцы анализировали путем последовательного гейтирования следующих популяций: FSC-A относительно SSC-A, FSC-H относительно FSC-A и SSC-A относительно PE. Рассчитывали MFI. Процент связывания рассчитывали следующим образом: $(\text{MFI (образца)} - \text{MFI (фоновая только от стрептавидина)}) / (\text{MFI (без полного связывания антитела)}) * 100$.

[00303] Как показано на фигурах 10A и 10B, BA072 (фигура 10A) и BA101 (фигура 10B) блокировали связывание PVR-Fc с CD96-экспрессирующими клетками.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих человеческий CD96, с растворимым человеческим CD155/PVR исходными антителами к CD96

[00304] В данном примере тестировали способность BA072 и BA101 блокировать связывание между человеческим CD96 и его лигандом человеческим CD155 (также называемым PVR). В частности, BA072, BA101 и изотипический контроль методом проточной цитометрии тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между человеческой изоформой 2 CD96, сверхэкспрессируемой на клетках CHO, и растворимым человеческим CD155.

[00305] Вкратце: в микропланшете готовили 4х концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела (т.е. BA072, BA101 и изотипического контроля). Антитела серийно разводили в соотношении 1 к 3 в буфере для FACS. Всего получали 11 рабочих разведений в диапазоне концентраций от 120 мкг/мл до 0,000677 мкг/мл. Затем двадцать пять микролитров каждого разведения переносили в 96-луночный микропланшет с U-образным дном, содержащий 25 мкл клеток CHO, экспрессирующих человеческий CD96, полученных

так, как описано в разделе 6.1.2. Клетки предварительно инкубировали с разведениями антител в течение 30 минут при 4°C перед добавлением лиганда CD96 так, как описано далее. В буфере для FACS получали раствор, содержащий 300 нг/мл человеческого CD155-His, конъюгированного с R-фикоэритрином (CD155-His-PE). Затем пятьдесят микролитров данного рабочего стокового раствора человеческого CD155-His-PE вносили в лунки планшета для микротитрования, содержащие клетки CHO, экспрессирующие человеческий CD96, и антитела. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали с помощью проточной цитометрии (проточным цитометром BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования на FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Для каждой концентрации антитела экспериментальные данные нормализовали с использованием значений MFI, полученных для клеток CHO, экспрессирующих человеческий CD96, инкубированных с CD155-His-PE в отсутствие антител, и значений MFI для аутофлуоресценции клеток CHO, экспрессирующих человеческий CD96 (фон), в соответствии с уравнением 1.

Уравнение 1

% максимального сигнала =

$$(\text{MFI «антитела»} - \text{MFI «фона»}) / (\text{MFI «общая»} - \text{MFI «фона»}),$$

где

«антитело» обозначает BA072 или BA101

«фон» обозначает только клетки (без антитела или CD155-His-PE)

«общая» обозначает клетки, инкубированные с CD155-His-PE в отсутствие антител

[00306] Определяли концентрацию антитела, ингибирующую 50% (IC50) связывания CD155-His-PE с клетками CHO, экспрессирующими человеческий CD96. Значения IC50 рассчитывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism

путем аппроксимации кривой с применением четырехпараметрического логистического уравнения.

[00307] Как показано на фигурах 11A и 11B, BA072 (фигура 11A) и BA101 (фигура 11B) блокировали связывание человеческого CD96 с CD155. Для каждого антитела рассчитывали средние значения IC50 и 95% доверительные интервалы, и они представлены в таблице 23.

Таблица 23. Значения IC50 для антител BA072 и BA101, блокирующих связывание изоформы 2 человеческого CD96 с человеческим CD155*

Название антитела	IC50 (среднее геометрическое), нг/мл	95% CI, нг/мл
BA072	97	56-165
BA101	317	364-382

* Рассчитано по результатам 4 экспериментов.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих человеческую изоформу 2 CD96, с растворимым человеческим CD155/PVR антителами зародышевого типа к CD96

[00308] В данном примере тестировали способность BA072, BA083 и BA084 блокировать связывание между человеческим CD96 и его лигандом человеческим CD155 (также называемым PVR). В частности, данные антитела и изотипический контроль методом проточной цитометрии тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между изоформой 2 человеческого CD96, сверхэкспрессируемой на клетках CHO, и растворимым человеческим CD155.

[00309] Вкратце: в буфере для FACS получали раствор, содержащий 200 нг/мл человеческого CD155-Fc, конъюгированного с R-фикоэритрином (CD155-Fc-PE). Затем пятьдесят микролитров данного рабочего стокового раствора человеческого CD155-Fc-PE вносили в лунки 96-луночного микропланшета с U-образным дном. В отдельном микропланшете готовили 4х концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела (т. е. BA072, BA083, BA084 и изотипического контроля). Антитела серийно разводили в соотношении 1 к 3 в буфере для FACS, начиная с 40 мкг/мл. Всего получали 11 рабочих разведений. Затем

двадцать пять микролитров каждого разведения переносили в микропланшет, содержащий 50 мкл CD155-Fc-PE. Наконец, в каждую лунку добавляли 25 мкл клеток CHO, экспрессирующих человеческий CD96 (изоформу 2), полученных так, как описано в разделе 6.1.1. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали с помощью проточной цитометрии (проточным цитометром BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования на FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и анализировали так, как описано в разделе 6.1.1.

[00310] Как показано на фигурах 12A-12C, BA072 (фигура 12A) и варианты зародышевого типа BA083 (фигура 12B) и BA084 (фигура 12C) блокировали связывание человеческого CD96 с CD155. Их соответствующие значения IC₅₀ приведены в таблице 24.

Таблица 24. Значения IC₅₀ для антител BA072, BA083 и BA084, блокирующих связывание изоформы 2 человеческого CD96 с человеческим CD155*

Название антитела	IC ₅₀ , нг/мл
BA072	235
BA083	296
BA084	271

* Рассчитано по результатам 1 эксперимента.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих человеческую изоформу 2 CD96, с растворимым человеческим CD155/PVR антителами к CD96 с созревшей аффинностью

[00311] В данном примере тестировали способность исходного антитела BA072, антитела зародышевого типа BA083 и вариантов с созревшей аффинностью BA085, BA086, BA087, BA089, BA090, BA088, BA091, BA092, BA093 и BA094 блокировать связывание между человеческим CD96 и его лигандом человеческим CD155 (также называемым PVR). В частности, данные антитела и изотипический

контроль методом проточной цитометрии тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между изоформой 2 человеческого CD96, сверхэкспрессируемой на клетках CHO, и растворимым человеческим CD155. Эксперимент имел такую же схему, которая описана в разделе 6.1.3, за исключением того, что титрование антител начинали с конечной максимальной концентрации 30 мкг/мл, а конечная концентрация CD155-Fc-PE составляла 1 мкг/мл.

[00312] Как показано на фигурах 13A-13L, антитела к CD96 BA072 (фигура 13A), BA083 (фигура 13B), BA085 (фигура 13C), BA086 (фигура 13D), BA087 (фигура 13E), BA089 (фигура 13F), BA090 (фигура 13G), BA088 (фигура 13H), BA091 (фигура 13I), BA092 (фигура 13J), BA093 (фигура 13K) и BA094 (фигура 13L) блокировали связывание человеческого CD96 с CD155. Их соответствующие значения IC₅₀ приведены в таблице 25.

Таблица 25. Значения IC₅₀ для вариантов антител с созревшей аффинностью к CD96, блокирующих связывание изоформы 2 человеческого CD96 с человеческим CD155*

Название антитела	IC ₅₀ , нг/мл
BA072	1655
BA083	1421
BA085	321
BA086	1185
BA088	84
BA087	209
BA089	1408
BA090	2244
BA091	2449
BA092	2856
BA093	998
BA094	559

* Рассчитано по результатам 1 эксперимента.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих изоформу 1 человеческого CD96, с растворимым человеческим CD155/PVR антителами к CD96 с созревшей аффинностью

[00313] В данном примере тестировали способность исходного антитела BA072, антитела зародышевого типа BA083 и вариантов с созревшей аффинностью BA073, BA074, BA078, BA079, BA080, BA081, BA076, BA077, BA082 и BA075 блокировать связывание между изоформой 1 человеческого CD96 и его лигандом человеческим CD155 (также называемым PVR). В частности, данные антитела и изотипический контроль методом проточной цитометрии тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между человеческим CD96 (изоформой 1), сверхэкспрессируемым на клетках CHO, и растворимым человеческим CD155. Эксперимент имел такую же схему, которая описана для вариантов антител зародышевого типа BA072 (раздел 6.1.3), за исключением того, что титрование антител начинали с конечной максимальной концентрации 30 мкг/мл, а конечная концентрация CD155-Fc-PE составляла 1 мкг/мл.

[00314] Как показано на фигурах 14A-14L, антитела к CD96 BA073 (фигура 14A), BA074 (фигура 14B), BA078 (фигура 14C), BA079 (фигура 14D), BA080 (фигура 14E), BA081 (фигура 14F), BA076 (фигура 14G), BA077 (фигура 14H), BA082 (фигура 14I), BA075 (фигура 14J), BA083 (фигура 14K) и BA072 (фигура 14L) блокировали связывание человеческого CD96 с CD155. Их соответствующие значения IC50 приведены в таблице 26.

Таблица 26. Значения IC50 для вариантов антител с созревшей аффинностью к CD96, блокирующих связывание изоформы 1 человеческого CD96 с человеческим CD155*

Название антитела	IC50 (среднее геометрическое), нг/мл
BA073	111,86
BA074	153,17
BA078	124,24
BA079	135,54

Название антитела	IC50 (среднее геометрическое), нг/мл
BA080	150,74
BA081	132,33
BA076	135,82
BA077	127,3
BA082	144,32
BA075	172,05
BA083	136,65
BA072	141

* Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих человеческую изоформу 2 CD96, с растворимым человеческим CD155/PVR антителами к CD96 с созревшей аффинностью

[00315] В данном примере тестировали способность исходного антитела BA072, антитела зародышевого типа BA083 и вариантов с созревшей аффинностью BA073, BA074, BA078, BA079, BA080, BA081, BA076, BA077, BA082, и BA075 блокировать связывание между изоформой 2 человеческого CD96 и его лигандом человеческим CD155 (также называемым PVR). В частности, данные антитела и изотипический контроль методом проточной цитометрии тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между человеческим CD96 (изоформой 2), сверхэкспрессируемым на клетках CHO, и растворимым человеческим CD155. Эксперимент имел такую же схему, которая описана для вариантов антител зародышевого типа BA072 (раздел 6.1.3), за исключением того, что титрование антител начинали с конечной максимальной концентрации 30 мкг/мл, а конечная концентрация CD155-Fc-PE составляла 1 мкг/мл.

[00316] Как показано на фигурах 15A-15L, антитела к CD96 BA073 (фигура 15A), BA074 (фигура 15B), BA078 (фигура 15C), BA079 (фигура 15D), BA080 (фигура 15E), BA081 (фигура 15F), BA076 (фигура 15G), BA077 (фигура 15H), BA082 (фигура 15I), BA075 (фигура 15J), BA083 (фигура 15K) и BA072 (фигура 15L)

блокировали связывание человеческого CD96 с CD155. Их соответствующие значения IC50 приведены в таблице 27.

Таблица 27. Значения IC50 для вариантов антител с созревшей аффинностью к CD96, блокирующих связывание изоформы 2 человеческого CD96 с человеческим CD155*

Название антитела	IC50 (среднее геометрическое), нг/мл
BA073	155
BA074	142
BA078	134
BA079	123
BA080	195
BA081	173
BA076	157
BA077	106
BA082	193
BA075	230
BA083	176
BA072	165

* Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих человеческую изоформу 2 CD96, с растворимым человеческим CD155/PVR антителами зародышевого типа к CD96

[00317] В данном примере тестировали способность BA101 и вариантов зародышевого типа BA102, BA103, BA104, BA105 и BA106 блокировать связывание между изоформой 2 человеческого CD96 и его лигандом человеческим CD155 (также называемым PVR). В частности, данные антитела и изотипический контроль тестировали методом проточной цитометрии *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между человеческим CD96 (изоформой 2), сверхэкспрессированным на клетках CHO, и растворимым человеческим CD155, как

описано выше для вариантов антител зародышевого типа BA072 (раздел 6.1.3), за исключением того, что титрование антител начинали с конечной максимальной концентрации 30 мкг/мл.

[00318] Как показано на фигурах 16A-16F, антитела к CD96 BA101 (фигура 16A), BA102 (фигура 16B), BA103 (фигура 16C), BA104 (фигура 16D), BA105 (фигура 16E) и BA106 (фигура 16F) блокировали связывание человеческого CD96 с CD155. Их соответствующие значения IC₅₀ приведены в таблице 28.

Таблица 28. Значения IC₅₀ для антител BA101, BA102, BA103, BA104, BA105 и BA106, блокирующих связывание человеческого CD96 с человеческим CD155*

Название антитела	IC ₅₀ , нг/мл
BA101	1421
BA102	1383
BA103	1379
BA104	1488
BA105	1499
BA106	1571

* Рассчитано по результатам 1 эксперимента.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих человеческую изоформу 2 CD96, с растворимым человеческим CD155/PVR антителом зародышевого типа к CD96

[00319] В данном примере тестировали способность BA101 и варианта BA107 блокировать связывание между человеческим CD96 и его лигандом человеческим CD155 (также называемым PVR). В частности, данные антитела и изотипический контроль методом проточной цитометрии тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между изоформой 2 человеческого CD96, сверхэкспрессируемой на клетках CHO, и растворимым человеческим CD155. Эксперимент имел такую же схему, которая описана для вариантов антител зародышевого типа BA072 (раздел 6.1.3), за исключением того, что титрование антител начинали с конечной максимальной концентрации 15 мкг/мл.

[00320] Как показано на фигурах 17А и 17В, антитела ВА101 (фигура 17А) и ВА107 (фигура 17В) блокировали связывание человеческого CD96 с CD155. Их соответствующие значения IC50 приведены в таблице 29.

Таблица 29. Значения IC50 для антител ВА101 и АВ107, блокирующих связывание человеческого CD96 с человеческим CD155*

Название антитела	IC50, нг/мл
ВА101	1419
ВА107	2302

* Рассчитано по результатам 1 эксперимента.

Блокирование связывания клеток СНО, экспрессирующих изоформу 2 CD96 яванского макака, с растворимым человеческим CD155/PVR антителами зародышевого типа к CD96

[00321] В данном примере тестировали способность ВА072 и вариантов зародышевого типа ВА083 и ВА084 блокировать связывание между изоформой 2 CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 133) и человеческим CD155 (также называемым PVR). В частности, данные антитела и изотипический контроль методом проточной цитометрии тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между изоформой 2 CD96 яванского макака, сверхэкспрессируемой на клетках СНО, и растворимым человеческим CD155.

[00322] Вкратце: в буфере для FACS получали раствор, содержащий 200 нг/мл человеческого CD155-Fc, конъюгированного с R-фикоэритрином (CD155-Fc-PE). Затем пятьдесят микролитров данного рабочего стокового раствора человеческого CD155-Fc-PE вносили в лунки 96-луночного микропланшета с U-образным дном. В отдельном микропланшете готовили 4х концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела (т. е. ВА072, ВА083, ВА084 и изотипического контроля). Антитела серийно разводили в соотношении 1 к 3 в буфере для FACS, начиная с 30 мкг/мл. Всего получали 11 рабочих разведений. Затем двадцать пять микролитров каждого разведения переносили в микропланшет, содержащий 50 мкл CD155-Fc-PE. Наконец, в каждую лунку добавляли 25 мкл клеток СНО, экспрессирующих изоформу 2 CD96 яванского макака, полученных так, как описано в разделе 6.1.2. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды

промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали с помощью проточной цитометрии (проточным цитометром BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования на FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и анализировали так, как описано в разделе 6.1.2.

[00323] Как показано на фигурах 18A-18C, BA072 (фигура 18A) и варианты зародышевого типа BA083 (фигура 18B) и BA084 (фигура 18C) блокировали связывание изоформы 2 CD96 яванского макака с CD155. Их соответствующие значения IC₅₀ приведены в таблице 30.

Таблица 30. Значения IC₅₀ для антител BA072, BA083 и BA084, блокирующих связывание изоформы 2 CD96 яванского макака с человеческим CD155*

Название антитела	IC ₅₀ , нг/мл
BA072	425
BA083	611
BA084	459

* Рассчитано по результатам 1 эксперимента.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих изоформу 2 CD96 яванского макака, с растворимым человеческим CD155/PVR антителами с созревшей аффинностью к CD96

[00324] В данном примере тестировали способность исходного антитела BA072, антитела зародышевого типа BA083 и вариантов с созревшей аффинностью BA085, BA086, BA088, BA087, BA089, BA090, BA091, BA092, BA093 и BA094 блокировать связывание между изоформой 2 CD96 яванского макака и человеческим CD155 (также называемым PVR). В частности, данные антитела и изотипический контроль методом проточной цитометрии тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между изоформой 2 CD96 яванского макака, сверхэкспрессируемой на клетках CHO, и растворимым человеческим CD155. Эксперимент имел такую же схему, которая описана для вариантов антител зародышевого типа BA072 (раздел 6.1.3), за исключением того, что титрование

антител начинали с конечной максимальной концентрации 30 мкг/мл, а конечная концентрация CD155-Fc-PE составляла 1 мкг/мл.

[00325] Как показано на фигурах 19A-19L, антитела к CD96 BA072 (фигура 19A), BA083 (фигура 19B), BA085 (фигура 19C), BA086 (фигура 19D), BA088 (фигура 19E), BA087 (фигура 19F), BA089 (фигура 19G), BA090 (фигура 19H), BA091 (фигура 19I), BA092 (фигура 19J), BA093 (фигура 19K) и BA094 (фигура 19L) блокировали связывание изоформы 2 CD96 яванского макака с CD155. Их соответствующие значения IC50 приведены в таблице 31.

Таблица 31. Значения IC50 для вариантов антител с созревшей аффинностью к CD96, блокирующих связывание изоформы 2 CD96 яванского макака с человеческим CD155*

Название антитела	IC50, нг/мл
BA072	645
BA083	821
BA085	537
BA086	378
BA088	390
BA087	451
BA089	401
BA090	941
BA091	886
BA092	1725
BA093	347
BA094	238

* Рассчитано по результатам 1 эксперимента.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих изоформу 1 CD96 яванского макака, с растворимым человеческим CD155/PVR

[00326] В данном примере тестировали способность исходного антитела BA072, антитела зародышевого типа BA083 и вариантов с созревшей аффинностью BA074, BA078, BA079, BA080, BA081, BA076, BA077, BA082, BA075 и BA072 блокировать связывание между изоформой 1 CD96 яванского макака и человеческим

CD155 (также называемым PVR). В частности, данные антитела и изотипический контроль методом проточной цитометрии тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между изоформой 1 яванского макака CD96, сверхэкспрессируемой на клетках CHO, и растворимым человеческим CD155. Эксперимент имел такую же схему, которая описана для вариантов антител зародышевого типа BA072 (раздел 6.1.3), за исключением того, что титрование антител начинали с конечной максимальной концентрации 30 мкг/мл, а конечная концентрация CD155-Fc-PE составляла 1 мкг/мл.

[00327] Как показано на фигурах 20A-20L, антитела к CD96 BA073 (фигура 20A), BA074 (фигура 20B), BA078 (фигура 20C), BA079 (фигура 20D), BA080 (фигура 20E), BA081 (фигура 20F), BA076 (фигура 20G), BA077 (фигура 20H), BA082 (фигура 20I), BA075 (фигура 20J), BA083 (фигура 20K) и BA072 (фигура 20L) блокировали связывание человеческого CD96 с CD155. Их соответствующие значения IC₅₀ приведены в таблице 32.

Таблица 32. Значения IC₅₀ для вариантов антител с созревшей аффинностью к CD96, блокирующих связывание изоформы 1 CD96 яванского макака с человеческим CD155*

Название антитела	IC ₅₀ (среднее геометрическое), нг/мл
BA073	74
BA074	74
BA078	62
BA079	54
BA080	96
BA081	121
BA076	N/A
BA077	N/A
BA082	99
BA075	142
BA083	298

Название антитела	IC50 (среднее геометрическое), нг/мл
BA072	365

* Рассчитано по результатам 2 экспериментов, за исключением BA074, которое было рассчитано по результатам 1 эксперимента.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих изоформу 2 CD96 яванского макака, с растворимым человеческим CD155/PVR

[00328] В данном примере тестировали способность исходного антитела BA072, антитела зародышевого типа BA083 и вариантов с созревшей аффинностью BA073, BA074, BA078, BA079, BA080, BA081, BA076, BA077, BA082 и BA075 блокировать связывание между изоформой 2 CD96 яванского макака и человеческим CD155 (также называемым PVR). В частности, данные антитела и изотипический контроль методом проточной цитометрии тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между изоформой 2 CD96 яванского макака, сверхэкспрессируемой на клетках CHO, и растворимым человеческим CD155. Эксперимент имел такую же схему, которая описана для вариантов антител зародышевого типа BA072 (раздел 6.1.3), за исключением того, что титрование антител начинали с конечной максимальной концентрации 30 мкг/мл, а конечная концентрация CD155-Fc-PE составляла 1 мкг/мл.

[00329] Как показано на фигурах 21A-21L, антитела к CD96 BA073 (фигура 21A), BA074 (фигура 21B), BA078 (фигура 21C), BA079 (фигура 21D), BA080 (фигура 21E), BA081 (фигура 21F), BA076 (фигура 21G), BA077 (фигура 21H), BA082 (фигура 21I), BA075 (фигура 21J), BA083 (фигура 21K) или BA072 (фигура 21L) полностью или частично блокировали связывание человеческого CD96 с CD155. Их соответствующие значения IC50 приведены в таблице 33.

Таблица 33. Значения IC50 для вариантов антител с созревшей аффинностью к CD96, блокирующих связывание изоформы 2 CD96 яванского макака с человеческим CD155*

Название антитела	IC50 (среднее геометрическое), нг/мл
BA073	102

Название антитела	IC50 (среднее геометрическое), нг/мл
BA074	93
BA078	55
BA079	54
BA080	44
BA081	26
BA076	N/A
BA077	N/A
BA082	66
BA075	135
BA083	97
BA072	123

* Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Антитела к CD96 блокируют связывание клеток, экспрессирующих CD155/PVR, с клетками, экспрессирующими CD96

[00330] Клетки CHO, экспрессирующие CD96, и клетки CHO, экспрессирующие PVR, дважды промывали с помощью PBS и центрифугировали при 1200 об./мин. в течение пяти минут. Удаляли 20 мкл и добавляли к 380 мкл красителя для определения жизнеспособности для подсчета клеток и проверки жизнеспособности с применением прибора Muse. Образцы центрифугировали при 1200 об./мин. в течение пяти минут, а затем суспендировали до конечной концентрации 1×10^7 клеток/мл с помощью разбавителя С либо из набора PKN26 Cell Linker Kit (Sigma/PKN26GL), либо из набора PKN67 Cell Linker Kit (Sigma/PKN67GL). Получали 4 мкл красного красителя PKN26 в 1 мл разбавителя С и добавляли к 1 мл ресуспендированных PVR-экспрессирующих клеток CHO, а также получали 4 мкл зеленого красителя PKN67 в 1 мл разбавителя С и добавляли к 1 мл ресуспендированных CD96-экспрессирующих клеток CHO. Клетки инкубировали с красителем при комнатной температуре в течение пяти минут.

[00331] В каждую пробирку с мечеными клетками добавляли по 10 мл среды PowerCHO и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 минуты. Клетки центрифугировали при 1200 об./мин. в течение пяти минут и дважды промывали посредством 10 мл среды PowerCHO.

[00332] Меченые клетки ресуспендировали в 1 мл HBSS с добавлением 10% термоинактивированной FBS и 1% буфера HEPES и ресуспендировали в количестве 8×10^5 клеток/мл. В каждую лунку 96-луночного круглодонного планшета вносили 25 мкл меченых клеток CHO, экспрессирующих CD96.

[00333] Получали каждое антитело (т.е. BA072, BA101, их варианты зародышевой линии или изотипический контроль IgG1) в 30 мкг/мл в буфере для FACS. Затем антитела титровали трехкратными разведениями путем внесения пипеткой 112 мкл предыдущего разведения в 224 мкл буфера для образцов с концентрацией от 30 мкг/мл до 0,1 мкг/мл. Вносили по 25 мкл антител каждой концентрации к клеткам в 96-луночном планшете и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Без промывки между этапами в каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 25 мкл меченых PVR-экспрессирующих клеток CHO, всего 75 мкл на лунку, и инкубировали в течение 45 минут при 37°C и 5% CO₂.

[00334] Образование конъюгатов сразу измеряли методом проточной цитометрии с применением проточного цитометра BD LSR Fortessa. Пробирки с клетками, окрашенными каждым красителем, использовали для расчета компенсации клеток, меченных красным PKH26 (канал PE), и клеток, меченных зеленым PKH67 (канал FITC). Для каждого образца регистрировали 50000 событий. Образцы анализировали путем последовательного гейтирования следующих популяций: FSC-A относительно SSC-A и FITC относительно PE. Как показано на фигуре 22C, если блокирование не происходит, конъюгаты появляются в квадранте Q2 графика рассеяния. При наличии блокирующего антитела конъюгаты не могут образовываться, и конъюгаты не обнаруживаются в квадранте Q2 графика рассеивания. Процент конъюгирования рассчитывали и наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

[00335] Как показано на фигурах 22A и 22B, BA072 и BA101 блокировали связывание PVR-экспрессирующих клеток с CD96-экспрессирующими клетками

(образование конъюгата) дозозависимым образом. Как показано на фигуре 23, BA072, BA083 и BA084 блокировали связывание PVR-экспрессирующих клеток с CD96-экспрессирующими клетками дозозависимым образом. Как показано на фигуре 24, BA101, BA102, BA103, BA104, BA105 и BA106 блокировали связывание PVR-экспрессирующих клеток с CD96-экспрессирующими клетками.

6.2 Пример 2. Функциональность антител к CD96 и варианты комбинированного лечения

6.2.1 Антитела к CD96 усиливают секрецию цитокинов T_H1 первичными клетками

Антитела к CD96 усиливают секрецию IL-2 простимулированными PBMC дозозависимым образом

[00336] В 1,2-мл конусообразных пробирках получали диапазон доз антител к CD96 (BA072 и BA101) и антитела изотипического контроля в 4х концентрациях. Сначала получали 600 мкл 200 мкг/мл (конечная концентрация 50 мкг/мл) каждого антитела в среде R10. Затем антитела титровали 10-кратными разведениями от конечной концентрации 50 мкг/мл до 0,5 нг/мл. В 96-луночный круглодонный планшет в соответствующие лунки пипеткой вносили по 25 мкл каждого антитела к CD96 или изотипического контрольного антитела.

[00337] Антитело к PD-1 с соответствующим изотипическим контролем получали в 4х конечной концентрации 20 мкг/мл (конечная концентрация 5 мкг/мл) в среде R10. В соответствующие лунки с ранее подготовленными антителами вносили по 25 мкл антитела к PD-1 или изотипического контроля. Замороженные аликвоты человеческих PBMC извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде с температурой 37°C до тех пор, пока не наблюдалось появление плавающего льда. Клетки переносили в 10 мл предварительно подогретой среды R10 и сразу центрифугировали при 1200 об./мин. в течение пяти минут. Для подсчета клеток и проверки жизнеспособности забирали 20 мкл образца и добавляли к 380 мкл красителя для определения жизнеспособности, перемешивали и считывали с помощью прибора Muse.

[00338] Образцы центрифугировали при 1200 об./мин. в течение пяти минут и ресуспендировали до концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде R10.

Промежуточную концентрацию SEA в стоковом растворе получали путем добавления 1 мкл 1000 мкг/мл SEA к 99 мкл R10 с получением промежуточной концентрации 10 мкг/мл. Для стимуляции клеток к клеткам, подготовленным так, как описано выше, добавляли 2х конечную концентрацию 2 нг/мл (конечная концентрация 1 нг/мл) SEA. В соответствующие лунки с антителами вносили по 50 мкл смеси клеток ($0,1 \times 10^6$ клеток/лунка) и SEA и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ во влажной камере в течение четырех дней.

[00339] После четырех дней инкубации планшеты удаляли из инкубатора. Затем планшеты центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин. Для анализа цитокинов переносили 5 мкл супернатанта в 384-луночный планшет AlphaLISA. Для измерения секреции IL-2 применяли наборы AlphaLISA (Perkin Elmer). Вкратце: буфер для анализа готовили путем внесения пипеткой 2,5 мл 10-кратного буфера для иммуноанализа AlphaLISA в 22,5 мл воды. Для получения стандартного разведения использовали аналит человеческого IL-2. В буфере для анализа получали смесь 1,6х акцепторных микроносителей AlphaLISA с антителом к IL-2 и биотинилированного антитела к IL-2. В каждую лунку вносили по 8 мкл и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. В буфере для анализа получали 2,3х промежуточный стоковый раствор донорных микроносителей со стрептавидином. В каждую лунку вносили по 10 мкл и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. На планшет-ридере EnVision измеряли относительные световые единицы (RLU) с применением протокола AlphaScreen. Результаты наносили на график в GraphPad Prism и проводили статистический анализ с применением непарного t-критерия.

[00340] Как показано на фигурах 25A-25H, BA072 или BA101 усиливали секрецию IL-2 по сравнению с изотипическим контролем в среднем как без антитела к PD-1, так и с антителом к PD-1. Данный ответ обычно имел дозозависимый характер. На фигурах 25A-25D представлены результаты первого эксперимента с первым донором, а на фигурах 25E-25H представлены результаты второго эксперимента со вторым донором.

Антитела к CD96 с созревшей аффинностью к CD96 усиливают секрецию IL-2 простимулированными PBMC

[00341] В данном примере эксперимент проводили в соответствии с процедурой, описанной в данном разделе выше, со следующими изменениями. Антитела (BA072, его варианты с созревшей аффинностью или антитело изотипического контроля IgG1) получали в 1,2-мл конусообразных пробирках при 4х концентрации 0,2 мкг/мл (конечная концентрация 0,05 мкг/мл) и по 25 мкл каждого антитела вносили в соответствующие лунки 96-луночного планшета.

[00342] Как показано на фигурах 26A-26F, BA083, BA073, BA080 и BA076 с антителом к PD-1 и без него приводили к увеличению секреции IL-2 у всех доноров по сравнению с изотипическим контролем. На фигурах 26A и 26B представлены результаты одного эксперимента без антитела к PD-1 (фигура 26A) и с антителом к PD-1 (фигура 26B). На фигурах 26C и 26D представлены результаты второго эксперимента с другим донором без антитела к PD-1 (фигура 26C) и с антителом к PD-1 (фигура 26D). На фигурах 26E и 26F представлены результаты третьего эксперимента с другим донором без антитела к PD-1 (фигура 26E) и с антителом к PD-1 (фигура 26F).

[00343] Как показано на фигурах 27A-27F, BA072, BA074, BA079, BA081, BA077, BA082 и BA075 усиливали секрецию IL-2 по сравнению с изотипическим контролем в среднем как без антитела к PD-1, так и с антителом к PD-1. На фигурах 27A и 27B представлены результаты одного эксперимента без антитела к PD-1 (фигура 27A) и с антителом к PD-1 (фигура 27B). На фигурах 27C и 27D представлены результаты второго эксперимента с другим донором без антитела к PD-1 (фигура 27C) и с антителом к PD-1 (фигура 27D). На фигурах 27E и 27F представлены результаты третьего эксперимента с другим донором без антитела к PD-1 (фигура 27E) и с антителом к PD-1 (фигура 27F).

6.2.2 Антитело к CD96 блокирует CD96 и усиливает передачу сигналов TCR-NFAT и NFκB в анализе с репортерными Т-клетками с человеческим CD96

Блокировка CD96 на NFAT-Luc и NFκB-Luc клетках Jurkat

[00344] Клетки Jurkat, сконструированные в собственной лаборатории для экспрессии CD96 и либо NFAT-люциферазы, либо NFκB-люциферазы,

культивировали в среде R10 с 1 мкг/мл пуромицина. Данные репортерные клетки Jurkat центрифугировали при 1200 об./мин. в течение пяти минут и ресуспендировали в среде R10 в количестве 1×10^6 клеток/мл. Антитело к CD28 (BD Biosciences/347698) добавляли только к репортерным клеткам Jurkat с NFκB-люциферазой в 4х конечной концентрации 2 мкг/мл (конечная концентрация 0,5 мкг/мл). В соответствующие лунки с клетками CHO и антителами на аналитическом планшете вносили по 25 мкл репортерных клеток (не вместе) и инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO₂.

[00345] В данном примере тестировали способность растворимого BA072 блокировать связывание между репортерными клетками, экспрессирующими CD96, и клетками, экспрессирующими PVR, и усиливать передачу сигналов Т-клеточного рецептора (TCR) через NFAT и NFκB.

[00346] Отсортированные и клональные клетки CHO, сконструированные в собственной лаборатории для экспрессии высоких уровней PVR, и антитело к CD3 (клон ОКТ3) ресуспендировали в среде R10 в концентрации 5×10^5 клеток/мл. 50 мкл клеток ($2,5 \times 10^4$ клеток) высевали на белый 96-луночный плоскодонный аналитический планшет и инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO₂ до их прикрепления.

[00347] BA072 и антитело изотипического контроля IgG1 получали в 4х конечной концентрации 40 мкг/мл (конечная концентрация 10 мкг/мл) в среде R10 и титровали трехкратными разведениями путем переноса пипеткой 112 мкл предыдущего разведения в 224 мкл буфера для образца. После 4-часовой инкубации 25 мкл каждой концентрации антител вносили в соответствующие лунки с прикрепившимися клетками CHO в аналитическом планшете.

[00348] Через 4 часа планшеты уравнивали до комнатной температуры в течение 15 минут, а затем вносили по 100 мкл реагента для люциферазного анализа Nano-Glo (Promega/N1120) на лунку. Затем смеси инкубировали при комнатной температуре в течение пяти минут и измеряли люминесценцию с помощью планшет-ридера (Envision). RLU рассчитывали следующим образом: $RLU_{(индуцированный)} - RLU_{(фоновый)}$. Дельта RLU рассчитывали следующим образом: $RLU (BA072) - RLU (изотипического контроля)$ и наносили на

график с помощью GraphPad Prism.

[00349] Как показано на фигурах 28А и 28В, ВА072 увеличивало передачу сигналов как TCR-NFAT (фигура 28А), так и NFκB (фигура 28В) по сравнению с изотипическим контролем в экспрессирующих человеческий CD96 репортерных клетках Jurkat (фигура 28С).

[00350] В схожем эксперименте исследовали влияние экспрессии CD266 на индуцированную посредством CD96 передачу сигналов. Эксперимент проводили так, как описано выше для фигур 28А-28С; однако применяемыми репортерными клетками были клетки Jurkat, сконструированные в собственной лаборатории для экспрессии CD96 и NFAT-люциферазы (фигура 29А), или клетки Jurkat, сконструированные в собственной лаборатории для экспрессии CD96 и NFAT-люциферазы с нокаутом по CD226 (фигура 29В). Как показано на фигурах 29А и 29В, ВА072 увеличивало TCR-NFAT по сравнению с изотипическим контролем, что демонстрировало, что данный эффект не зависел от экспрессии CD226.

6.3 Пример 3. Fc-варианты антител к CD96

[00351] В данном примере анализировали влияние взаимодействия Fc-области/FcγR на связывание и функциональную активность ВА072. В частности, VH-область ВА072 экспрессировали с различными остовами Fc, как показано в таблице 34.

Таблица 34. Fc-варианты ВА072

Название антитела	Описание антитела (пронумеровано в соответствии с системой нумерации EU)	Тяжелая цепь, SEQ ID NO:	Легкая цепь, SEQ ID NO:
BA072	IgG1	76	102
BA108	N297A вариант BA072	116	102
BA109	S239D/A330L/I332E вариант BA072	118	102
BA110	S267E/L328F вариант BA072	120	102

[00352] Затем данные Fc-варианты BA072 тестировали в функциональных анализах, как описано ниже.

6.3.1 Fc-варианты BA072 усиливали цитолиз CD96⁺ клеток Jurkat при совместном культивировании с CD16⁺ NK-клетками

[00353] Fc-варианты BA072 исследовали в отношении их способности индуцировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) в совместной культуре CD96-экспрессирующих клеток Jurkat и CD16-экспрессирующих натуральных киллеров (NK-клеток). Вкратце: клетки Jurkat культивировали в среде RPMI 1640 (Corning, кат. № 10-040-CM), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Benchmark кат. № 100-106, партия A69E00F) и 1% смесью глутамина, пенициллина и стрептомицина (Gibco, кат. № 10378-016). NK-клетки культивировали в среде RPMI 1640 (Corning, кат. № 10-040-CM), дополненной 5% человеческой сывороткой (Sigma, кат. № H4522), 1% смесью глутамина, пенициллина и стрептомицина (Gibco, кат. № 10378-016), 100 ед./мл IL-2 (R&D Systems, кат. № 202-16) и 100 ед./мл IL-15 (R&D Systems, кат. № 247-ILB). Два миллиона клеток Jurkat осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 1200 об./мин. Клетки окрашивали путем ресуспендирования осадка в 1 мл 0,5 мкМ красителя CellTrace Far Red (Invitrogen, кат. № C34565) в PBS (Corning, кат. № 21-040-CV) и инкубирования в течение 30 минут при 37°C и в 5% атмосфере CO₂. После инкубирования добавляли 9 мл PBS и клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 300g. Затем клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде Jurkat, содержащей 1 мкМ реагента для выявления CellEvent Caspase-3/7 Green (Invitrogen, кат. № C10423). Антитела разводили в среде для культивирования NK-клеток в трехкратной от их конечной концентрации. Окрашенные клетки Jurkat разводили до 0,625 миллиона клеток на мл и NK-клетки разводили до 0,625 миллиона клеток на мл. Анализ проводили в 384-луночных планшетах для микроскопии (Greiner, кат. № 781936) путем внесения пипеткой 20 мкл антител, 20 мкл окрашенных клеток Jurkat (12500 клеток) и 20 мкл NK-клеток (12500 клеток) на лунку.

[00354] Сразу после этого проводили визуализацию в режиме реального времени с применением конфокального микроскопа для большого количества клеток

ImageXpress Micro (Molecular Devices) при контроле окружающей среды (37°C, 5% CO₂) и в течение четырех часов каждые 30 минут получали изображения с каналов Cy5 (CellTrace Far Red) и FITC (каспаза 3/7) для клеток Jurkat и положительных по каспазе 3/7 клеток Jurkat соответственно. Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения для анализа MetaXpress (Molecular Devices). Клетки Jurkat идентифицировали по каналу Cy5, а величину сигнала от каспазы 3/7 количественно оценивали на клетку по каналу FITC. Клетки с интенсивностью сигнала каспазы 3/7 выше фонового обозначали как апоптотические. Для определения результата измерения процента цитолиза количество апоптотических клеток нормализовали по отношению к общему количеству клеток в каждом состоянии.

[00355] Как показано на фигурах 30A-30C, Fc-усиленное BA072 (BA109) (фигура 30B) стимулировало цитолиз CD96-экспрессирующих клеток Jurkat в большей степени, чем BA072 (фигура 30A), и подвергнутая сайленсингу Fc-мутация N297A у BA072 (BA108) (фигура 30C), и изотипический контроль.

6.3.2 Передача сигнала с участием Fc-варианта антитела к CD96 через FcγRIIIA

[00356] В другом примере тестировали способность Fc-вариантов BA072 активировать репортерные клетки, экспрессирующие FcγRIIIA^{V158}.

[00357] 25 мкл целевых клеток (т. е. клеток Jurkat, сконструированных в собственной лаборатории для экспрессии высоких уровней человеческого CD96, описанных в разделе 6.1.2) вносили в лунки планшета для анализа ADCC (1,5×10⁶ клеток/мл). Получали трехкратные серийные разведения антитела (т. е. BA072, его Fc-вариантов или соответствующих изотипических контролей) при 3х конечной концентрации в диапазоне от 30 мкг/мл до 0,0003 мкг/мл (с диапазоном конечной концентрации от 10 мкг/мл до 0,0001 мкг) в RPMI-1640, дополненной 4% FBS с низким содержанием IgG (Promega/G711A) (буфер для анализа ADCC). В лунки аналитического планшета, содержащие целевые клетки, вносили 25 мкл 3х разведений антител. Эффекторные клетки (т. е. репортерные клетки Jurkat с NFAT-люциферазой, сверхэкспрессирующие CD16A FcγRIIIA с высокоаффинным полиморфизмом 158 V/V, в культуре менее шести недель; Promega/G7102) ресуспендировали в количестве 6×10⁶ клеток/мл в буфере для анализа ADCC и в каждую лунку аналитического планшета вносили 25 мкл (150000 клеток/лунка).

Затем аналитический планшет инкубировали в течение 20 часов при 37°C и 5% CO₂. Связывание комплекса антитело/антиген на поверхности целевых клеток с CD16A на поверхности эффекторных клеток должно приводить к передаче сигнала репортерной конструкции и экспрессии люциферазы.

[00358] На следующий день планшеты уравнивали до комнатной температуры в течение 15 минут, а затем вносили по 75 мкл реагента для люциферазного анализа Bio-Glo (Promega/G7940) на лунку. Затем смеси инкубировали при комнатной температуре в течение 5-10 минут и измеряли люминесценцию с помощью планшет-ридера (Envision). RLU рассчитывали следующим образом: $RLU_{\text{(индуцированный)}} - RLU_{\text{(фоновый)}}$.

[00359] Как показано на фигурах 31A-31C, что касается связывания с FcγRIIIA и передачи сигнала, BA072 (фигура 31A), BA108 (фигура 31C) и изотипические контроли не демонстрировали передачи сигнала, тогда как в случае BA109 (фигура 31B) демонстрировало передачу сигнала через FcγRIIIA.

6.3.3 Т-клеточный ответ на Fc-варианты антитела к CD96

[00360] В данном примере тестировали способность Fc-вариантов BA072 вызывать Т-клеточный ответ в анализе совместной культуры первичных Т-клеток: APC.

[00361] В 1,2-мл конусообразных пробирках получали диапазон доз антител к CD96 BA072 (IgG1) и BA108 (подвергнутый сайленсингу Fc-вариант BA072), а также антитела изотипического контроля в 2х концентрациях. Сначала получали 600 мкл 100 мкг/мл (конечная концентрация 50 мкг/мл) каждого антитела в среде R10. Затем антитела титровали 10-кратными разведениями от конечной концентрации 50 мкг/мл до 0,05 нг/мл. В 96-луночный круглодонный планшет в соответствующие лунки пипеткой вносили по 50 мкл каждого антитела к CD96 или изотипического контрольного антитела.

[00362] Замороженные аликвоты человеческих PBMC извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде с температурой 37°C до тех пор, пока не наблюдалось появление плавающего льда. Затем клетки переносили в 10 мл предварительно нагретой среды R10 и сразу центрифугировали при 1200 об./мин. в течение 5 минут. Забирали 20 мкл каждого образца и добавляли к 380 мкл красителя

для определения жизнеспособности для подсчета клеток и проверки жизнеспособности с применением прибора Muse.

[00363] Образцы центрифугировали при 1200 об./мин. в течение 5 минут и ресуспендировали до концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде R10. Промежуточную концентрацию SEA в стоковом растворе получали путем добавления 1 мкл 1000 мкг/мл SEA к 99 мкл R10 с получением промежуточной концентрации 10 мкг/мл. Для стимуляции клеток к клеткам, подготовленным так, как описано выше, добавляли 1 нг/мл SEA. В соответствующие лунки с антителами вносили по 50 мкл смеси клеток ($0,1 \times 10^6$ клеток/лунка) и SEA и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ во влажной камере в течение 4 дней.

[00364] После четырех дней инкубации планшеты удаляли из инкубатора. Затем планшеты центрифугировали в течение 2 минут при 2000 об./мин. Для анализа цитокинов переносили 5 мкл супернатанта в 384-луночный планшет AlphaLISA. Для измерения секреции IL-2 применяли наборы AlphaLISA (Perkin Elmer). Вкратце: буфер для анализа готовили путем внесения пипеткой 2,5 мл 10-кратного буфера для иммуноанализа AlphaLISA в 22,5 мл воды. Для получения стандартного разведения использовали аналит человеческого IL-2. В буфере для анализа получали смесь 1,6х акцепторных микроносителей AlphaLISA с антителом к IL-2 и биотинилированного антитела к IL-2. В каждую лунку вносили по 8 мкл и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. В буфере для анализа получали 2,3х промежуточный стоковый раствор донорных микроносителей со стрептавидином. В каждую лунку вносили по 10 мкл и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. На планшет-ридере EnVision измеряли относительные световые единицы (RLU) с применением протокола AlphaScreen. Результаты наносили на график в GraphPad Prism и проводили статистический анализ с применением непарного t-критерия.

[00365] Как показано на фигурах 32A и 32B, BA072 вызывал усиленную секрецию IL-2 по сравнению с изотипическим контролем в образцах PBMC как от донора 1, так и от донора 2. Данный ответ обычно имел дозозависимый характер. Секреция IL-2, вызванная BA108, была сравнима с таковой у изотипического

контроля.

6.4 Пример 4. Интернализация CD96

6.4.1 Интернализация CD96 у CD96-экспрессирующих клеток Jurkat

[00366] Варианты BA072 исследовали в отношении их способности индуцировать антителозависимую интернализацию CD96 на CD96-экспрессирующих клетках Jurkat. Вкратце: клетки Jurkat культивировали в среде RPMI 1640 (Corning, кат. № 10-040-CM), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Benchmark кат. № 100-106, партия A69E00F) и 1% смесью глутамина, пенициллина и стрептомицина (Gibco, кат. № 10378-016). Два миллиона клеток Jurkat осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 1200 об./мин. Клетки окрашивали путем ресуспендирования осадка в 1 мл 0,5 мкМ красителя CellTrace Far Red (Invitrogen, кат. № C34565) и 1:500 разведении HaloTag Ligand AF488 (Promega, кат. № G100A) в PBS (Corning, кат. № 21-040-CV) и инкубирования в течение 15 минут при 37°C и 5% CO₂. После инкубирования добавляли 9 мл PBS и клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 300g. Затем клеточный осадок ресуспендировали в среде для культивирования Jurkat. Антитела разводили в культуральной среде в 2X от их конечной концентрации (10 мкг/мл). Окрашенные клетки Jurkat разводили до 0,4 миллиона клеток на мл. Анализ проводили в 384-луночных планшетах для микроскопии (Greiner, кат. № 781936) путем внесения пипеткой 30 мкл антител и 30 мкл окрашенных клеток Jurkat (12500 клеток) на лунку.

[00367] Сразу после этого проводили визуализацию в режиме реального времени с применением конфокального микроскопа для большого количества клеток ImageXpress Micro (Molecular Devices) при контроле окружающей среды (37°C, 5% CO₂) и в течение восьми часов каждый час получали изображения с каналов Cy5 (CellTrace Far Red) и FITC (HaloTag Ligand) для клеток Jurkat. Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения для анализа MetaXpress (Molecular Devices). Клетки Jurkat идентифицировали по каналу Cy5, а величину сигнала от HaloTag Ligand количественно оценивали на клетку по каналу FITC. Клетки с интенсивностью сигнала HaloTag Ligand выше фонового обозначали как подвергнутые интернализации. Для определения результата измерения процента

интернализации количество подвергнутых интернализации клеток нормализовали по отношению к общему количеству клеток в каждом состоянии.

[00368] Как показано на фигурах 33A-33D, BA072 (фигура 33A), BA101 (фигура 33B), эталон А (фигура 33C) и PVR-Fc (фигура 33D) стимулировали более высокие уровни интернализации CD96 на CD96-экспрессирующих клетках Jurkat, относительно изотипического контроля.

[00369] Как показано на фигуре 34, BA072 (фигура 34A) и варианты зародышевого типа BA083 (фигура 34B) и BA084 (фигура 34C) стимулировали более высокие уровни интернализации CD96 на CD96-экспрессирующих клетках Jurkat по сравнению с изотипическим контролем.

6.4.2 Интернализация CD96 в первичных клетках

[00370] В данном примере анализировали интернализацию антитела к CD96, BA072, в первично активированные Т-клетки, экспрессирующие CD96. Интернализацию BA072 или антитела изотипического контроля IgG1 оценивали с применением Fc-антитела к человеческому IgG, конъюгированного с пирролобензодиазепином (PBD). Данный конъюгат вторичное антитело-лекарственное средство α HFc-PBD связывается с антителом (например, BA072) и приводит к высвобождению цитотоксического полезного груза PBD в цитоплазму клетки после интернализации.

[00371] Вкратце: предварительно активированные первичные Т-клетки, экспрессирующие CD96, высевали в планшеты с белым дном для тканевых культур с плотностью 5×10^4 на лунку. При использовании конъюгата вторичное антитело-лекарственное средство α HFc-PBD, титрования дозы по семи точкам с трехкратными разведениями (от 3,3 мкг/мл до 0,003 мкг/мл) либо BA072, либо антитела изотипического контроля IgG в сочетании с α HFc-PBD (1:1 с первичным антителом) добавляли к клеткам в конечном объеме 100 мкл/лунка. Клетки инкубировали с первичными антителами и конъюгатом вторичное антитело-лекарственное средство при 37°C и в 5% атмосфере CO₂ в течение 72 часов.

[00372] После инкубации в каждую лунку добавляли 90 мкл восстановленного CellTiter-Glo (Promega) и клетки инкубировали при комнатной

температуре в течение 5 минут. Полученную люминесценцию регистрировали с помощью прибора Envision (Perkin Elmer).

[00373] Как показано на фигурах 35А и 35В, ВА072 индуцировало большее снижение выживаемости клеток у двух отдельных доноров, чем изотипический контроль. Поскольку гибель клеток является маркером интернализации, данный результат указывал на то, что ВА072 усиливало интернализацию CD96 по сравнению с изотипическим контролем.

6.5 Пример 5. Связывание эпитопа антителами к CD96

6.5.1 Fab ВА072 и ВА101, связывающиеся с Fc-меченной полноразмерной изоформой 2 человеческого CD96 или Fc-меченым доменом 1 человеческого CD96

[00374] Связывание Fab ВА072 и Fab ВА101 с полноразмерной изоформой 2 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 128) с Fc-меткой или доменом 1 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 130) с Fc-меткой оценивали методом поверхностного плазмонного резонанса.

[00375] Вкратце: эксперименты методом поверхностного плазмонного резонанса проводили с применением прибора Biacore T200, а сенсограммы визуально инспектировали с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 3.0.

[00376] В частности, 17 мкг/мл полноразмерной изоформы 2 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 128) с Fc-меткой и 5 мкг/мл домена 1 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 130) с Fc-меткой, разведенные в рабочем буфере (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20) иммобилизовали на отдельных проточных ячейках сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, кат. № 29-1275-56) с помощью 60-секундного введения со скоростью потока 10 мкл/мин. до достижения приблизительно 900 резонансных единиц (RU). Одну проточную ячейку использовали в качестве эталона. Fab ВА072, Fab ВА101 или Fab эталона А в концентрации 100 нМ пропускали через каждую проточную кювету со скоростью 30 мкл/мин. с 3-минутной фазой ассоциации с последующей 20-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали с помощью 40-секундной инъекции 10 mM глицина, pH 1,5.

Сенсограммы визуально инспектировали с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200 3.0.

[00377] Как показано на фигуре 36А, антитела к человеческому CD96, такие как Fab BA072, Fab BA101 и Fab эталона А, связывались с очищенной рекомбинантной полноразмерной изоформой 2 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 128). Как показано на фигуре 36В, Fab BA072 связывался с доменом 1 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 130). Более ограниченное связывание наблюдали в случае Fab BA101 с доменом 1 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 130). Не наблюдали связывания между доменом 1 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 130) и Fab эталона А.

6.5.2 Связывание эпитопов Fab BA072 и BA101

[00378] Связывание Fab BA072 и Fab BA101 с полноразмерной изоформой 2 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 128) с Fc-меткой или доменом 1 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 130) с Fc-меткой оценивали методом поверхностного плазмонного резонанса.

[00379] Вкратце: эксперименты методом поверхностного плазмонного резонанса проводили с применением прибора Biacore T200, а сенсограммы визуально инспектировали с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software 3.0.

[00380] В частности, 17 мкг/мл полноразмерной изоформы 2 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 128) с Fc-меткой и 5 мкг/мл домена 1 человеческого CD96 (SEQ ID NO: 130) с Fc-меткой, разведенные в рабочем буфере (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20) иммобилизовали на отдельных проточных кюветах сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, кат. № 29-1275-56) с помощью 60-секундного введения со скоростью потока 10 мкл/мин. до достижения приблизительно 900 резонансных единиц (RU). Одну проточную ячейку использовали в качестве эталона. Fab BA072 или Fab BA101 в концентрации 100 нМ пропускали через каждую из проточных кювет со скоростью 30 мкл/мин. с 3-минутной фазой ассоциации. При использовании протокола двойного введения в Biacore T200 за фазой ассоциации сразу же следовало второе введение комбинации исходного Fab плюс второй Fab в эквимоллярных концентрациях (т. е. 100 нМ Fab BA072 + Fab BA101, 100 нМ Fab BA072 + Fab

эталона А, 100 нМ Fab BA101 + Fab BA072 или 100 нМ Fab BA101 + Fab BA072). Двойное введение Fab осуществляли через проточные кюветы со скоростью 30 мкл/мин. с 3-минутной фазой ассоциации с последующей 10-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали с помощью 40-секундной инъекции 10 мМ глицина, pH 1,5. Сенсограммы визуально инспектировали с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200 3.0.

[00381] Как показано на фигуре 37А, Fab-фрагмент эталона А был способен связываться с полноразмерной изоформой 2 человеческого CD96 после связывания Fab BA072, что позволяет предположить, что BA072 связывает другой эпитоп на CD96 по сравнению с эталоном А. Как показано на фигуре 37В, Fab эталона А был способен связываться с полноразмерным человеческим CD96 после связывания Fab BA101, что позволяет предположить, что BA101 связывает другой эпитоп на CD96 по сравнению с эталоном А. Как показано на фигуре 37С, ни Fab эталона А, ни BA101 не были способны связываться с доменом 1 человеческого CD96 после связывания Fab BA072. Как показано на фигуре 37D, Fab BA101 был способен связывать домен 1 CD96. Fab эталона А не был способен связывать домен 1 CD96 после связывания Fab BA101. Fab BA072 был способен связывать домен 1 CD96 после связывания Fab BA101, что свидетельствовало о том, что BA072 связывается с эпитопом, отличным от BA101.

* * *

[00382] Объем настоящего изобретения не следует ограничивать конкретными описанными в данном документе вариантами осуществления. Безусловно, из приведенного выше описания и сопровождающих фигур специалистам в данной области техники станут очевидны различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00383] Все литературные источники (например, публикации, или патенты, или патентные заявки), упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждый отдельный литературный источник (например,

публикация, патент или патентная заявка) был конкретно и отдельно указан как полностью включенный посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[00384] Под объем представленной далее формулы изобретения подпадают и другие варианты осуществления.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, при этом антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющие комплементарность области (CDR) CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую следующие CDR: CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность $X_1YX_2X_3X_4$ (SEQ ID NO: 135), где

X_1 представляет собой Q или S;

X_2 представляет собой A или S;

X_3 представляет собой M или I и

X_4 представляет собой H или S;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность $X_1IX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9YX_{10}QKFQG$ (SEQ ID NO: 137), где

X_1 представляет собой W или G;

X_2 представляет собой N или I;

X_3 представляет собой A, E, V или P;

X_4 представляет собой V, G, W или I;

X_5 представляет собой S, Y, T, N или F;

X_6 представляет собой G или W;

X_7 представляет собой D, Y, N или T;

X_8 представляет собой T или A;

X_9 представляет собой K или N и

X_{10} представляет собой S или A;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность NWGX₁SYGX₂DV (SEQ ID NO: 180), GYDSRPLDV (SEQ ID NO: 19) или GYDSRPLDY (SEQ ID NO: 20), где

X₁ представляет собой M или L и

X₂ представляет собой M или L;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность RASQSIX₁X₂YLN (SEQ ID NO: 139) или GGNNIGSKIVH (SEQ ID NO: 26), где

X₁ представляет собой S, T или L и

X₂ представляет собой S, P или W;

(e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность X₁X₂SSLQS (SEQ ID NO: 141) или DDRDRPS (SEQ ID NO: 32), где

X₁ представляет собой S или A и

X₂ представляет собой A, S или E; и/или

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQX₁YSTPALX₂ (SEQ ID NO: 143) или QVWDINVHHVI (SEQ ID NO: 35), где

X₁ представляет собой S или A и

X₂ представляет собой T или S.

2. Выделенное антитело по п. 1, где:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность X₁YX₂MH (SEQ ID NO: 136), где

X₁ представляет собой Q или S и

X₂ представляет собой A или S;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность WINX₁X₂X₃X₄X₅TKYSQKFQG (SEQ ID NO: 138), где

X₁ представляет собой A, V или E;

X₂ представляет собой V, W или G;

X₃ представляет собой S, Y, T или N;

X₄ представляет собой G или W и

X₅ представляет собой D, N, Y или T;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность NWGX₁SYGX₂DV (SEQ ID NO: 180), где

X₁ представляет собой M или L и

X₂ представляет собой M или L;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность RASQSIX₁X₂YLN (SEQ ID NO: 139), где

X₁ представляет собой S, T или L и

X₂ представляет собой S, P или W;

(e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность X₁X₂SSLQS (SEQ ID NO: 141), где

X₁ представляет собой S или A и

X₂ представляет собой A, S или E; и/или

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPALT (SEQ ID NO: 33) или QQAYSTPALS (SEQ ID NO: 34).

3. Выделенное антитело по п. 1, где:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4;

(b) CDRH2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17;

(c) CDRH3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19 или 20;

(d) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26;

(e) CDRL2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32 и/или

(f) CDRL3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35.

4. Выделенное антитело по п. 1, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 5 и 18; 2, 6 и 18; 2, 8 и 18; 2, 9 и 18; 2, 10 и 18; 1, 7 и 18; 2, 11 и 18; 1, 12 и 18; 1, 13 и 18; 1, 14 и 18; 3, 15 и 18; 1, 16 и 18; 1, 5 и 140; 1, 5 и 142; 1, 5 и 179; 4, 17 и 19 или 4, 17 и 20 соответственно.

5. Выделенное антитело по п. 1, где CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 21, 28 и 33; 21, 29 и 33; 21, 30 и 33; 21, 31 и 33; 22, 29 и 33; 24, 29 и 33; 23, 29 и 33; 25, 28 и 34 или 26, 32 и 35 соответственно.

6. Выделенное антитело по п. 1, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 5, 18, 21, 28 и 33; 1, 5, 18, 21, 29 и 33; 1, 5, 18, 22, 29 и 33; 1, 5, 18, 23, 29 и 33; 1, 5, 18, 24, 29 и 33; 1, 5, 18, 25, 28 и 34; 1, 5, 140, 21, 28 и 33; 1, 5, 142, 21, 28 и 33; 1, 5, 179, 21, 28 и 33; 1, 7, 18, 21, 29 и 33; 1, 12, 18, 21, 28 и 33; 1, 13, 18, 21, 28 и 33; 1, 14, 18, 21, 28 и 33; 1, 16, 18, 21, 28 и 33; 2, 6, 18, 21, 29 и 33; 2, 8, 18, 21, 29 и 33; 2, 9, 18, 21, 30 и 33; 2, 10, 18, 21, 29 и 33; 2, 11, 18, 21, 31 и 33; 3, 15, 18, 21, 28 и 33; 4, 17, 19, 26, 32 и 35 или 4, 17, 20, 26, 32 и 35 соответственно.

7. Выделенное антитело по любому из пп. 1—6, где антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61.

8. Выделенное антитело по п. 7, где аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности под

SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или 61.

9. Выделенное антитело по п. 7 или п. 8, где X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61 представляет собой глутамин.

10. Выделенное антитело по п. 7 или п. 8, где X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61 представляет собой пироглутамат.

11. Выделенное антитело по любому из пп. 1—10, где антитело содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, или 75.

12. Выделенное антитело по п. 11, где аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75.

13. Выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, при этом антитело содержит: VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61; и/или VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 или 75.

14. Выделенное антитело по п. 13, где VH и VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 36 и 62; 37 и 62; 37 и 63; 37 и 66; 37 и 67; 37 и 68; 37 и 69; 38 и 63; 39 и 63; 40 и 63; 41 и 63; 42 и 63; 43 и 64; 44 и 64; 45 и 63; 46 и 63; 47 и 65; 48 и 62; 49 и 62; 50 и 62; 51 и 62; 52 и 62; 53

и 62; 54 и 62; 55 и 62; 56 и 62; 57 и 62; 58 и 62; 59 и 62; 60 и 70; 60 и 71; 60 и 72; 60 и 73; 60 и 74; 60 и 75 или 61 и 70 соответственно.

15. Выделенное антитело по п. 14, где аминокислотные последовательности VH и VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36 и 62; 37 и 62; 37 и 63; 37 и 66; 37 и 67; 37 и 68; 37 и 69; 38 и 63; 39 и 63; 40 и 63; 41 и 63; 42 и 63; 43 и 64; 44 и 64; 45 и 63; 46 и 63; 47 и 65; 48 и 62; 49 и 62; 50 и 62; 51 и 62; 52 и 62; 53 и 62; 54 и 62; 55 и 62; 56 и 62; 57 и 62; 58 и 62; 59 и 62; 60 и 70; 60 и 71; 60 и 72; 60 и 73; 60 и 74; 60 и 75 или 61 и 70 соответственно.

16. Выделенное антитело по любому из пп. 13—15, где X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61 представляет собой глутамин.

17. Выделенное антитело по любому из пп. 13—15, где X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61 представляет собой пироглутамат.

18. Выделенное антитело по любому из пп. 1—17, где антитело специфически связывается с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 130 или 131.

19. Выделенное антитело, которое специфически связывается с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 130 или 131.

20. Выделенное антитело по п. 18 или п. 19, где антитело связывается с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 134.

21. Выделенное антитело по любому из пп. 1—20, где антитело интернализируется при связывании с клетками, экспрессирующими человеческий CD96.

22. Выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, где антитело интернализируется при связывании с клетками, экспрессирующими человеческий CD96.

23. Выделенное антитело по любому из пп. 1—22, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из человеческого IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

24. Выделенное антитело по п. 23, где антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1.

25. Выделенное антитело по п. 24, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 содержит мутацию N297A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU.

26. Выделенное антитело по п. 25, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 124 или 176.

27. Выделенное антитело по п. 24, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 содержит мутации S239D, A330L и I332E, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

28. Выделенное антитело по п. 27, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 125 или 177.

29. Выделенное антитело по п. 24, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 содержит мутации S267E и L328F, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

30. Выделенное антитело по п. 29, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 126 или 178.

31. Выделенное антитело по любому из пп. 1—24, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, которая является вариантом константной области тяжелой цепи дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи связывается с FcγR с большей аффинностью, чем константная область тяжелой цепи дикого типа связывается с FcγR.

32. Выделенное антитело по п. 31, где FcγR представляет собой FcγRIIB.

33. Выделенное антитело по любому из пп. 1—24, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 или 169.

34. Выделенное антитело по п. 33, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 или 169.

35. Выделенное антитело по п. 33 или п. 34, где X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 и 169 представляет собой глутамин.

36. Выделенное антитело по п. 33 или п. 34, где X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 и 169 представляет собой пироглутамат.

37. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 122 или 123.

38. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 или 115.

39. Выделенное антитело по п. 38, где аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 или 115.

40. Выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 или 169; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 или 115.

41. Выделенное антитело по п. 40, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168 или 169; и/или аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, или 115.

42. Выделенное антитело по п. 40, где тяжелая цепь и легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 76 и 102; 79 и 103; 78 и 103; 82 и 103; 84 и 104; 83 и 104; 86 и 103; 85 и 103; 81 и 103; 80 и 103;

87 и 105; 77 и 102; 88 и 102; 77 и 106; 77 и 107; 77 и 108; 77 и 103; 89 и 102; 90 и 102; 91 и 102; 92 и 102; 93 и 102; 77 и 109; 94 и 102; 95 и 102; 96 и 102; 97 и 102; 98 и 102; 99 и 102; 100 и 110; 100 и 111; 100 и 112; 100 и 113; 100 и 114; 100 и 115; 101 и 110; 144 и 102; 147 и 103; 146 и 103; 150 и 103; 152 и 104; 151 и 104; 154 и 103; 153 и 103; 149 и 103; 148 и 103; 155 и 105; 145 и 102; 156 и 102; 145 и 106; 145 и 107; 145 и 108; 145 и 103; 157 и 102; 158 и 102; 159 и 102; 160 и 102; 161 и 102; 145 и 109; 162 и 102; 163 и 102; 164 и 102; 165 и 102; 166 и 102; 167 и 102; 168 и 110; 168 и 111; 168 и 112; 168 и 113; 168 и 114; 168 и 115 или 169 и 110 соответственно.

43. Выделенное антитело по п. 41, где аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76 и 102; 79 и 103; 78 и 103; 82 и 103; 84 и 104; 83 и 104; 86 и 103; 85 и 103; 81 и 103; 80 и 103; 87 и 105; 77 и 102; 88 и 102; 77 и 106; 77 и 107; 77 и 108; 77 и 103; 89 и 102; 90 и 102; 91 и 102; 92 и 102; 93 и 102; 77 и 109; 94 и 102; 95 и 102; 96 и 102; 97 и 102; 98 и 102; 99 и 102; 100 и 110; 100 и 111; 100 и 112; 100 и 113; 100 и 114; 100 и 115; 101 и 110; 144 и 102; 147 и 103; 146 и 103; 150 и 103; 152 и 104; 151 и 104; 154 и 103; 153 и 103; 149 и 103; 148 и 103; 155 и 105; 145 и 102; 156 и 102; 145 и 106; 145 и 107; 145 и 108; 145 и 103; 157 и 102; 158 и 102; 159 и 102; 160 и 102; 161 и 102; 145 и 109; 162 и 102; 163 и 102; 164 и 102; 165 и 102; 166 и 102; 167 и 102; 168 и 110; 168 и 111; 168 и 112; 168 и 113; 168 и 114; 168 и 115 или 169 и 110 соответственно.

44. Выделенное антитело по любому из пп. 40—43, где X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76—101 или 144—169 представляет собой глутамин.

45. Выделенное антитело по любому из пп. 40—43, где X в любой из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 76-101 или 144—169 представляет собой пироглутамат.

46. Выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, где антитело связывается с таким же эпитопом человеческого CD96, что и антитело по любому из предыдущих пунктов.

47. Выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческим CD96, где антитело конкурирует за связывание с человеческим CD96 с антителом по любому из предыдущих пунктов.

48. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело является человеческим антителом.

49. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело является мультиспецифическим антителом.

50. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело является конъюгированным с цитотоксическим средством, цитостатическим средством, токсином, радионуклидом или детектируемой меткой.

51. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело является конъюгированным со вторым антителом.

52. Выделенный полинуклеотид, кодирующий VH и/или VL антитела по любому из предыдущих пунктов.

53. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 52.

54. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 52 или вектор по п. 55.

55. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1—51, полинуклеотид по п. 52, вектор по п. 53 или клетку-хозяина по п. 54 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

56. Способ получения антитела, которое специфически связывается с человеческим CD96, при этом способ предусматривает культивирование клетки-хозяина по п. 54 в подходящих условиях так, чтобы экспрессировался полинуклеотид и продуцировалось антитело.

57. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1—51,

полинуклеотида по п. 52, вектора по п. 53, клетки-хозяина по п. 54 или фармацевтической композиции по п. 55.

58. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1—51, полинуклеотида по п. 52, вектора по п. 53, клетки-хозяина по п. 54 или фармацевтической композиции по п. 55.

59. Способ по п. 57 или п. 58, где антитело, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина или фармацевтическую композицию вводят системно, внутривенно, подкожно или внутрь опухоли или доставляют в лимфатический узел, дренирующий опухоль.

60. Способ по любому из пп. 57—59, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

61. Способ по п. 60, где дополнительным терапевтическим средством является химиотерапевтическое средство.

62. Способ по п. 61, где дополнительным терапевтическим средством является средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа.

63. Способ по п. 62, где средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа, выбрано из группы, состоящей из антагонистического антитела к PD-1, антагонистического антитела к PD-L1, антагонистического антитела к PD-L2, антагонистического антитела к CTLA-4, антагонистического антитела к TIM-3, антагонистического антитела к LAG-3, антагонистического антитела к VISTA, антагонистического антитела к TIGIT, антагонистического антитела к CEACAM1, антагонистического антитела к CD96, агонистического антитела к GITR и агонистического антитела к OX40.

64. Способ по п. 63, где дополнительным терапевтическим средством является антитело к PD-1, необязательно где антитело к PD-1 является пембролизумабом или ниволумабом.

65. Способ по п. 60, где дополнительным терапевтическим средством является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO).

66. Способ по п. 65, где ингибитор выбран из группы, состоящей из эпакадостата, F001287, индоксимода и NLG919.

67. Способ по п. 60, где дополнительным терапевтическим средством является вакцина.

68. Способ по п. 67, где вакцина содержит комплекс пептида и белка теплового шока (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом.

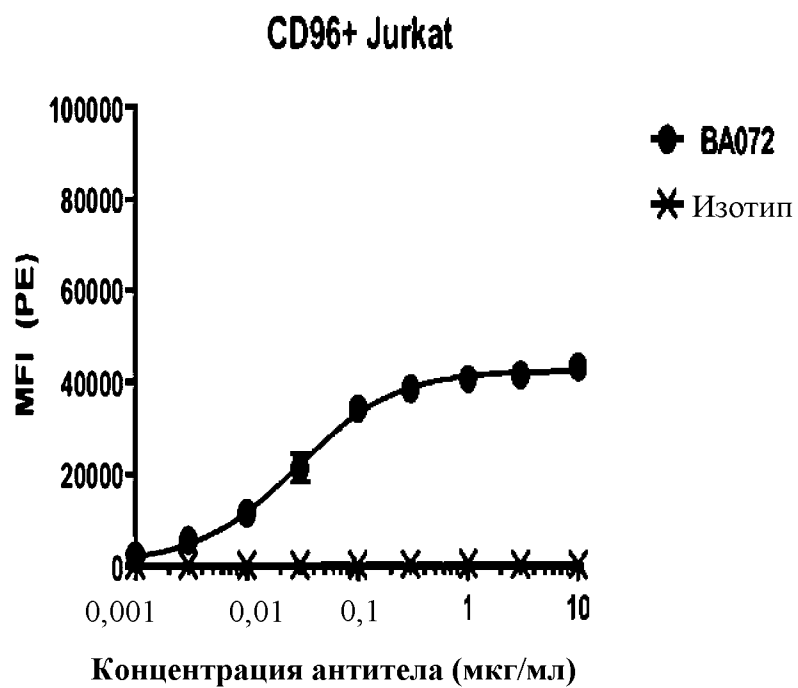
69. Способ по п. 68, где белком теплового шока является hsc70 и он образует комплекс с опухоли-ассоциированным антигенным пептидом.

70. Способ по п. 68, где белком теплового шока является белок gp96 и он образует комплекс с опухоли-ассоциированным антигенным пептидом, необязательно где HSPPC получен из опухоли, которая получена от субъекта.

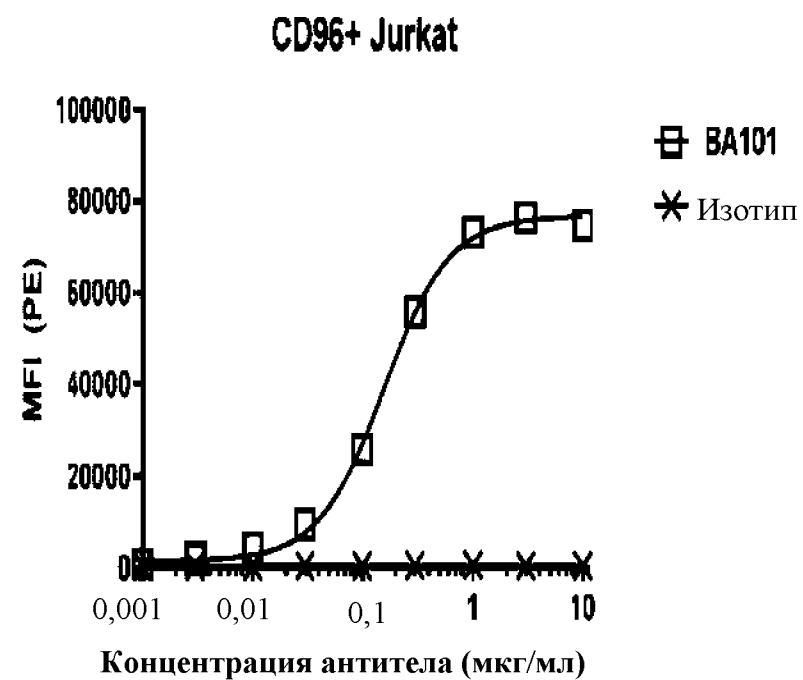
71. Способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1—51, полинуклеотида по п. 52, вектора по п. 53, клетки-хозяина по п. 54 или фармацевтической композиции по п. 55.

Связывание исходных антител к CD96 с клетками Jurkat, экспрессирующими
человеческую изоформу 2 CD96

Фиг. 1А

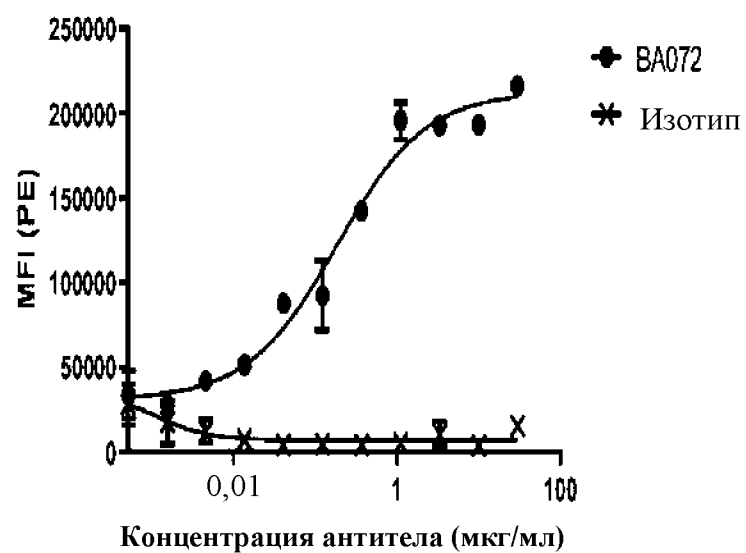


Фиг. 1В

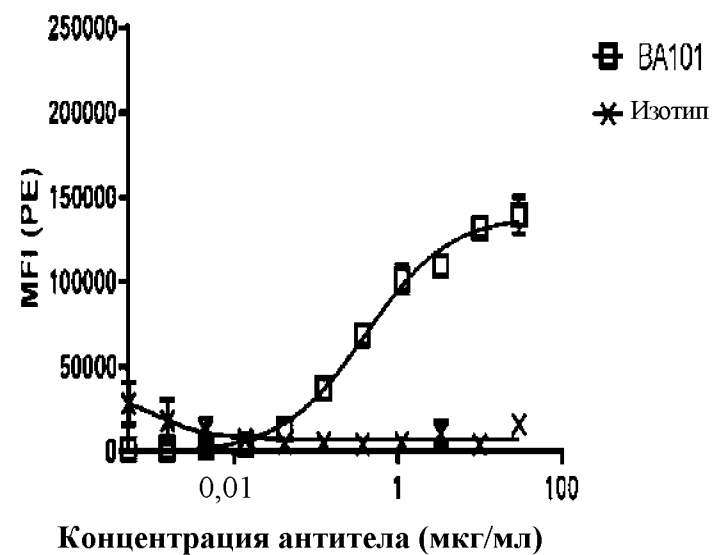


Связывание исходных антител к CD96 с клетками CHO, экспрессирующими
человеческую изоформу 1 CD96

Фиг. 2А

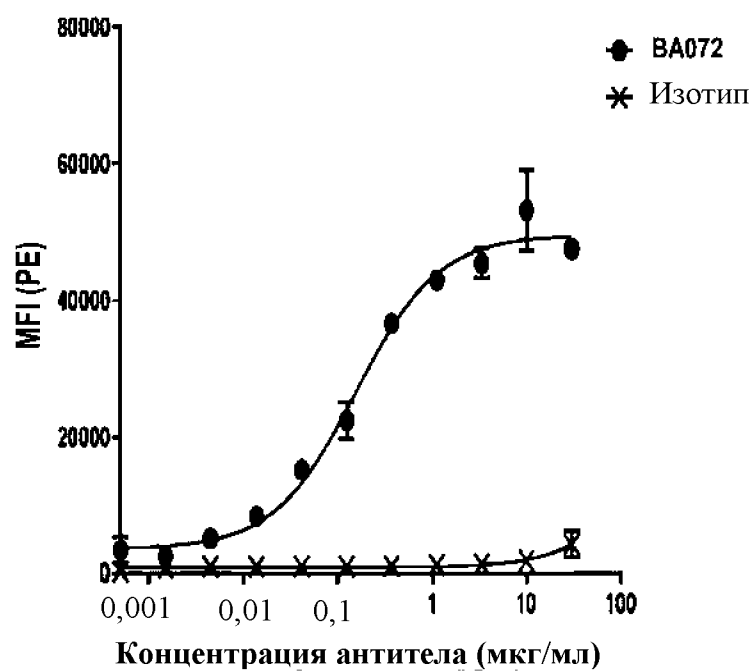


Фиг. 2В

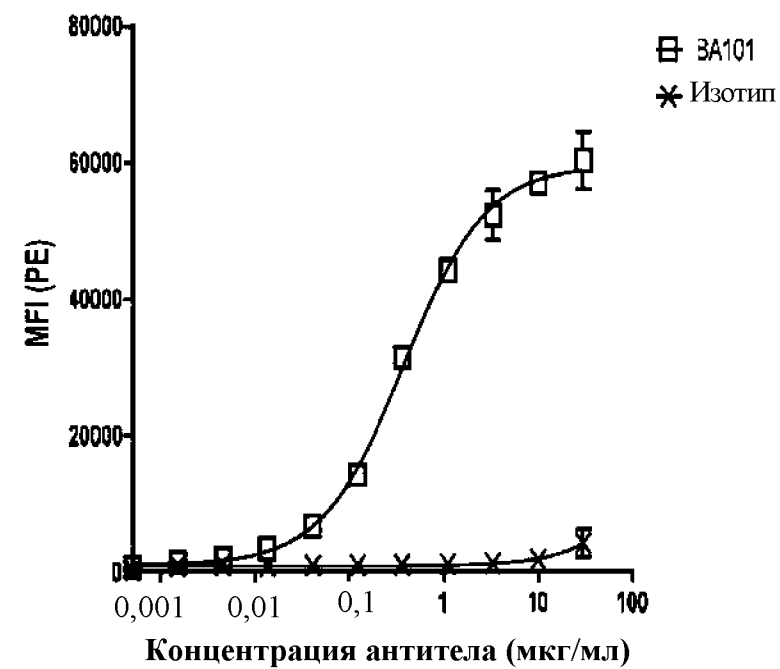


Связывание исходных антител к CD96 с клетками CHO, экспрессирующими
человеческую изоформу 2 CD96

Фиг. 3А

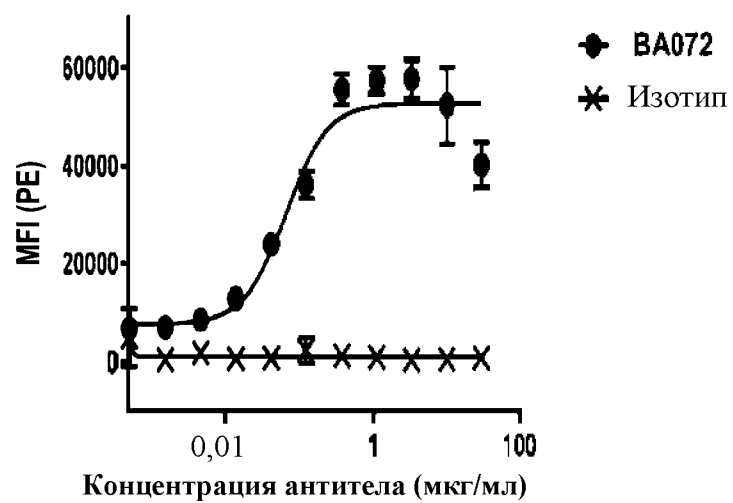


Фиг. 3В

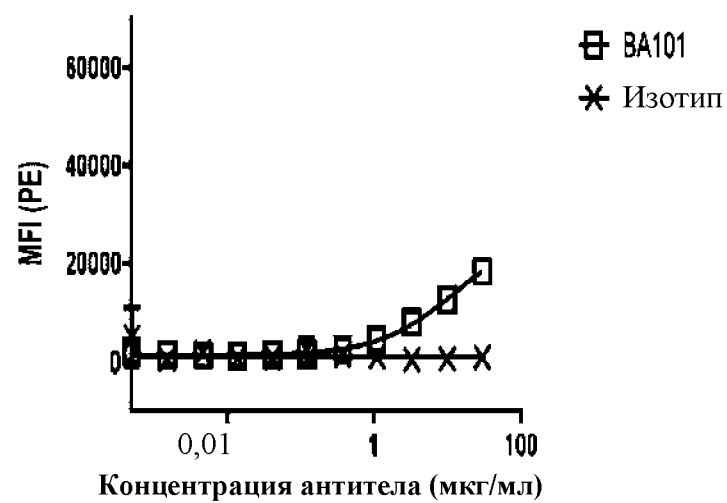


Связывание исходных антител к CD96 с клетками CHO, экспрессирующими изоформу 2
CD96 яванского макака

Фиг. 4А

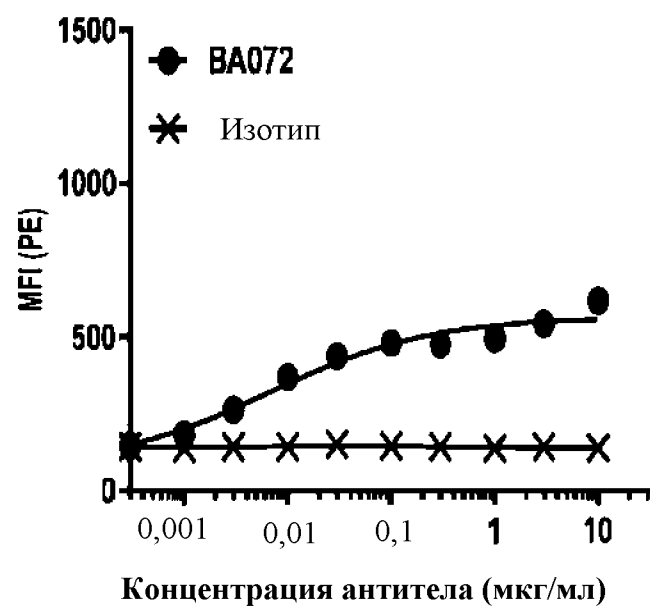


Фиг. 4В



Связывание исходных антител к CD96 с активированными первичными человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD96

Фиг. 5А

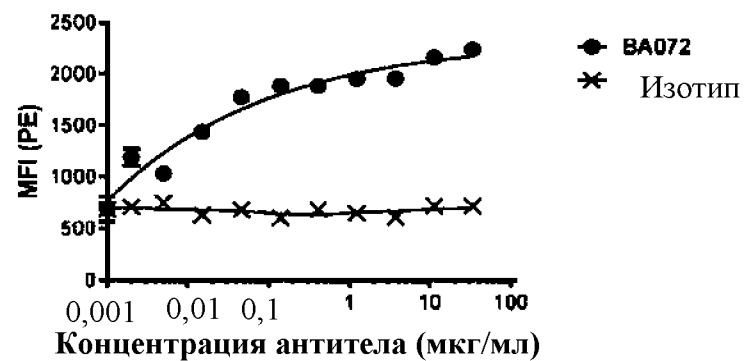


Фиг. 5В

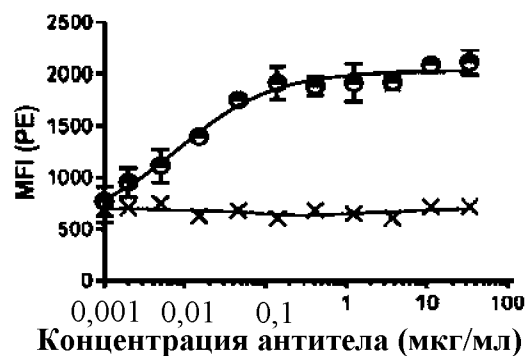


Связывание антител к CD96 с активированными человеческими первичными Т-клетками, экспрессирующими CD96

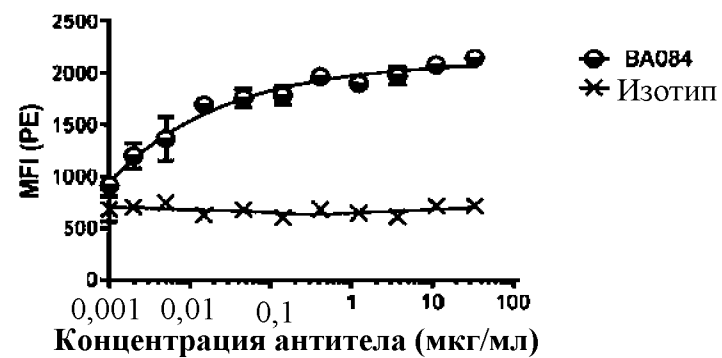
Фиг. 6А



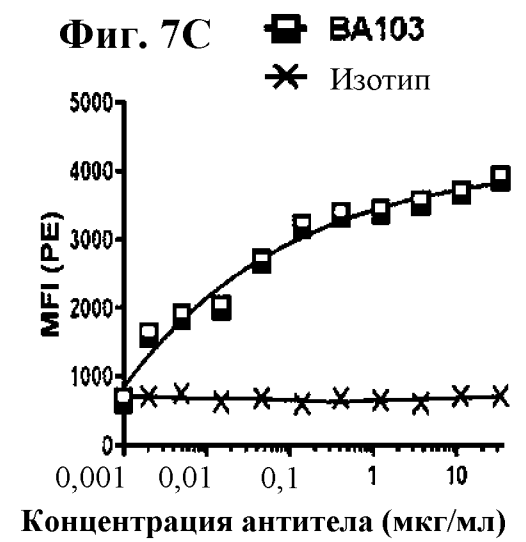
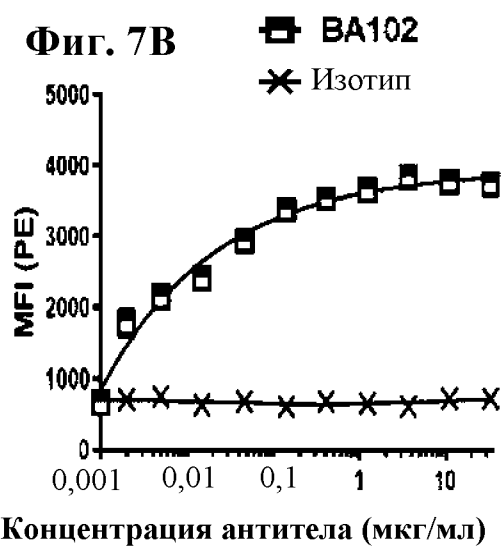
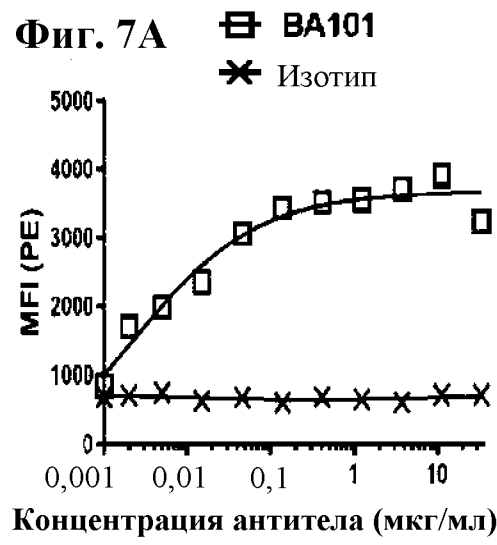
Фиг. 6В



Фиг. 6С

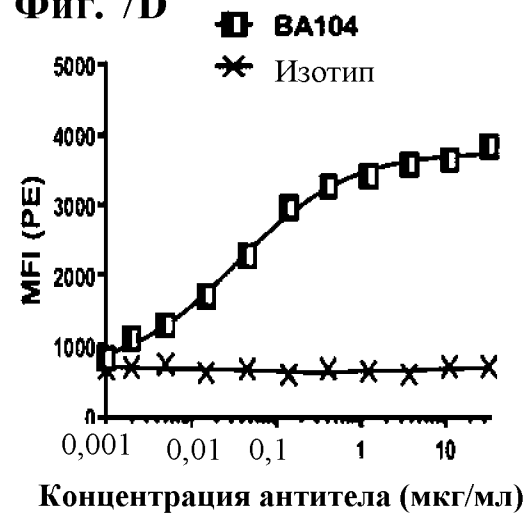


Связывание антител к CD96 с человеческими первичными клетками, экспрессирующими CD96

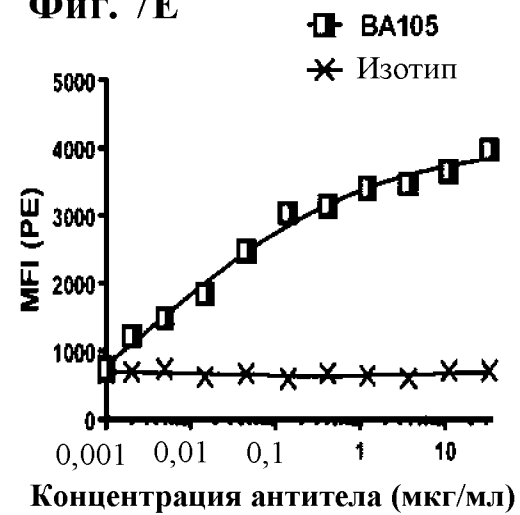


Связывание антител к CD96 с человеческими первичными клетками, экспрессирующими CD96

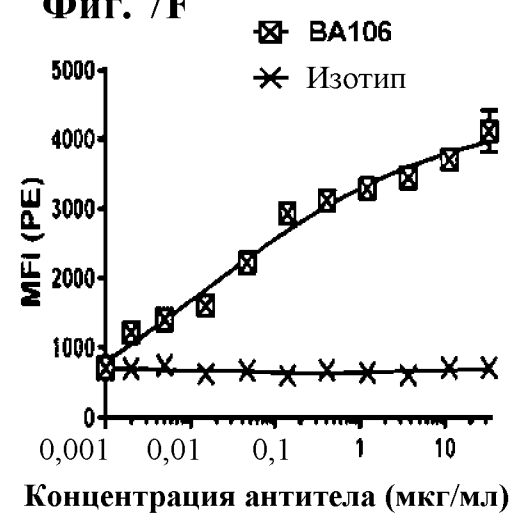
Фиг. 7D



Фиг. 7E

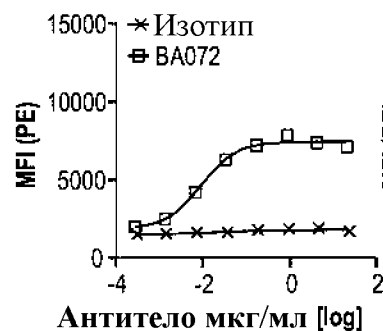


Фиг. 7F

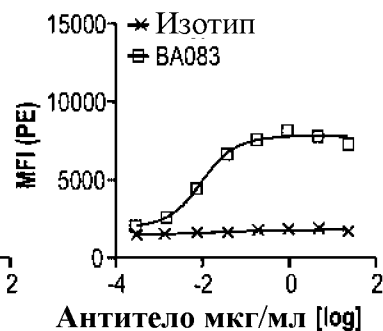


Связывание антител к CD96 с экспрессирующими CD96 CD8⁺ Т-клетками,
трансфицированными NY-ESO-1

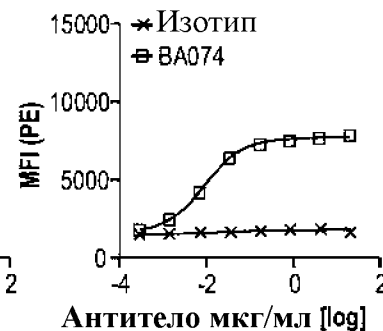
Фиг. 8А



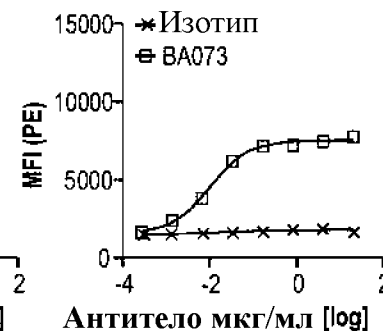
Фиг. 8В



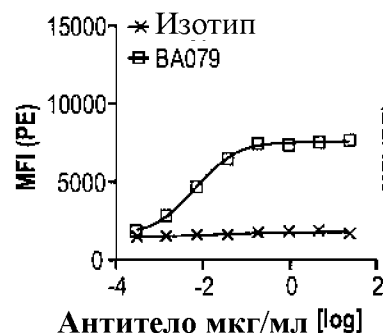
Фиг. 8С



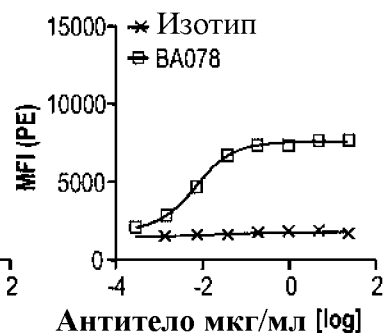
Фиг. 8D



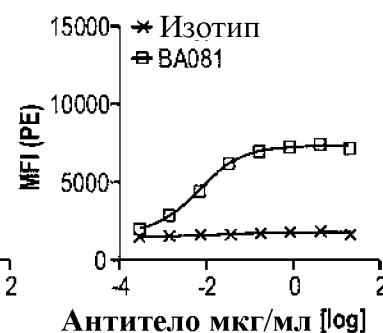
Фиг. 8Е



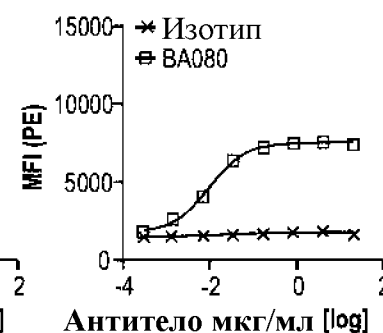
Фиг. 8F



Фиг. 8G

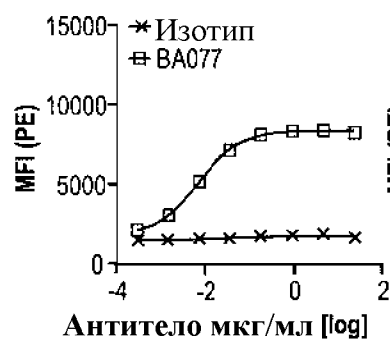


Фиг. 8H

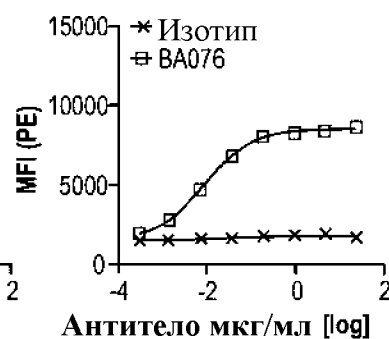


Связывание антител к CD96 с экспрессирующими CD96 CD8⁺ Т-клетками,
трансфицированными NY-ESO-1

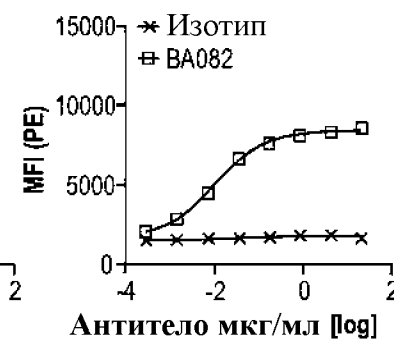
Фиг. 8I



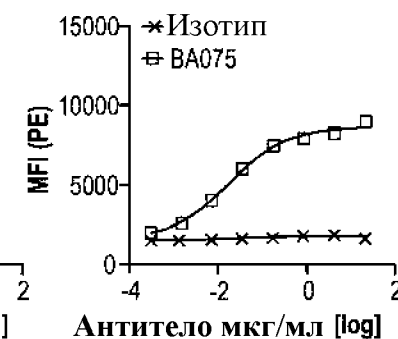
Фиг. 8J



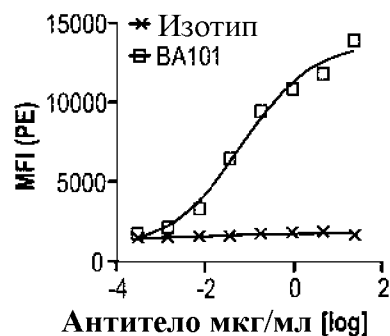
Фиг. 8K



Фиг. 8L

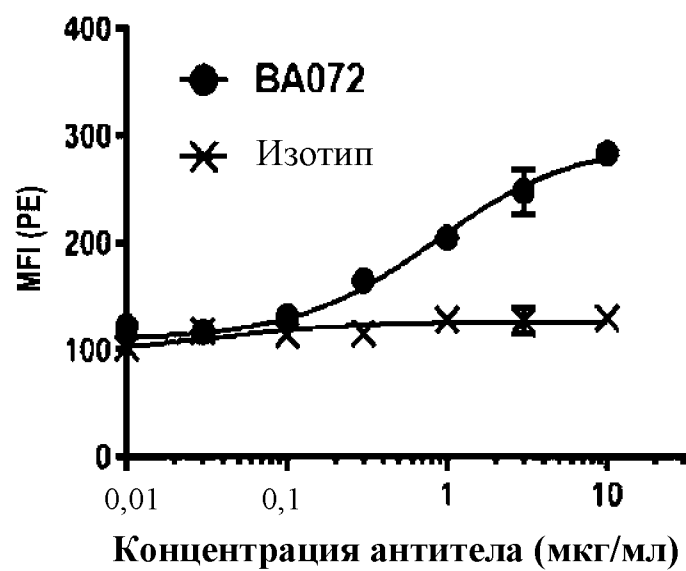


Фиг. 8M

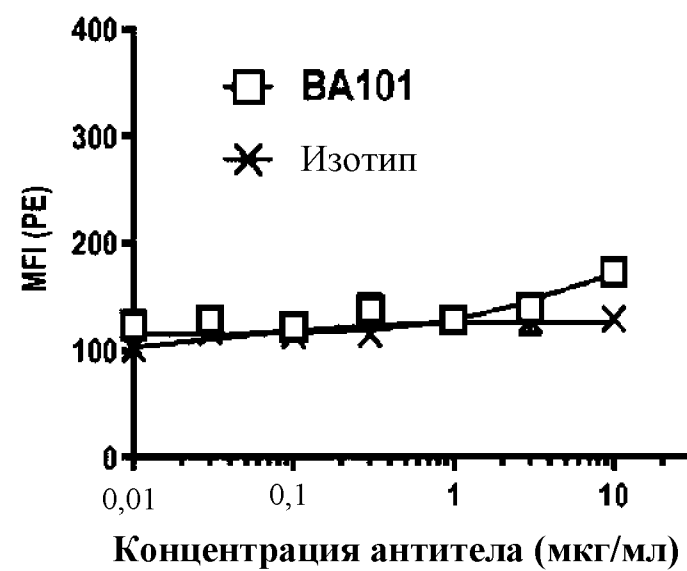


Связывание исходных антител к CD96 с первичными клетками яванского макака, экспрессирующими CD96

Фиг. 9А

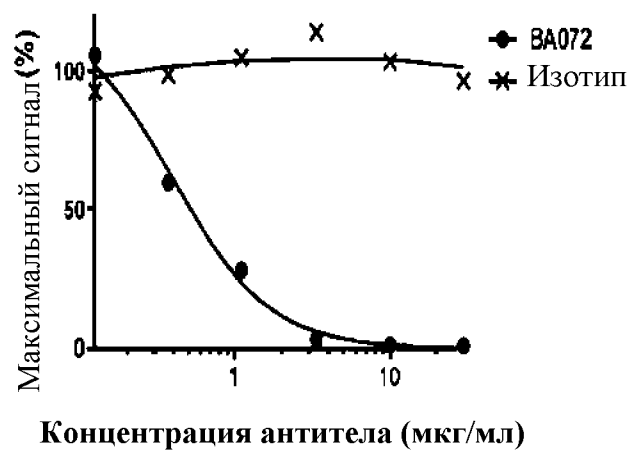


Фиг. 9В



Блокирование с помощью исходных антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96

Фиг. 10А

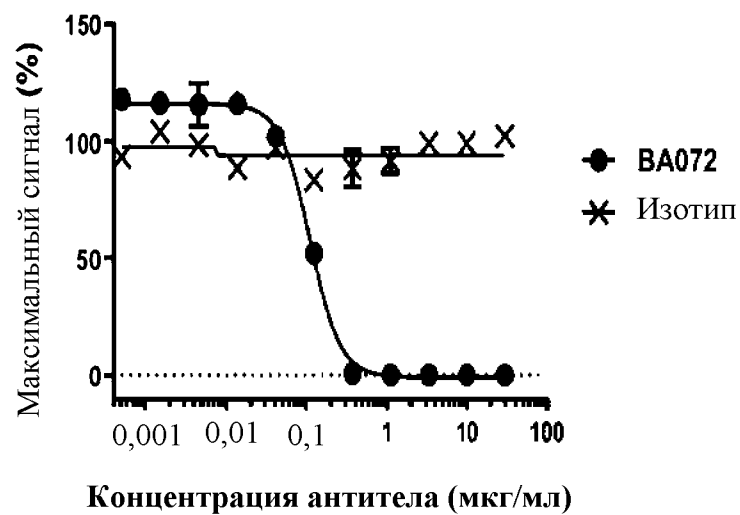


Фиг. 10В

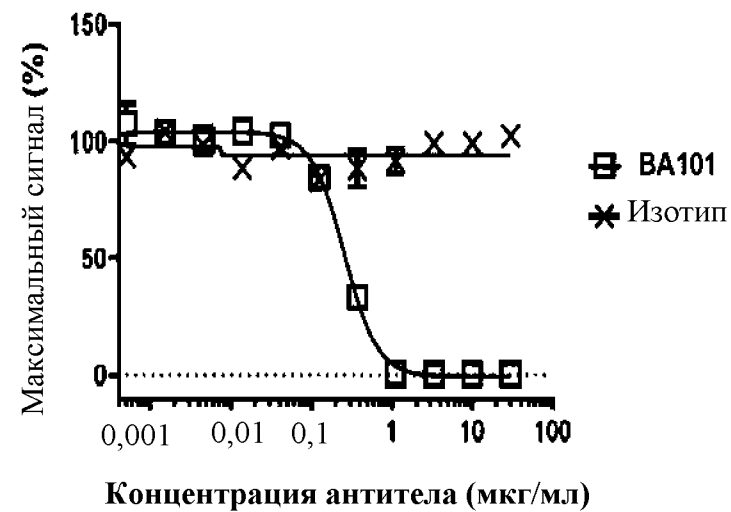


Блокирование с помощью исходных антител к CD96 связывания между PVR-His и клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96

Фиг. 11А

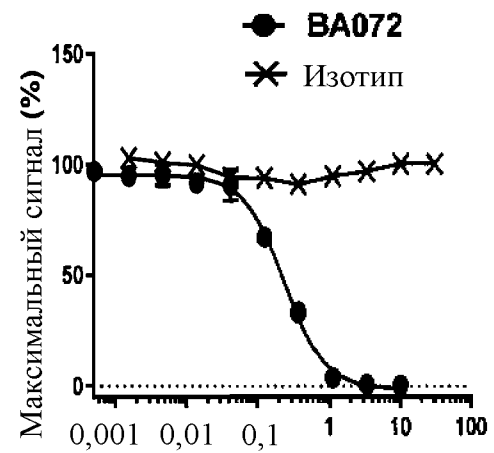


Фиг. 11В



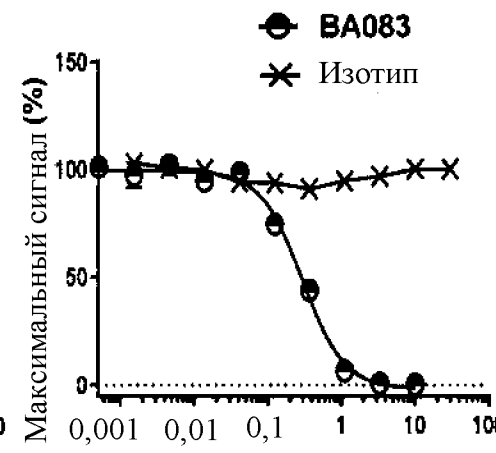
Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96

Фиг. 12А



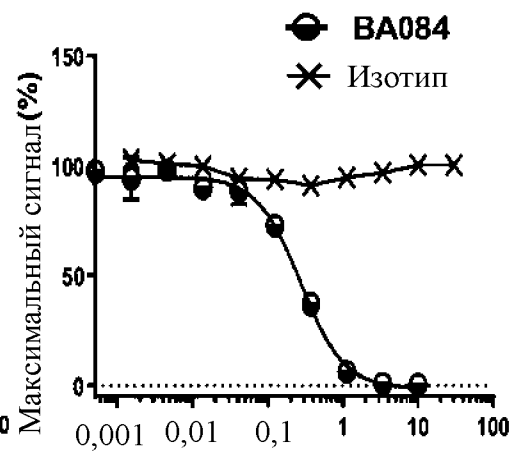
Концентрация антитела (мкг/мл)

Фиг. 12В



концентрация антитела (мкг/мл)

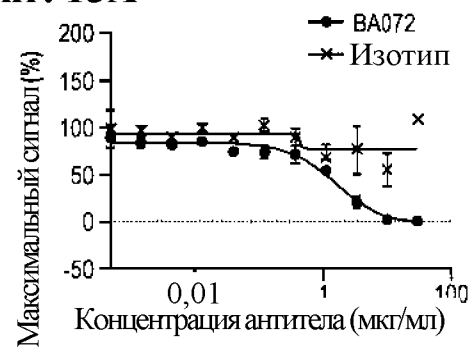
Фиг. 12С



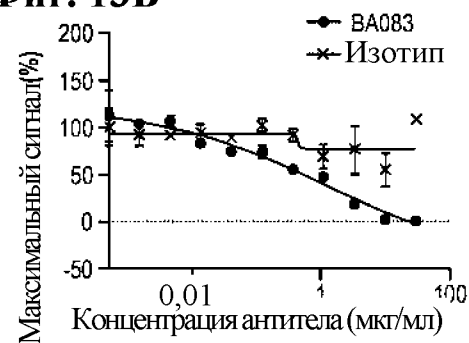
Концентрация антитела (мкг/мл)

Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96

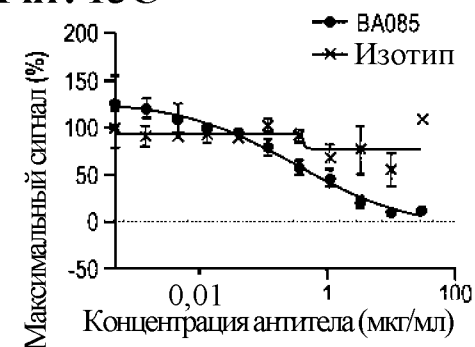
Фиг. 13A



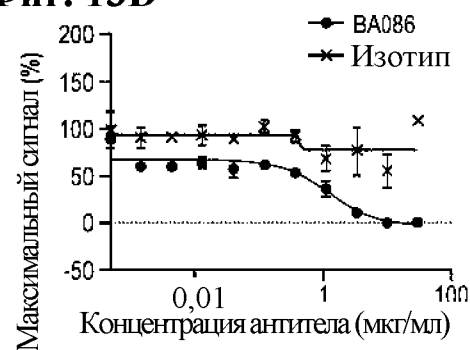
Фиг. 13B



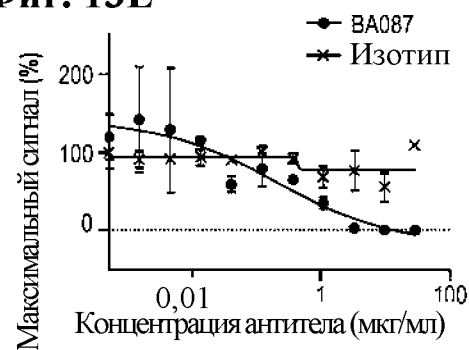
Фиг. 13C



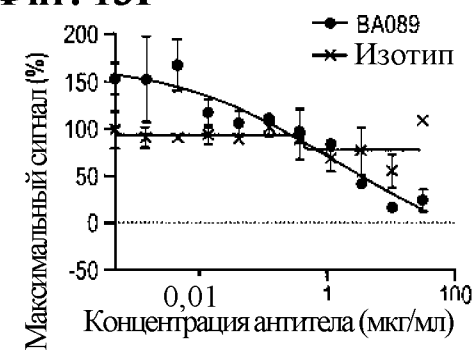
Фиг. 13D



Фиг. 13E

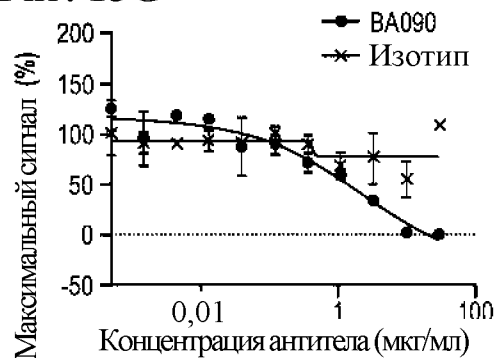


Фиг. 13F

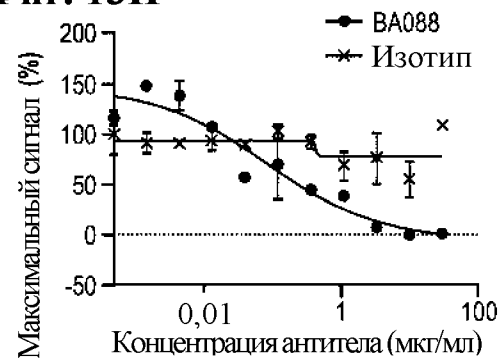


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96

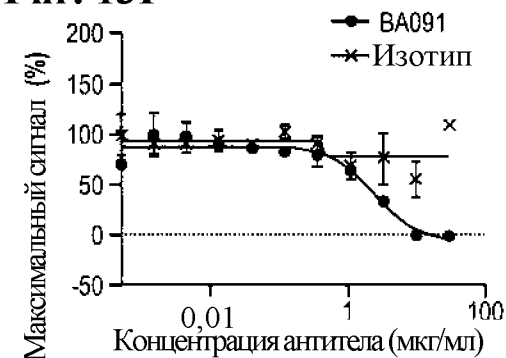
Фиг. 13G



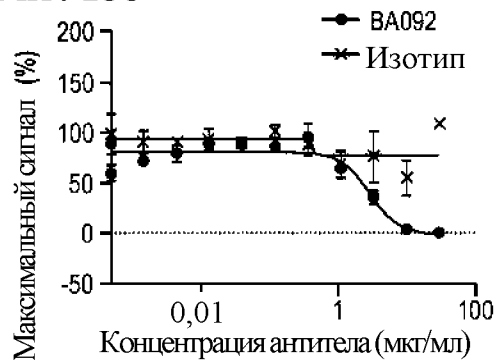
Фиг. 13H



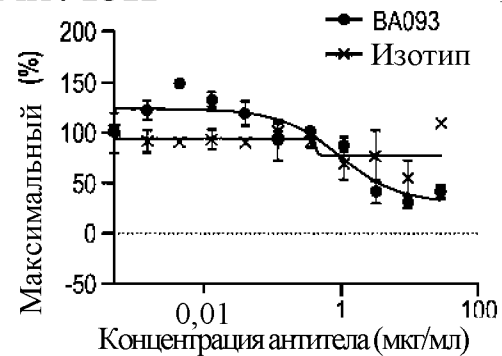
Фиг. 13I



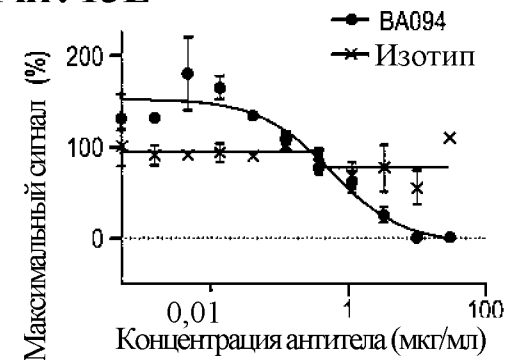
Фиг. 13J



Фиг. 13K

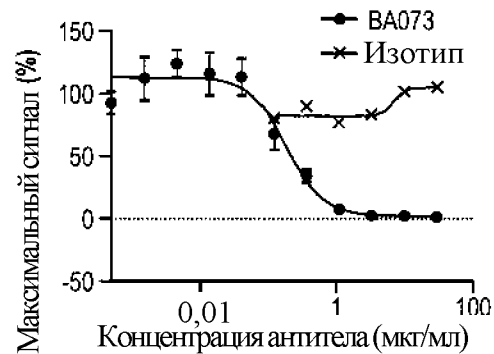


Фиг. 13L

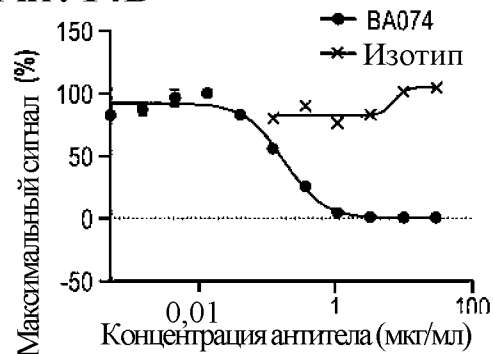


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PRV-Fc и клетками CHO, экспрессирующими изоформу 1 CD96

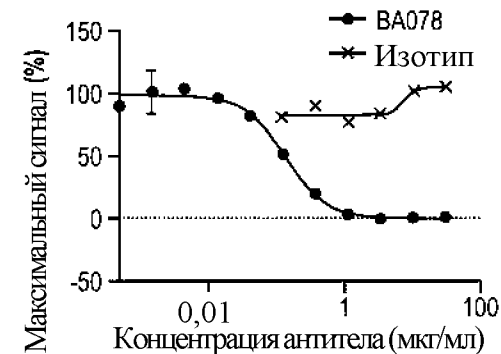
Фиг. 14А



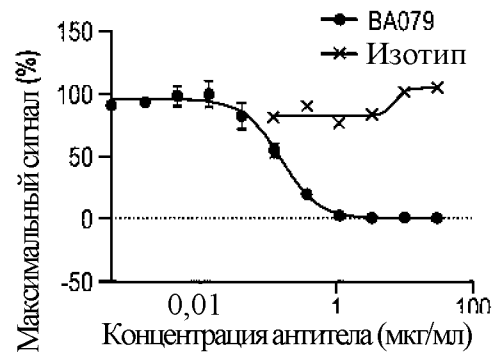
Фиг. 14В



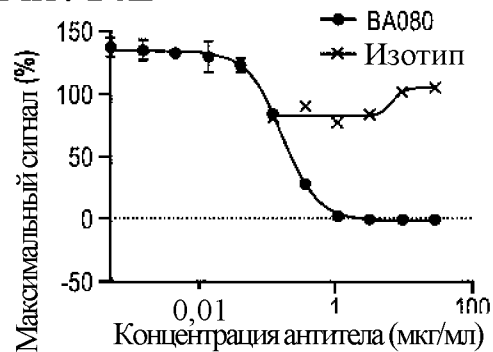
Фиг. 14С



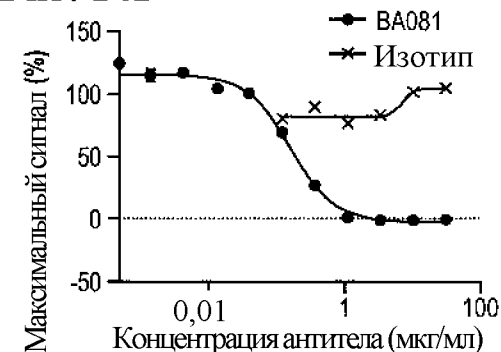
Фиг. 14D



Фиг. 14Е

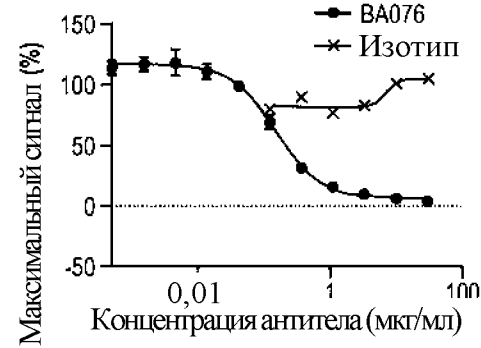


Фиг. 14F

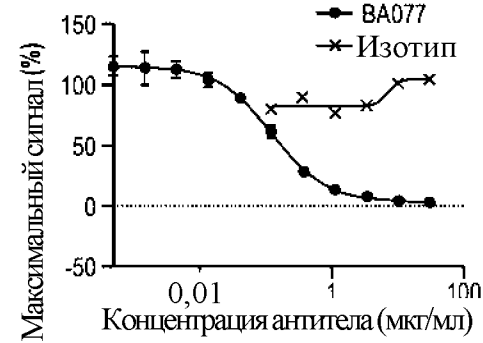


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PRV-Fc и клетками CHO, экспрессирующими изоформу 1 CD96

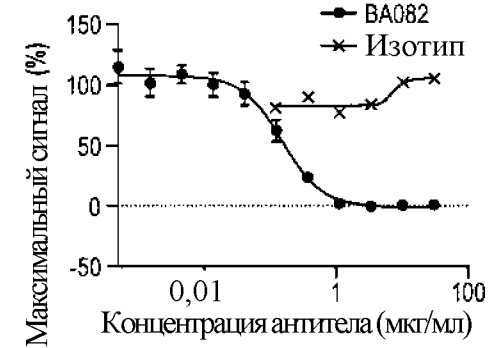
Фиг. 14G



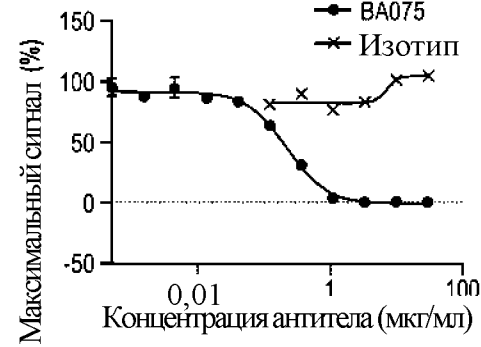
Фиг. 14H



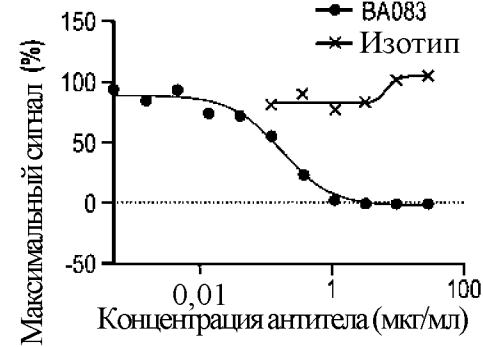
Фиг. 14I



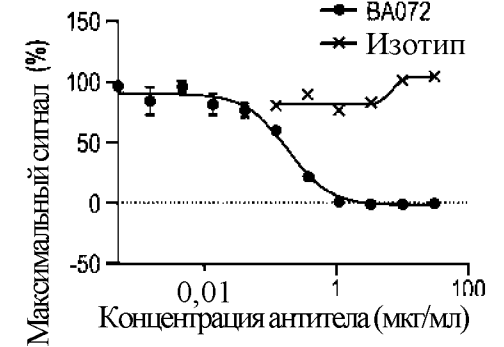
Фиг. 14J



Фиг. 14K

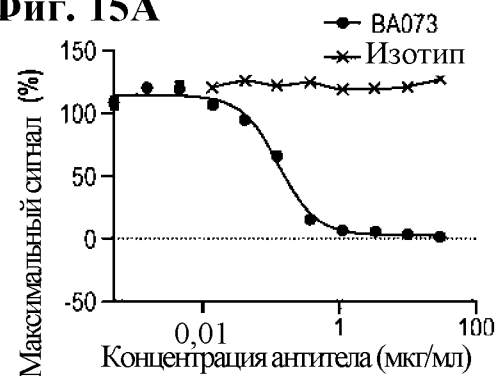


Фиг. 14L

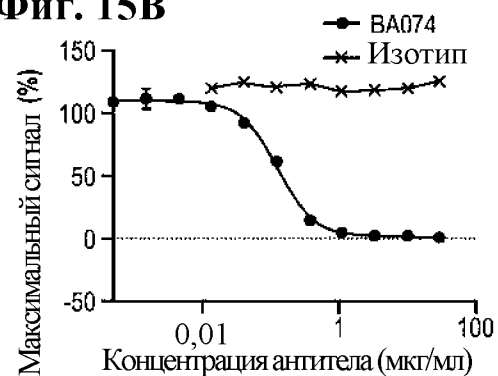


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96

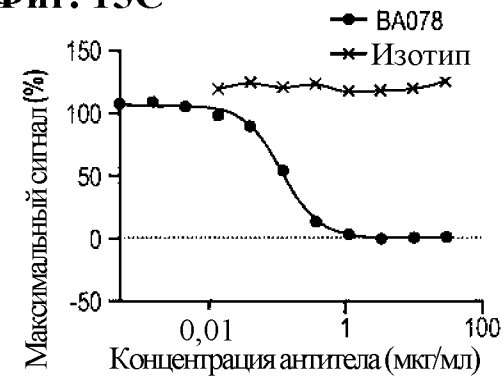
Фиг. 15A



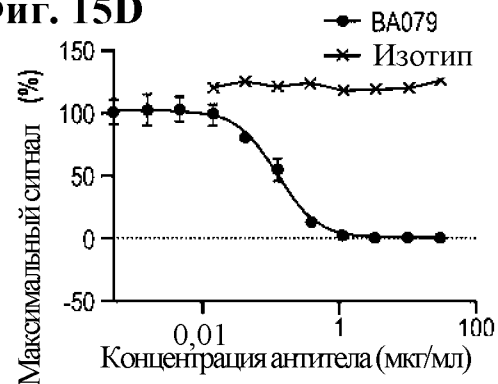
Фиг. 15B



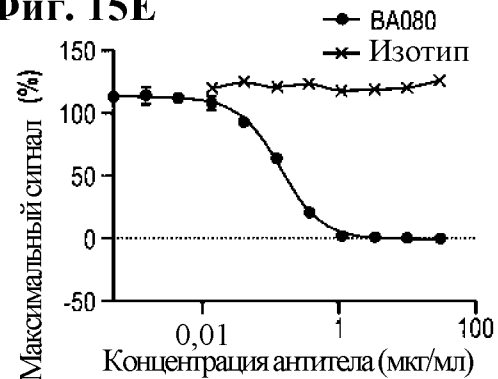
Фиг. 15C



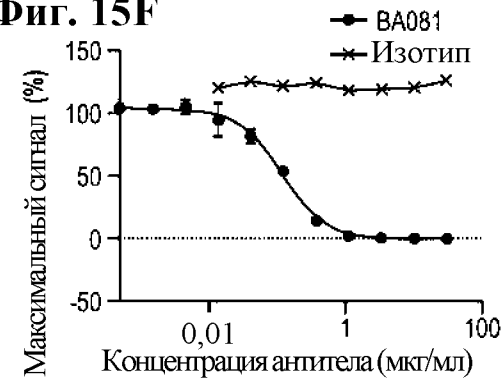
Фиг. 15D



Фиг. 15E

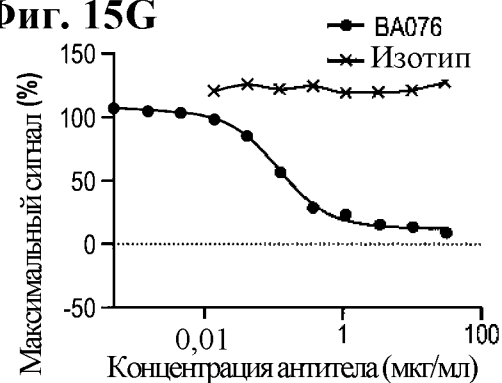


Фиг. 15F

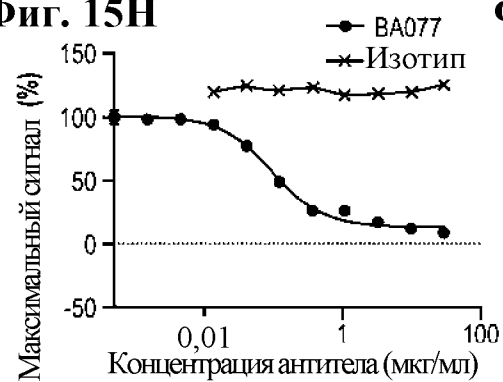


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96

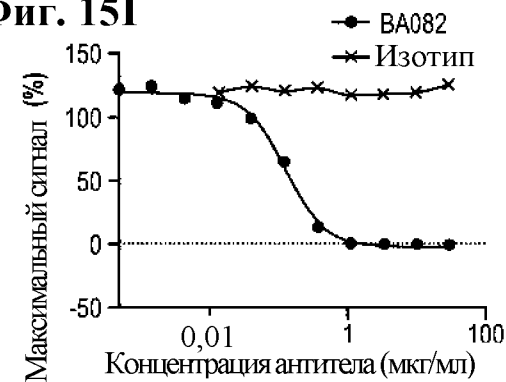
Фиг. 15G



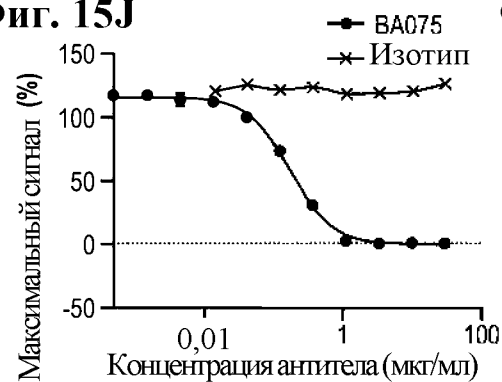
Фиг. 15H



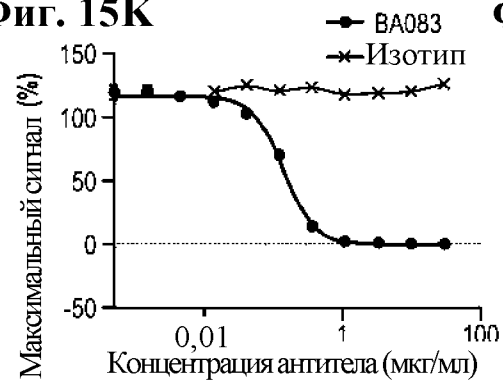
Фиг. 15I



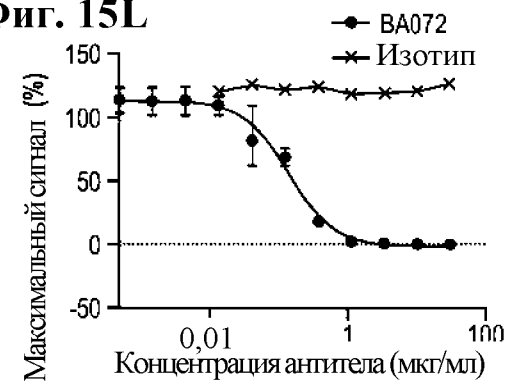
Фиг. 15J



Фиг. 15K

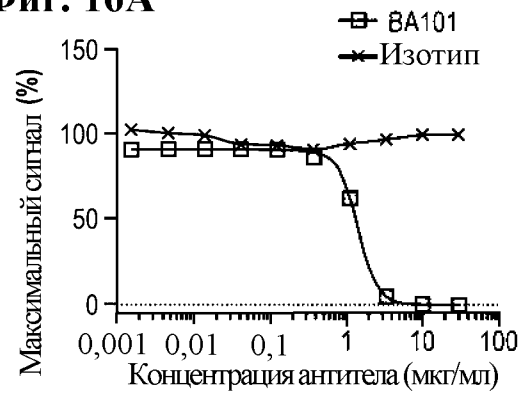


Фиг. 15L

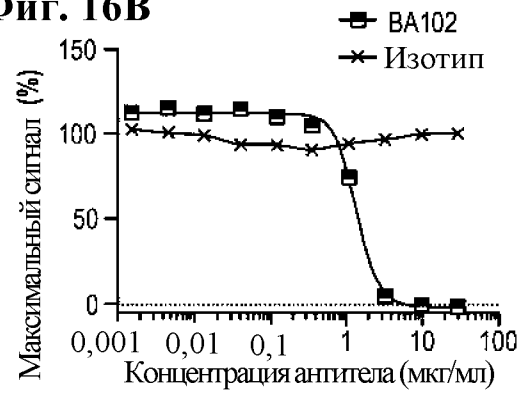


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96

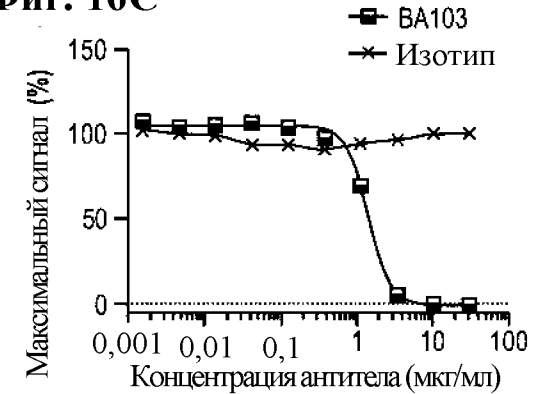
Фиг. 16А



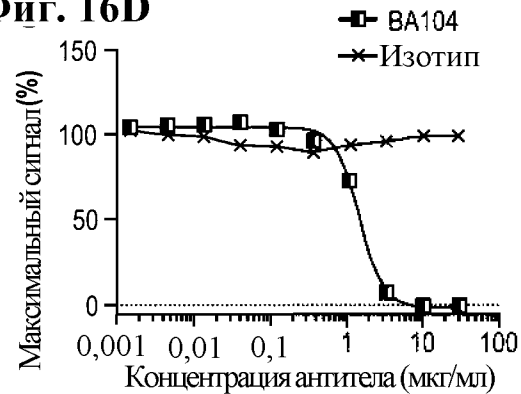
Фиг. 16В



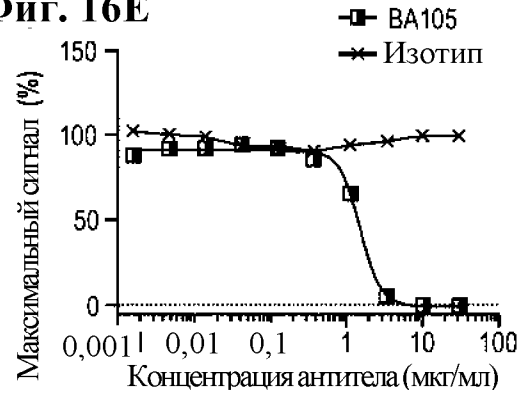
Фиг. 16С



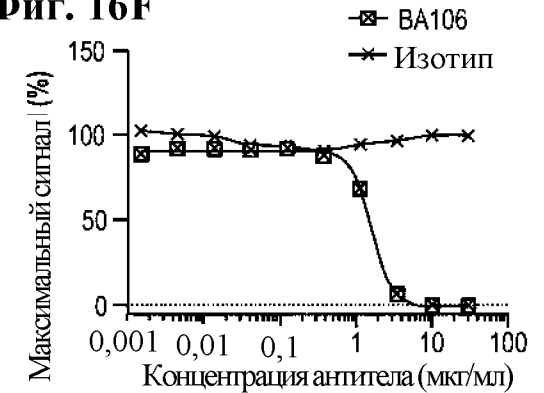
Фиг. 16D



Фиг. 16Е

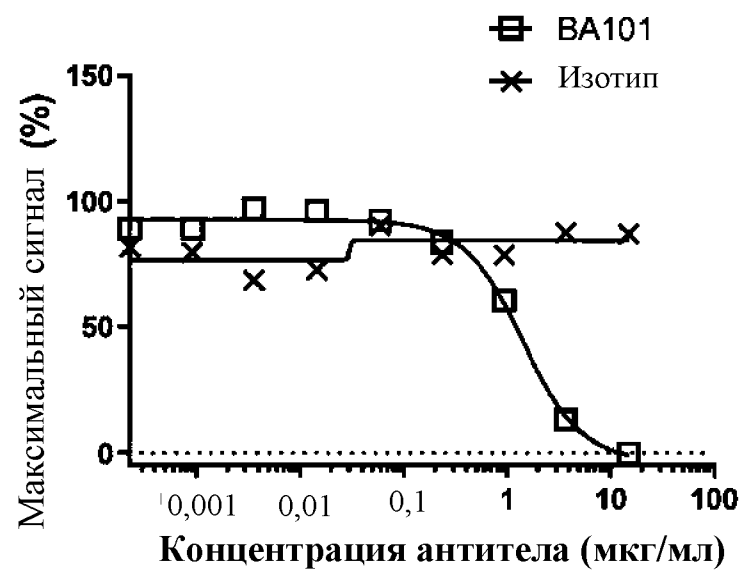


Фиг. 16F

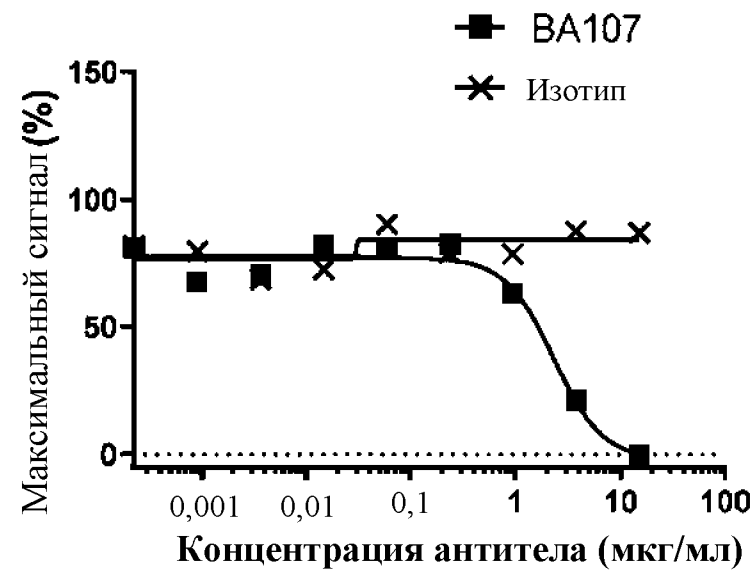


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96

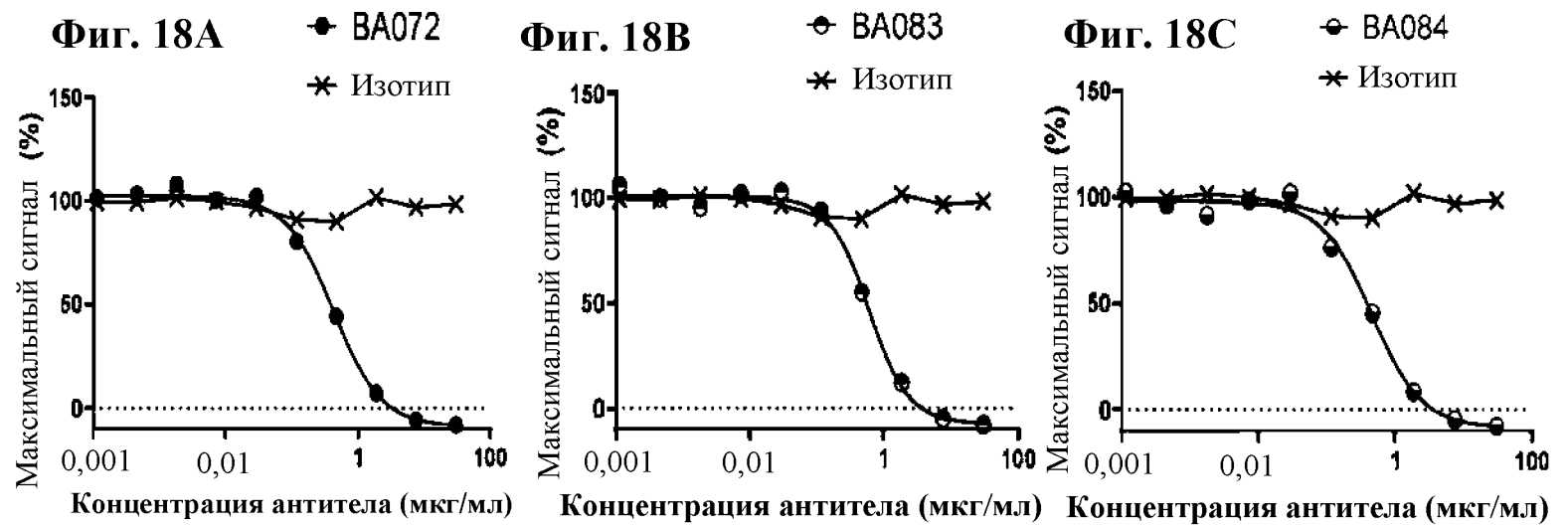
Фиг. 17А



Фиг. 17В

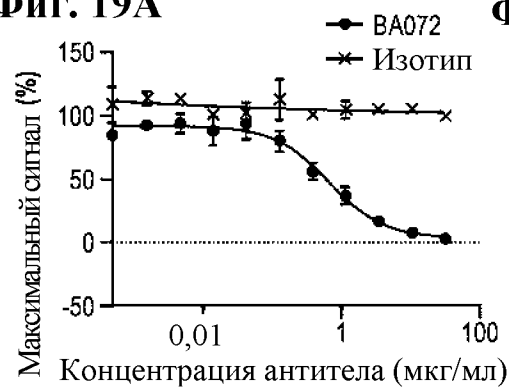


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими изоформу 2 CD96 яванского макака

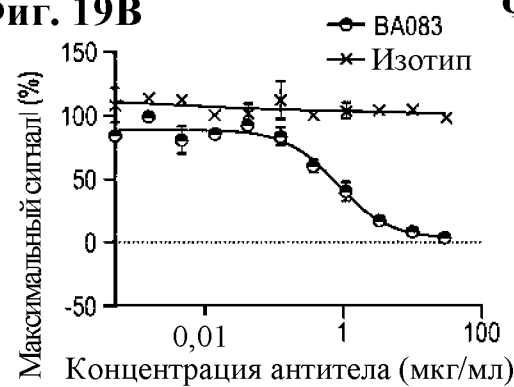


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими изоформу 2 CD96 яванского макака

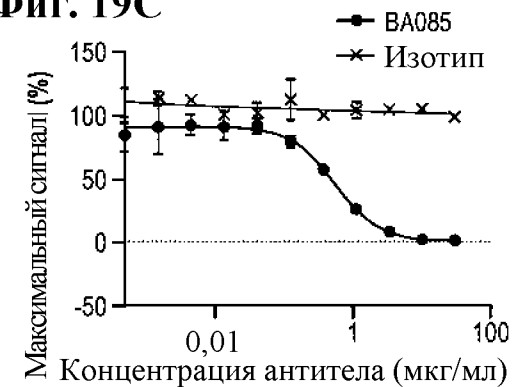
Фиг. 19А



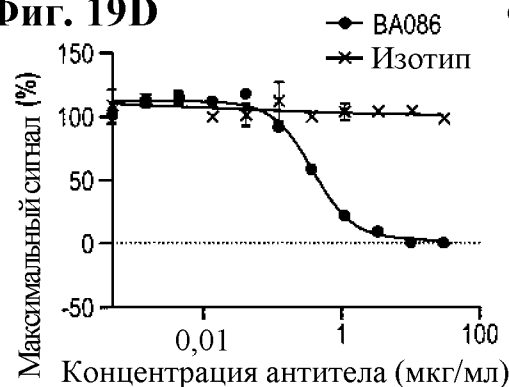
Фиг. 19В



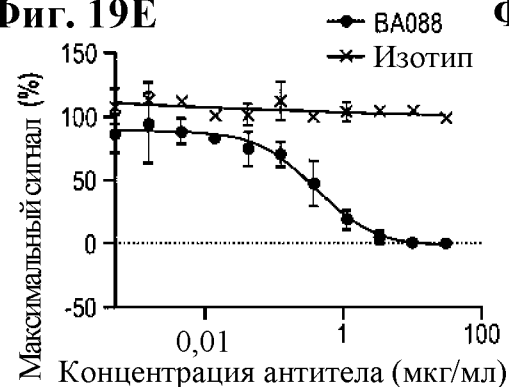
Фиг. 19С



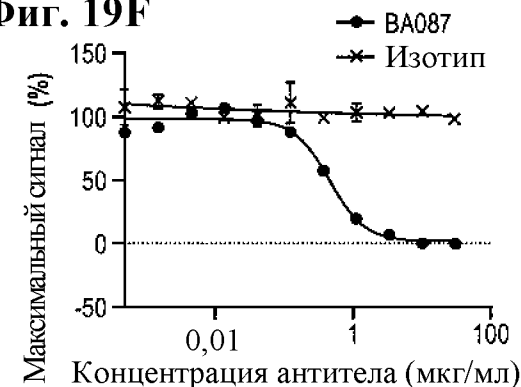
Фиг. 19D



Фиг. 19Е

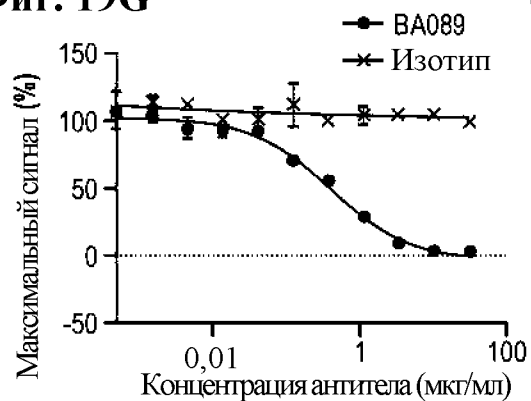


Фиг. 19F

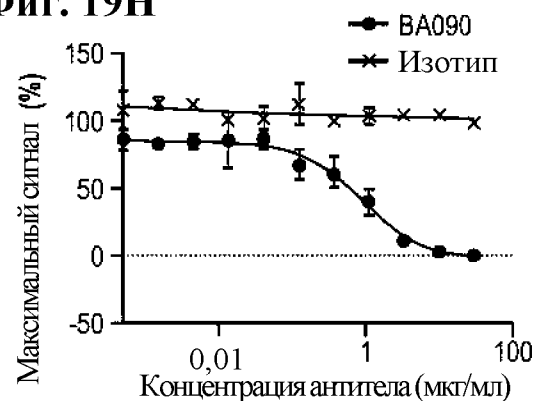


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими изоформу 2 CD96 яванского макака

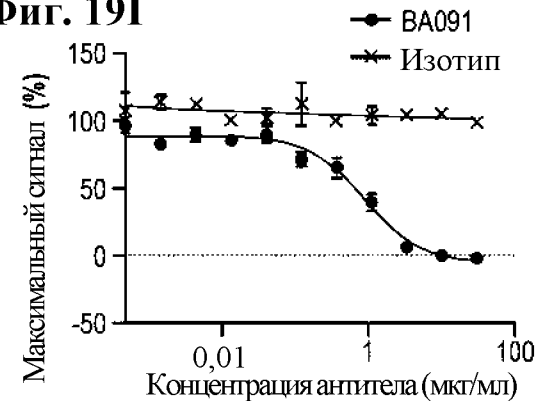
Фиг. 19G



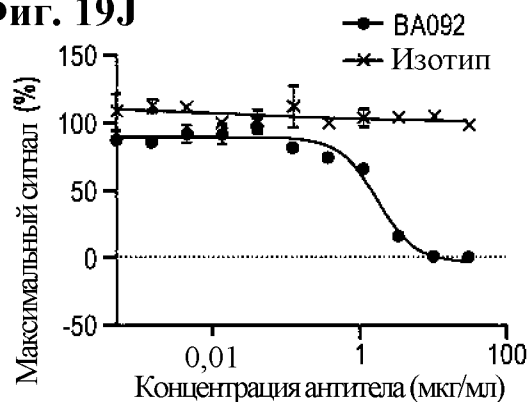
Фиг. 19H



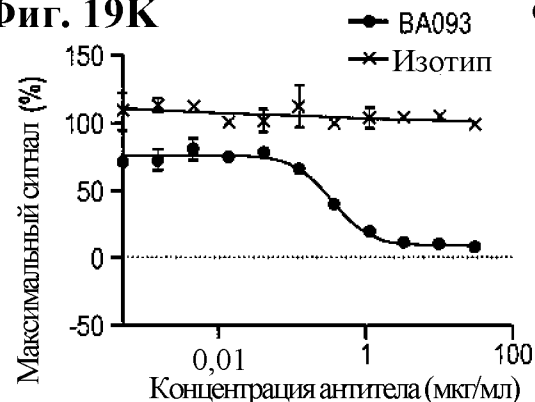
Фиг. 19I



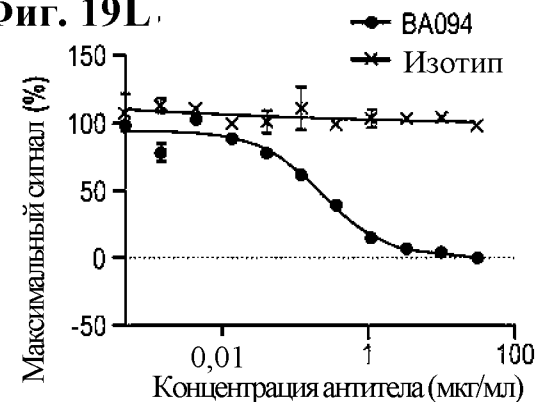
Фиг. 19J



Фиг. 19K

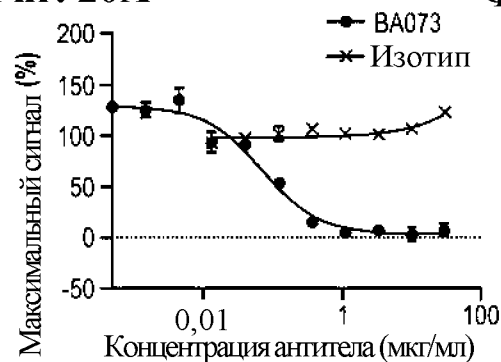


Фиг. 19L

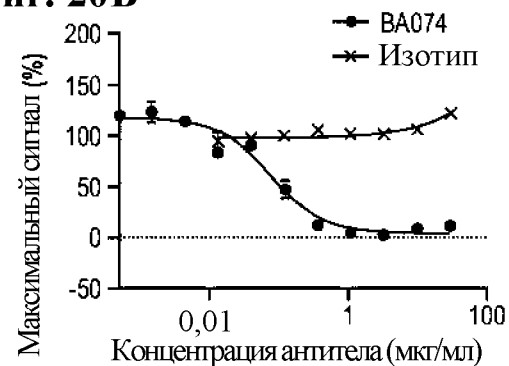


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими изоформу 1 CD96 яванского макака

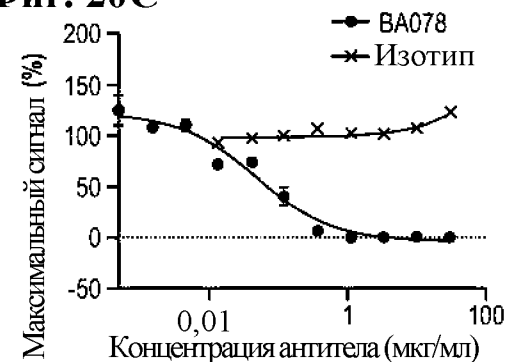
Фиг. 20А



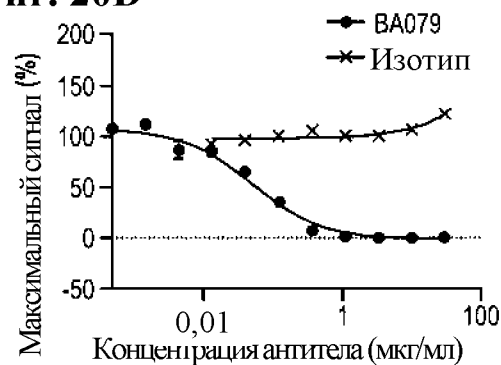
Фиг. 20В



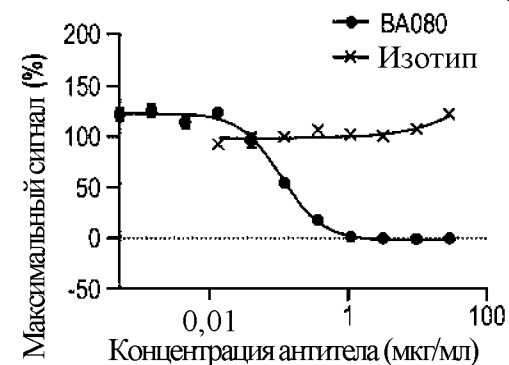
Фиг. 20С



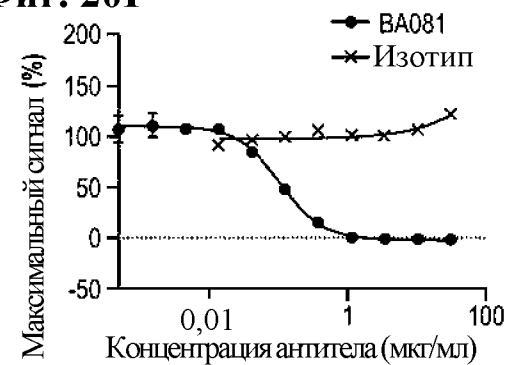
Фиг. 20D



Фиг. 20Е

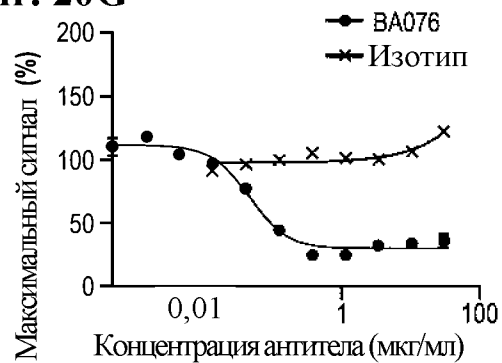


Фиг. 20F

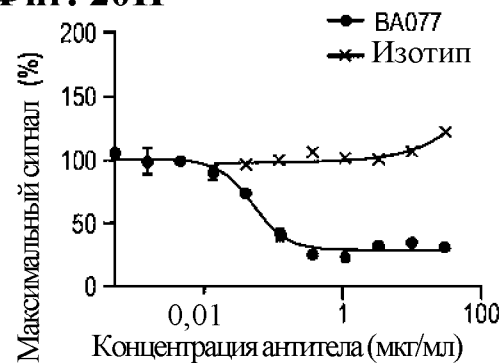


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими изоформу 1 CD96 яванского макака

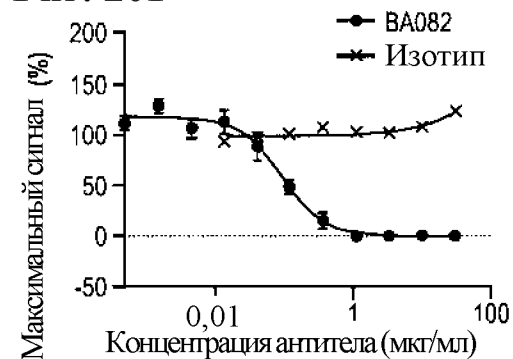
Фиг. 20G



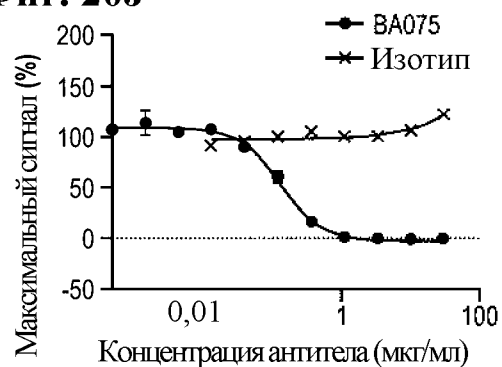
Фиг. 20H



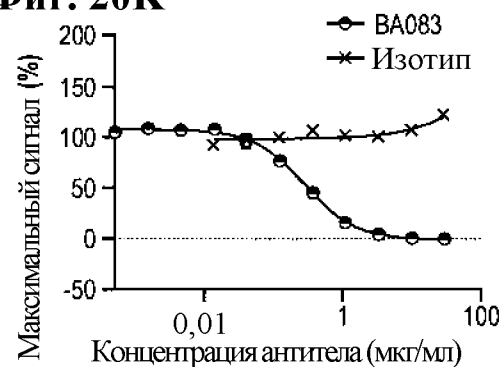
Фиг. 20I



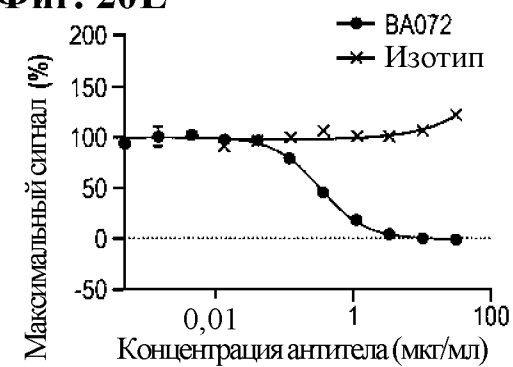
Фиг. 20J



Фиг. 20K

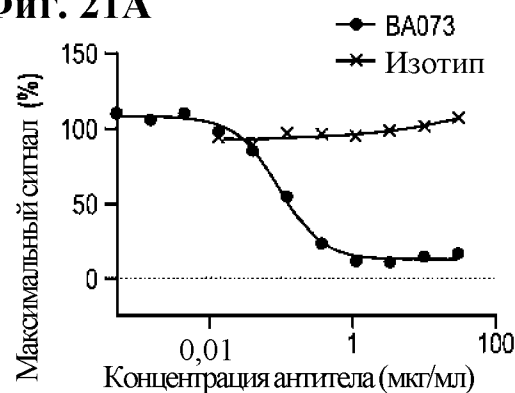


Фиг. 20L

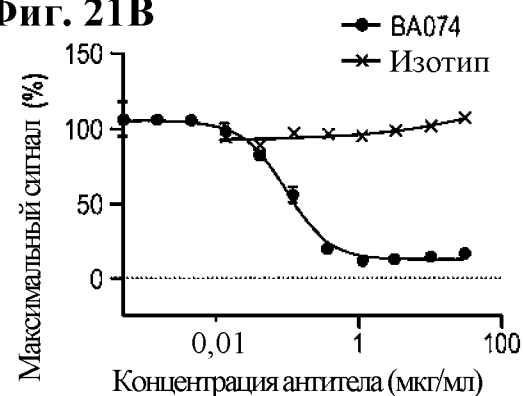


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими изоформу 2 CD96 яванского макака

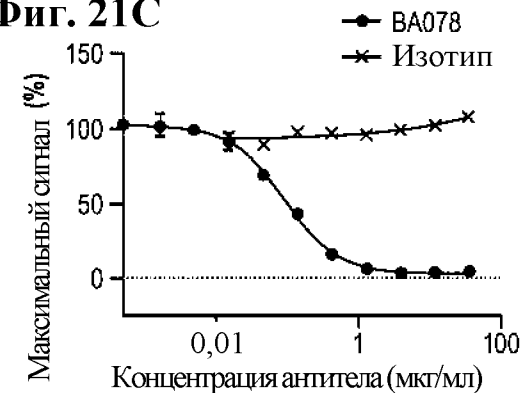
Фиг. 21А



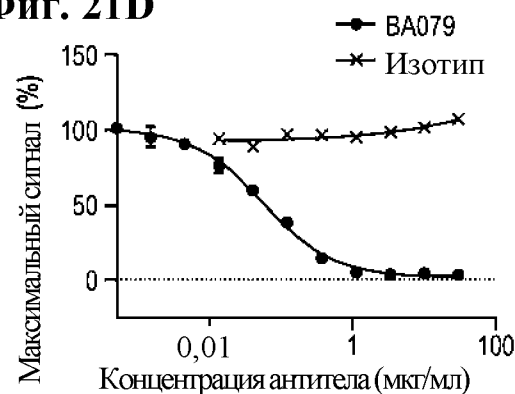
Фиг. 21В



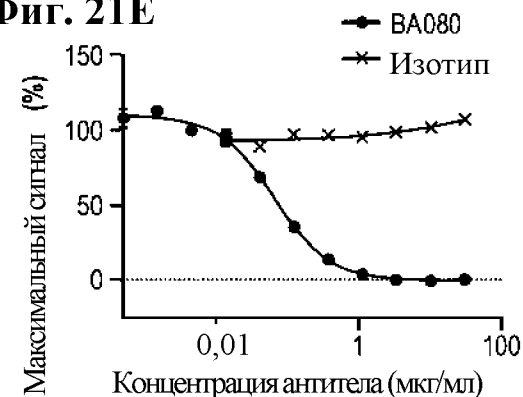
Фиг. 21С



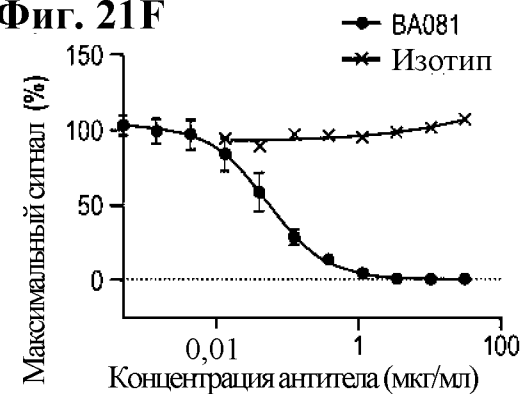
Фиг. 21D



Фиг. 21Е

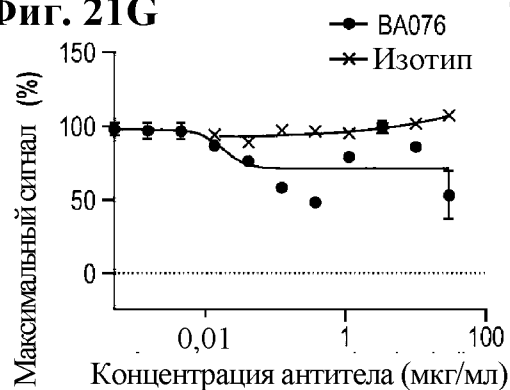


Фиг. 21F

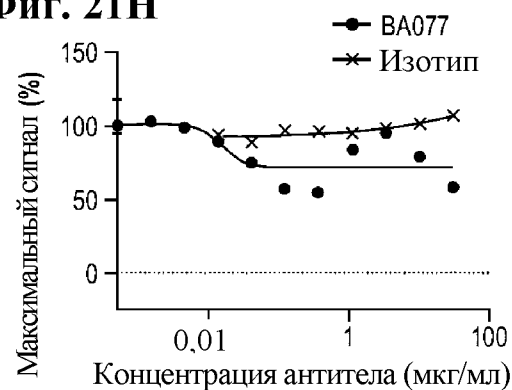


Блокирование с помощью антител к CD96 связывания между PVR-Fc и клетками CHO, экспрессирующими изоформу 2 CD96 яванского макака

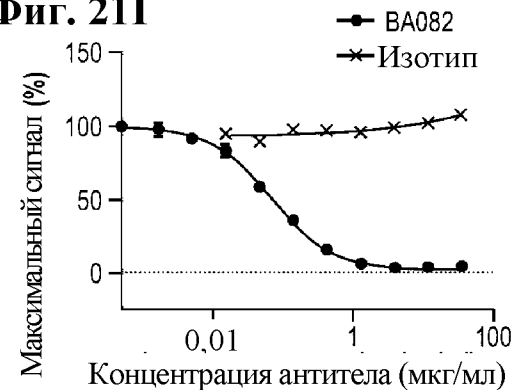
Фиг. 21G



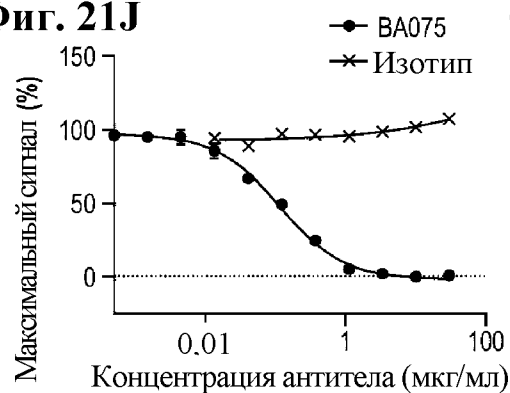
Фиг. 21H



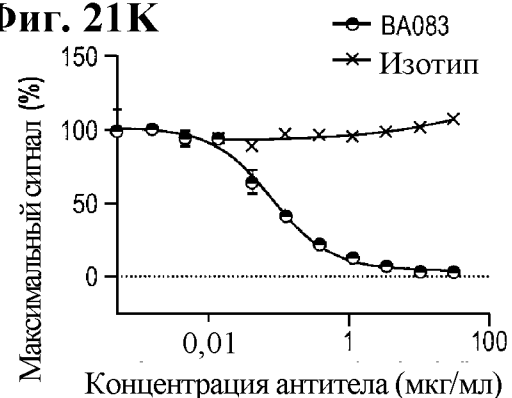
Фиг. 21I



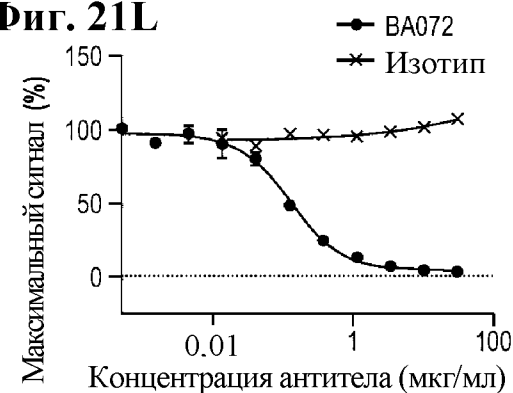
Фиг. 21J



Фиг. 21K



Фиг. 21L

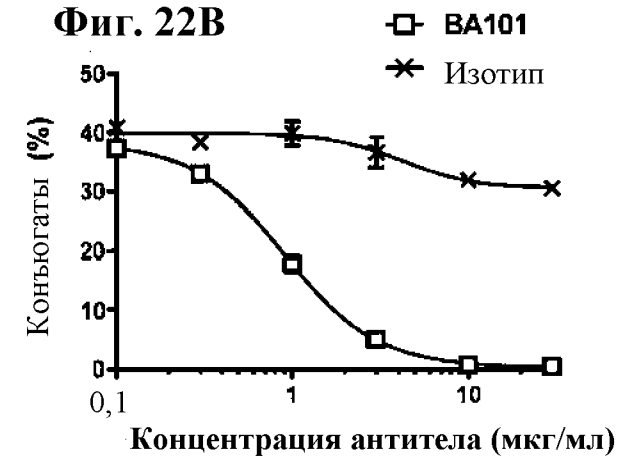


Блокирование с помощью исходных антител к CD96 конъюгирования между клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96, или PVR

Фиг. 22А



Фиг. 22В

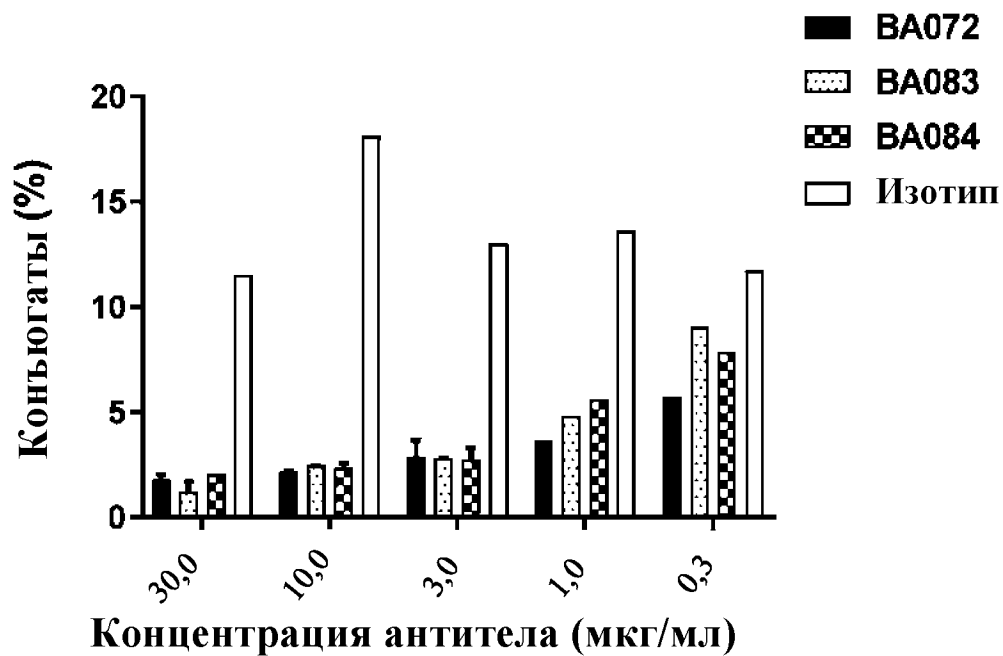


Фиг. 22С



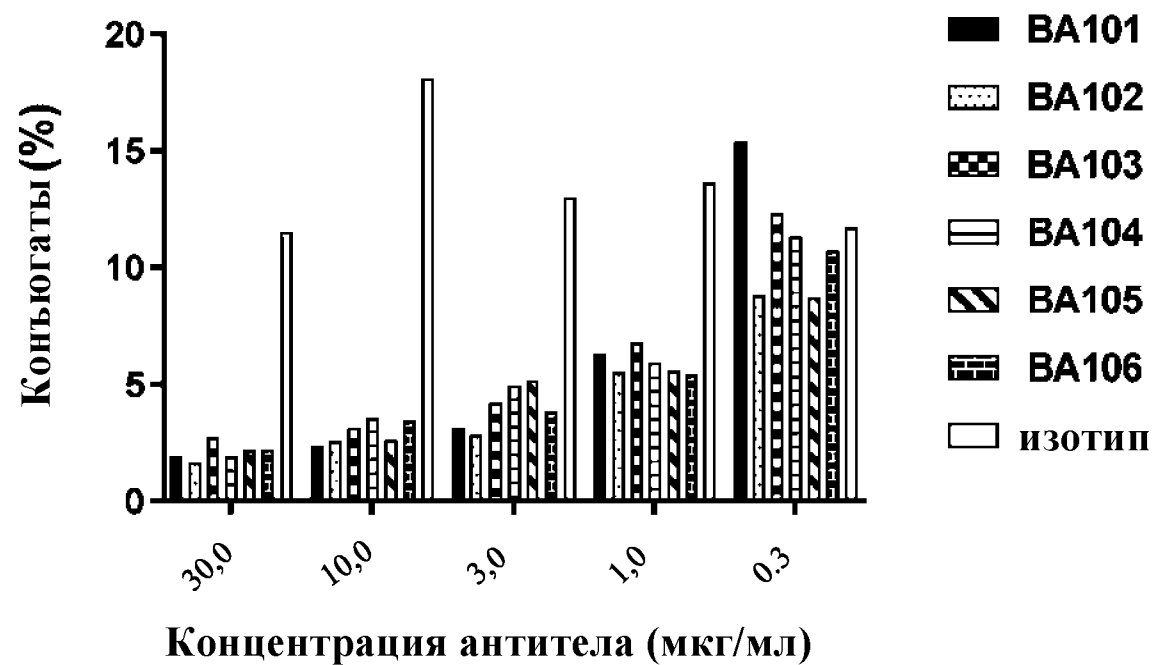
Фиг. 23

Блокирование с помощью антител к CD96 конъюгирования между клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96, или PVR



Фиг. 24

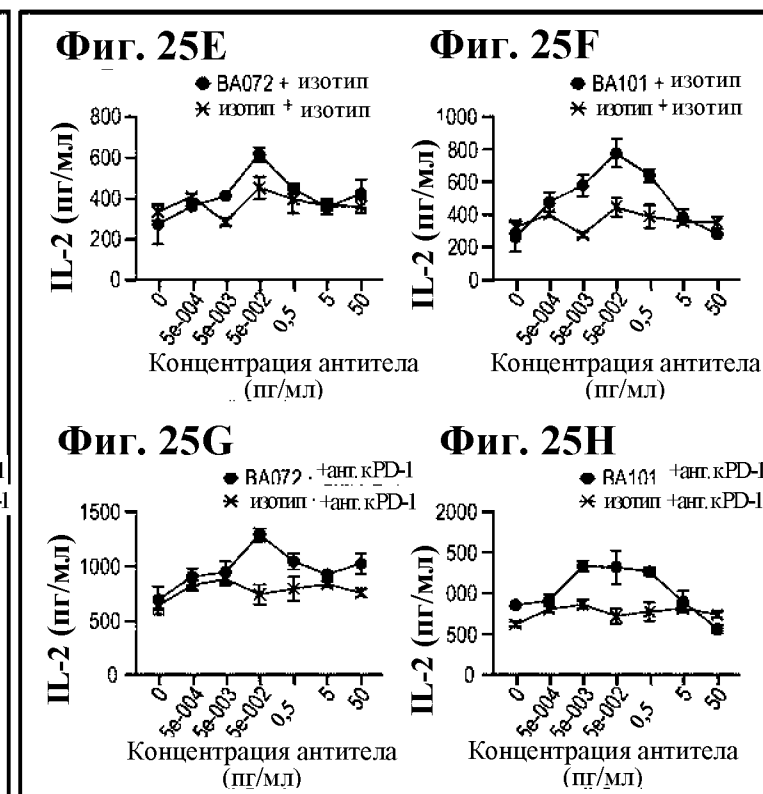
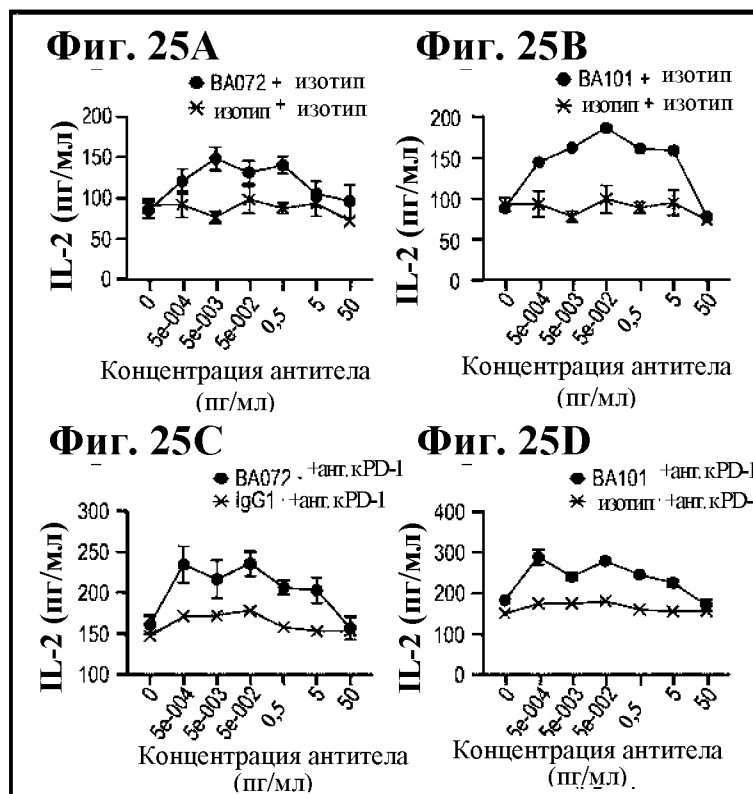
Блокирование с помощью антител к CD96 конъюгирования между клетками CHO, экспрессирующими человеческую изоформу 2 CD96, или PVR



Ответы Т-клеток с исходными антителами к CD96 в анализе совместной культуры
первичных Т-клеток: APC у двух разных доноров в отношении диапазона доз

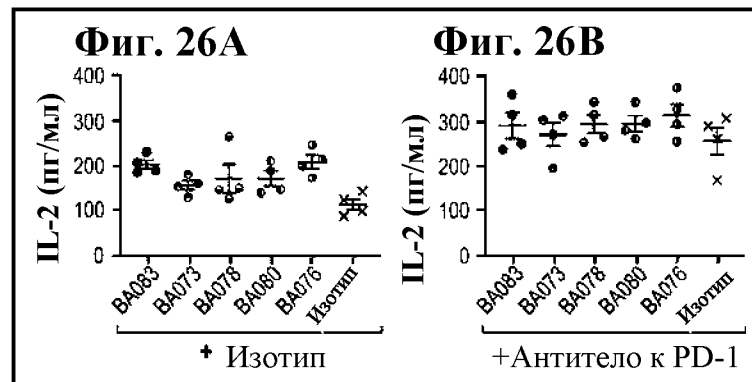
Донор 1

Донор 2

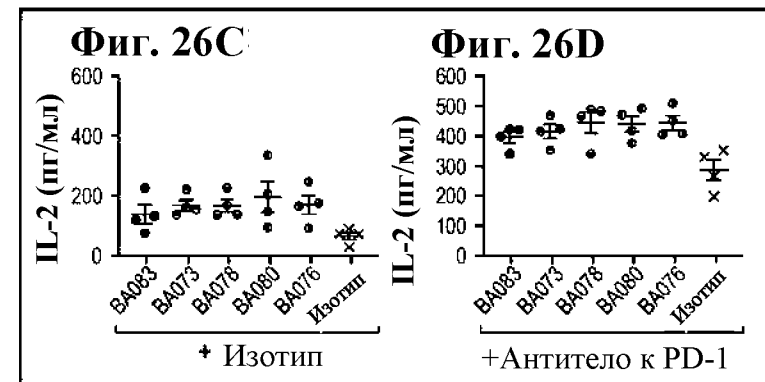


Ответы Т-клеток с антителами к CD96 в анализе совместной культуры первичных Т-клеток:
АРС у трех разных доноров

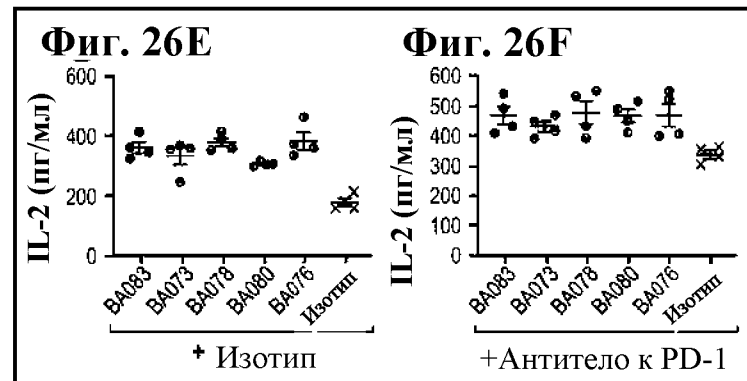
Донор 1



Донор 2

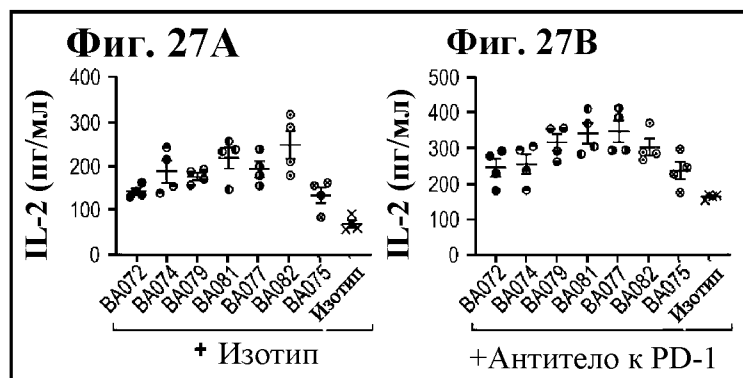


Донор 3

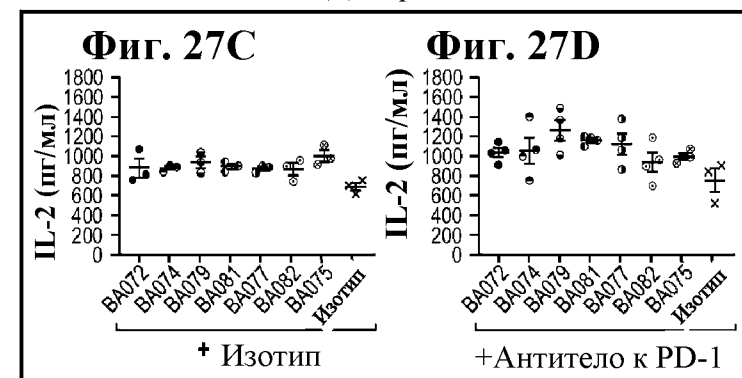


Ответы Т-клеток с антителами к CD96 в анализе совместной культуры первичных Т-клеток:
АРС у трех разных доноров

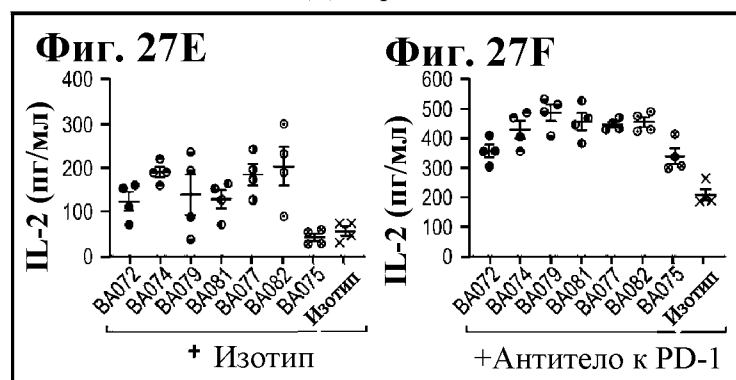
Донор 1



Донор 2

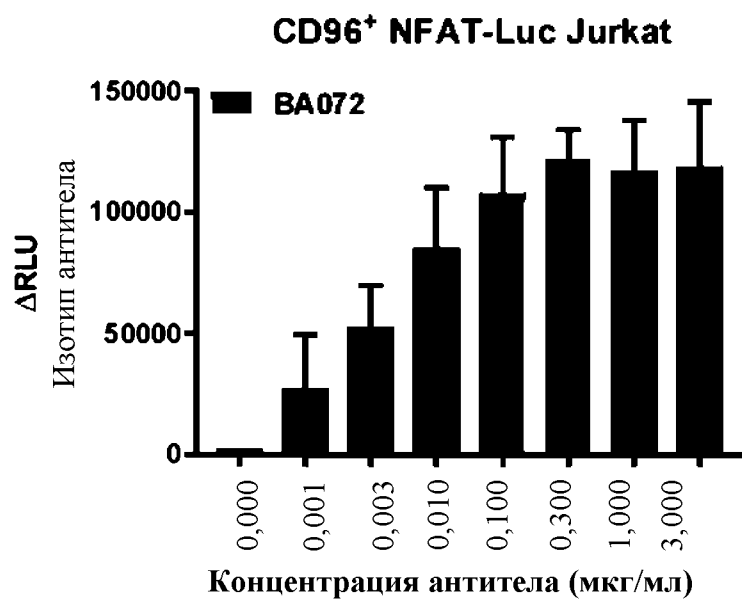


Донор 3

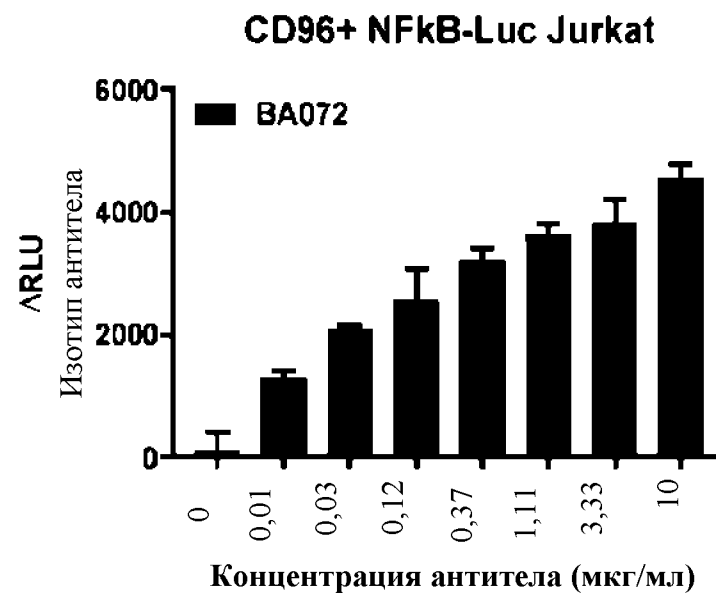


Передача сигналов TCR-NFAT и NF κ B в анализах с человеческими репортерными CD96⁺ T-клетками

Фиг. 28А

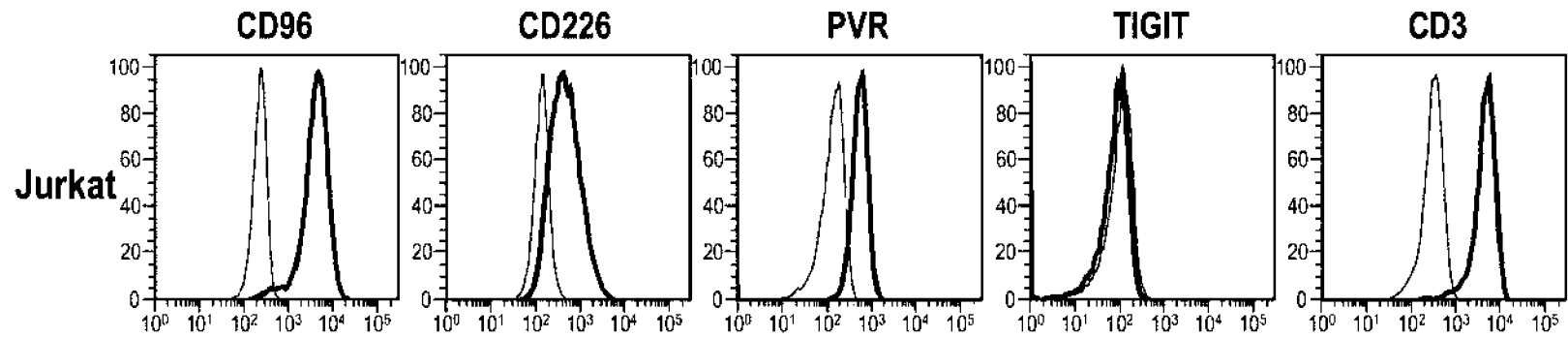


Фиг. 28В

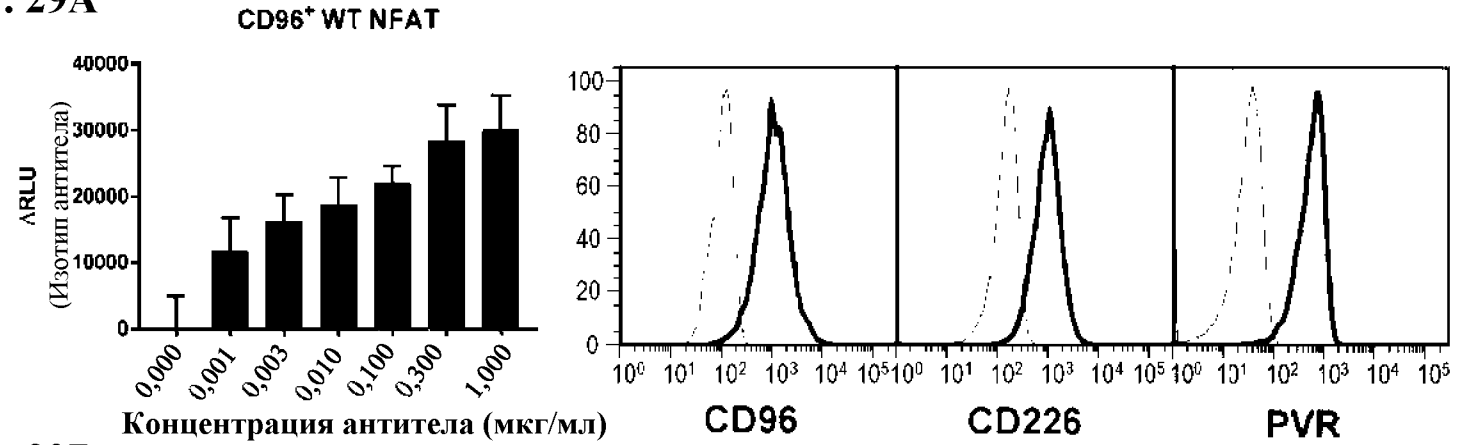


Передача сигналов TCR-NFAT и NFkB в анализах с человеческими репортерными CD96⁺ Т-клетками

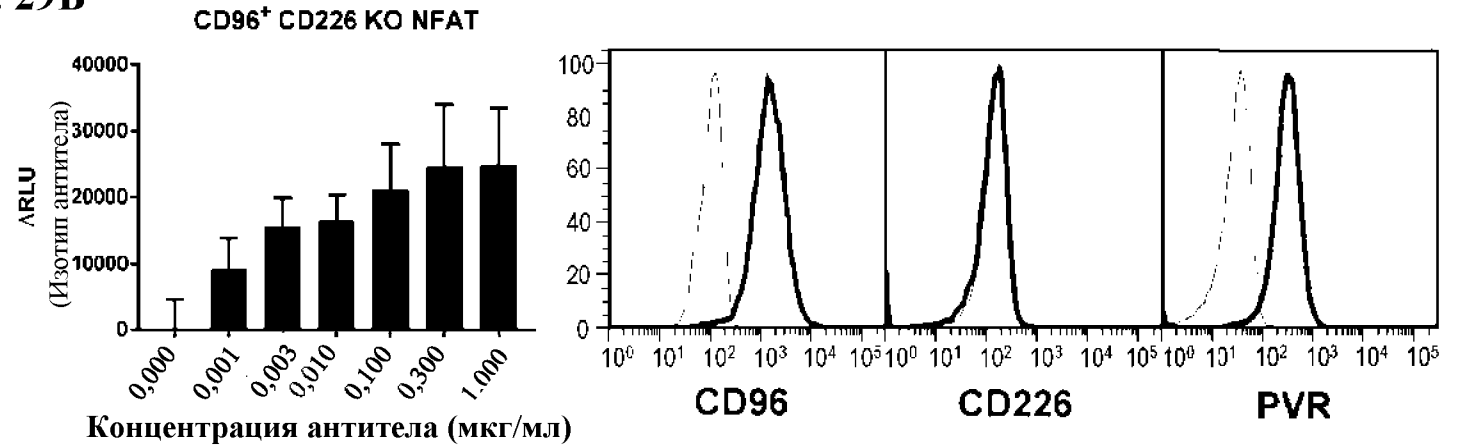
Фиг. 28С



Фиг. 29А Передача сигнала TCR-NFAT в клетках с экспрессией CD226 и без нее

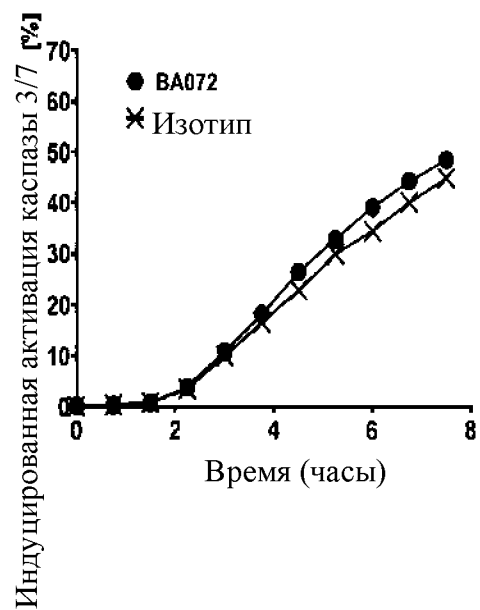


Фиг. 29В

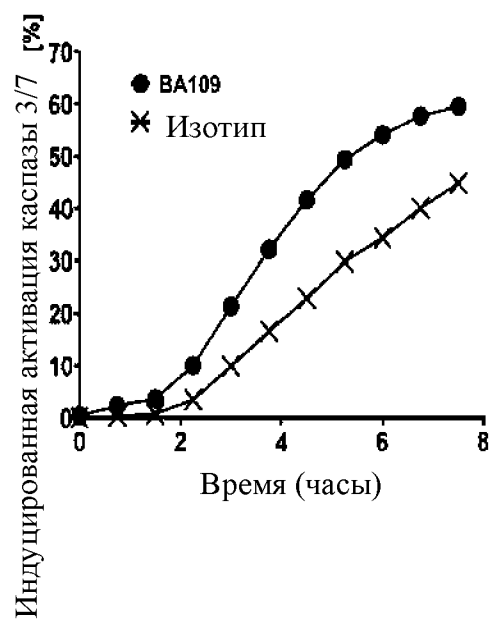


Индукция ADCC с помощью Fc-вариантов антител к CD96

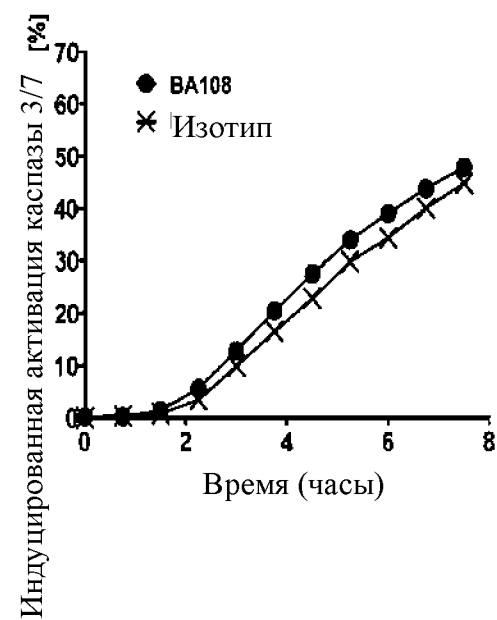
Фиг. 30А



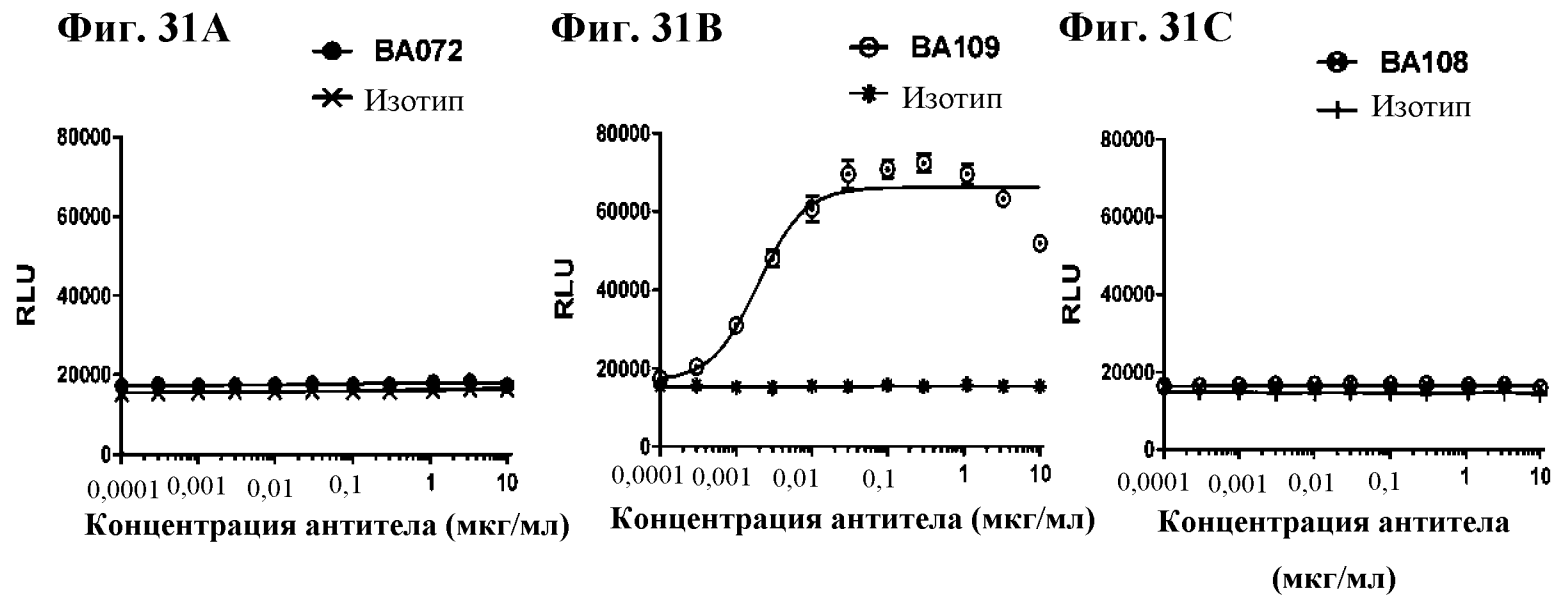
Фиг. 30В



Фиг. 30С

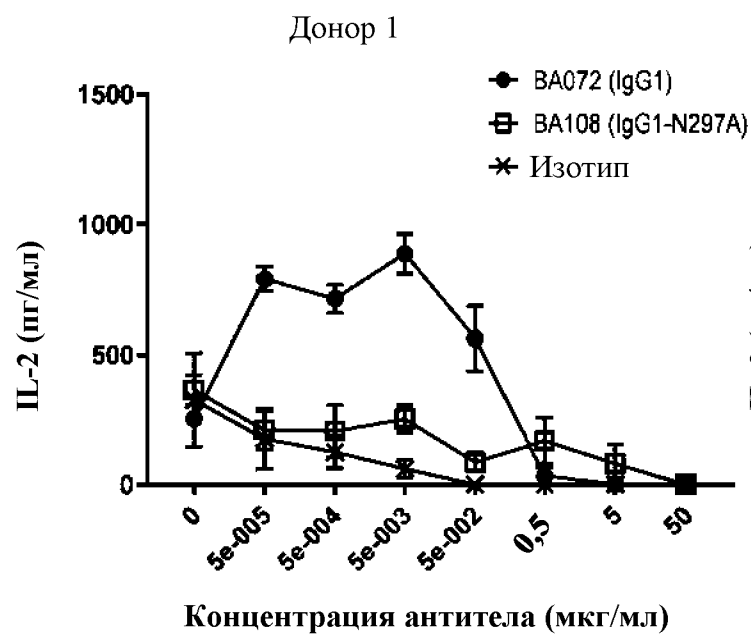


Передача сигнала с помощью Fc-вариантов антител к CD96 в линии репортерных клеток Jurkat

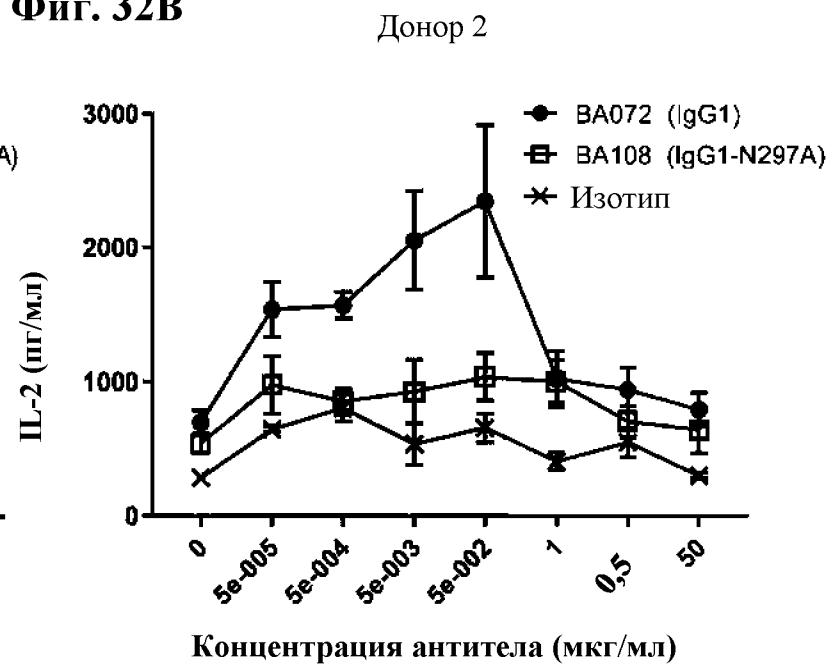


Опосредованное антителом к CD96 продуцирование IL-2 в анализе совместной культуры Т-клеток: APC

Фиг. 32А

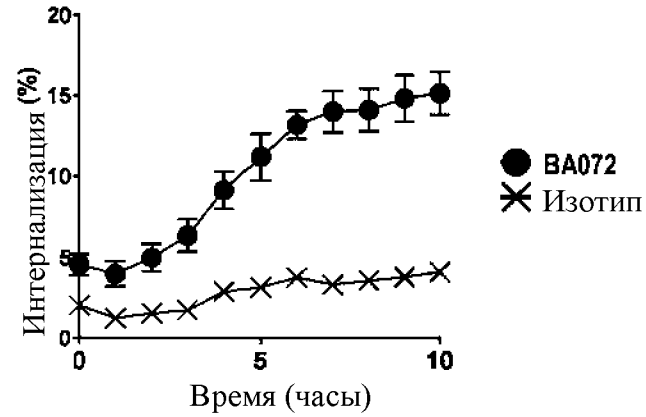


Фиг. 32В

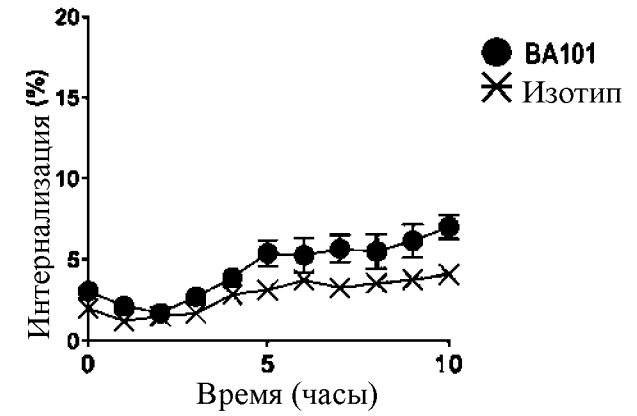


Интернализация CD96 в сверхэкспрессирующих CD96 клетках Jurkat

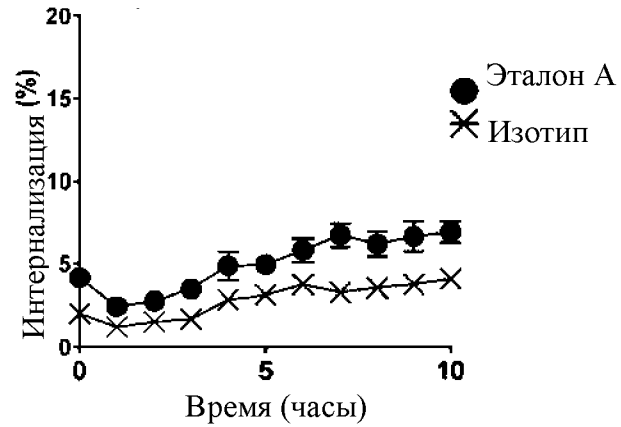
Фиг. 33А



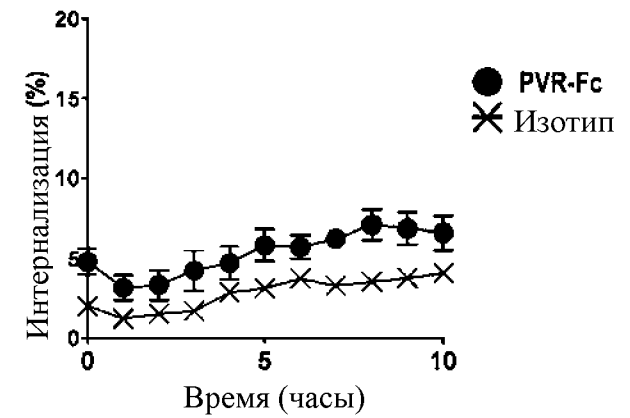
Фиг. 33В



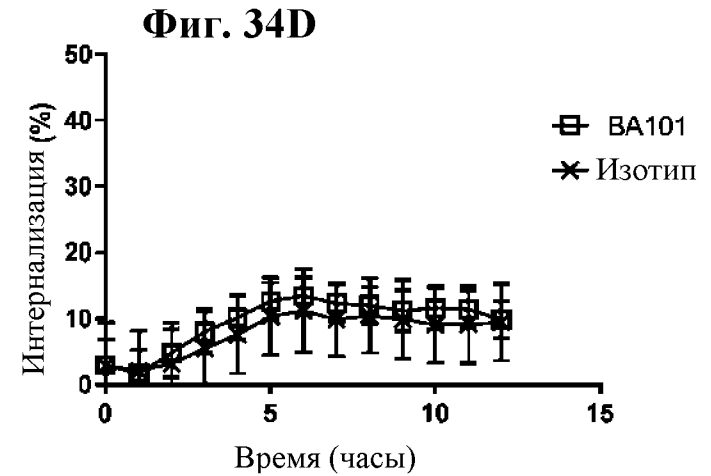
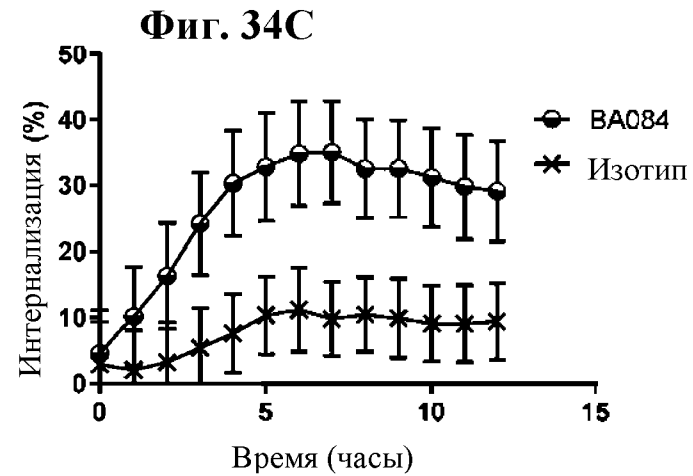
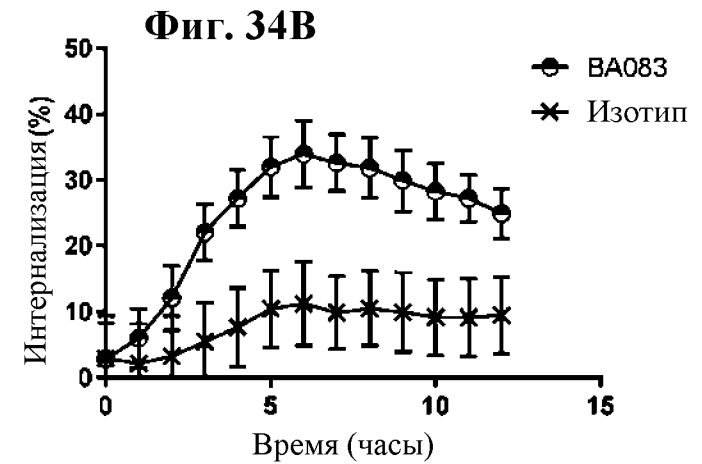
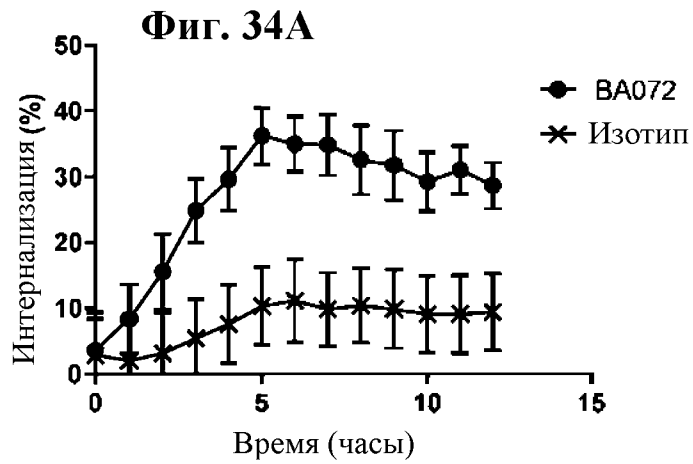
Фиг. 33С



Фиг. 33Д



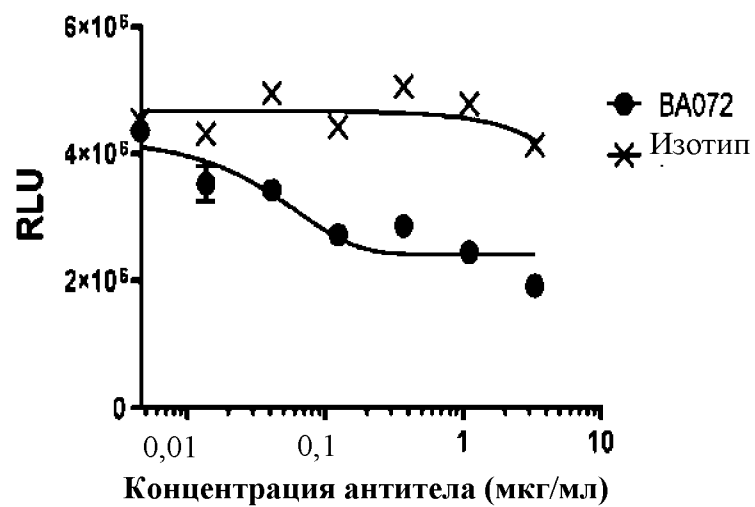
Интернализация CD96 в сверхэкспрессирующих CD96 клетках Jurkat



Опосредованная антителом к CD96 интернализация в первичных Т-клетках

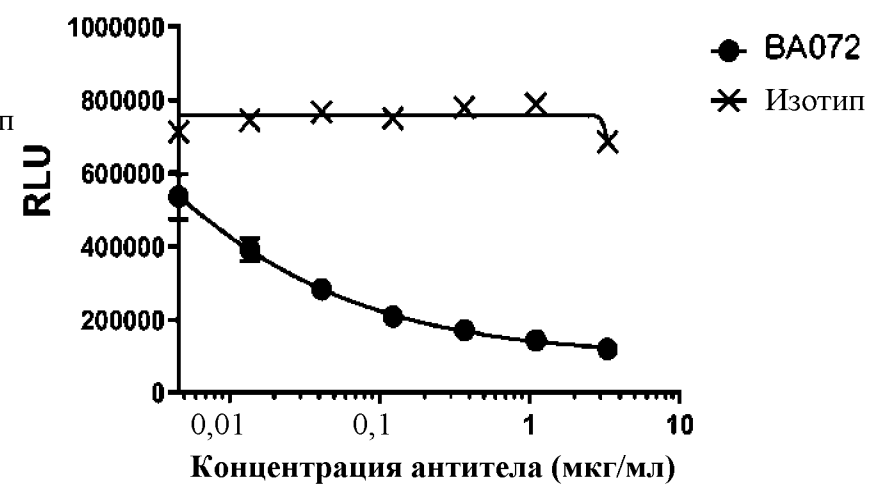
Фиг. 35А

Донор 1

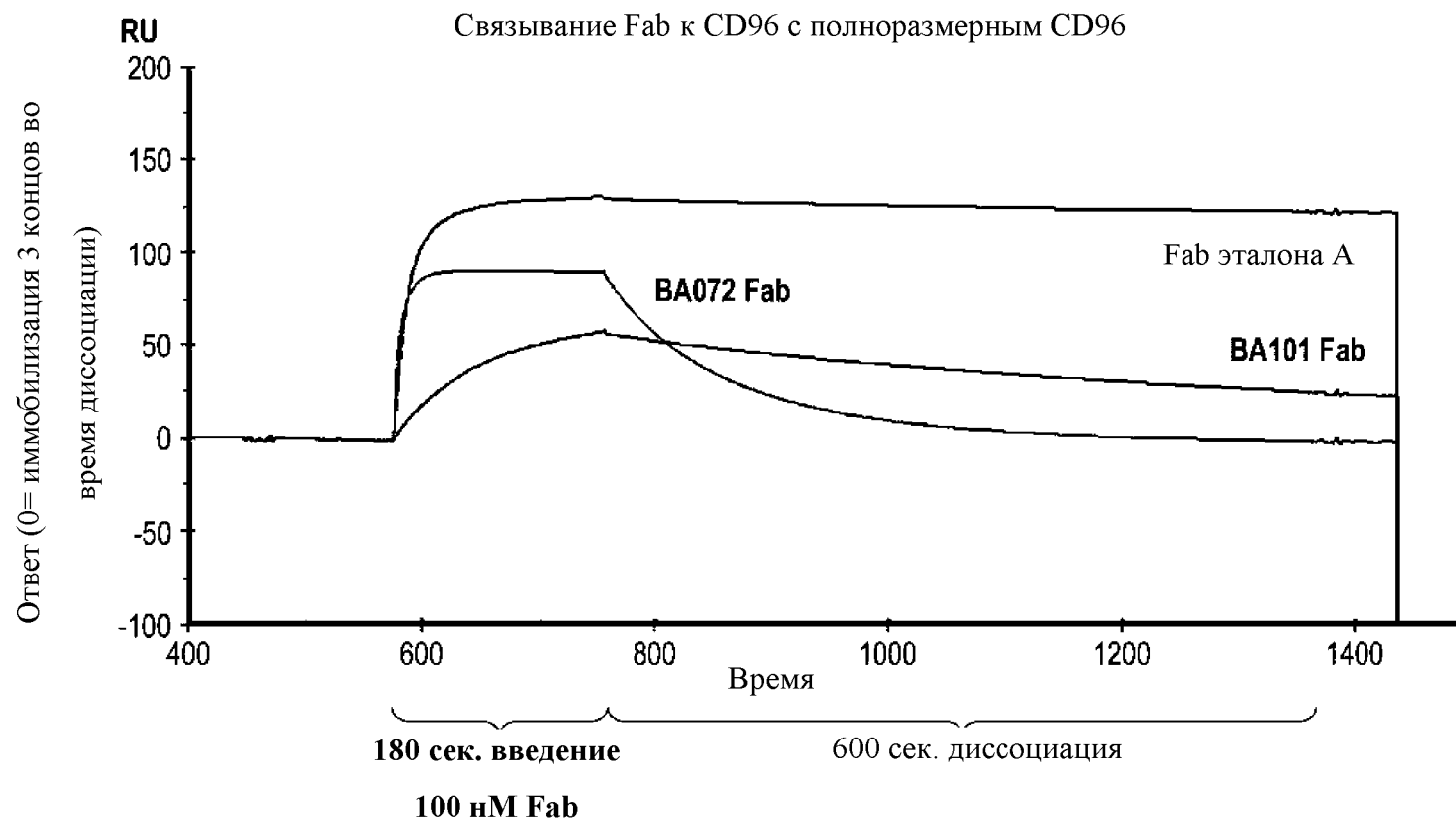


Фиг. 35В

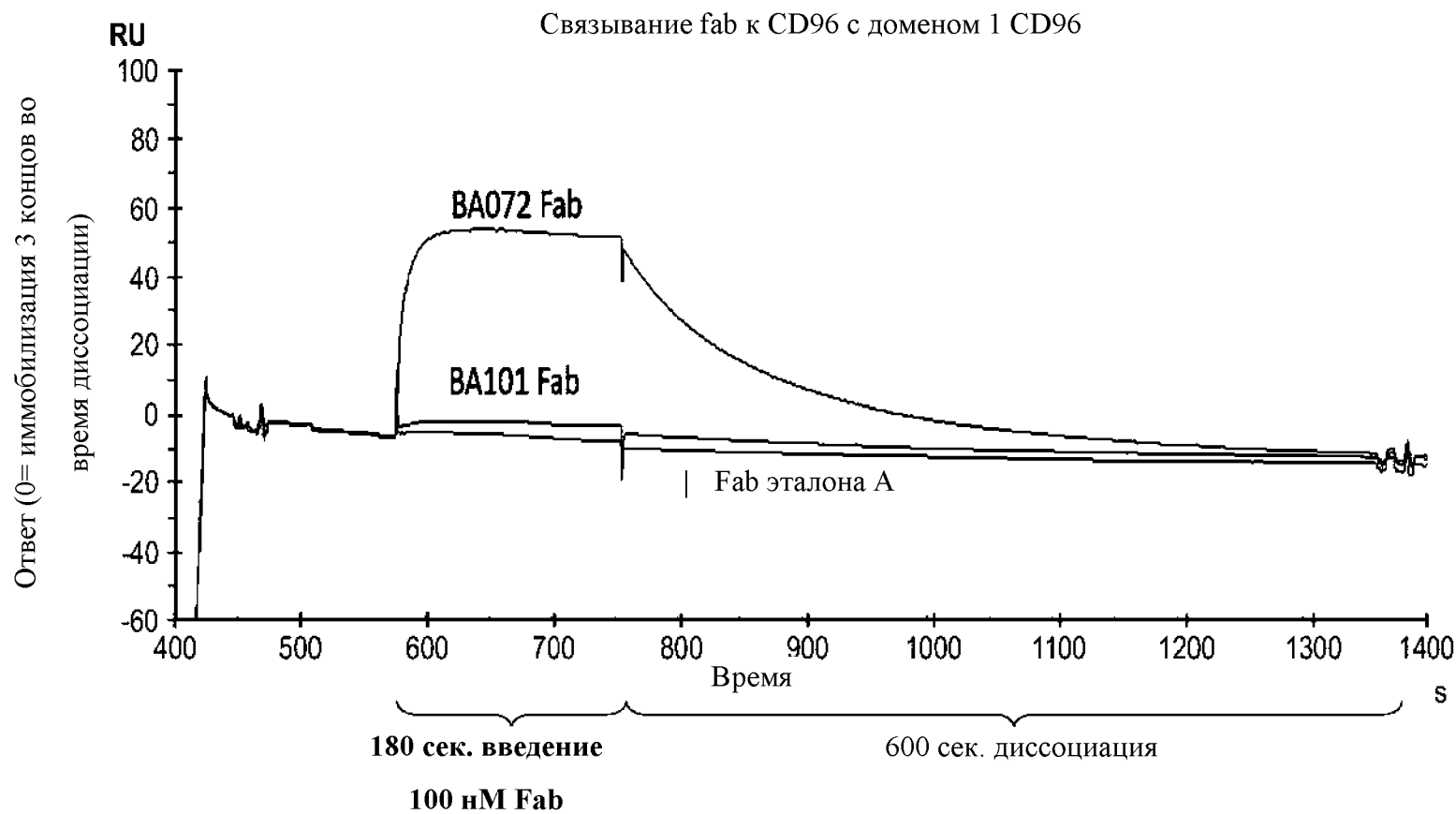
Донор 2



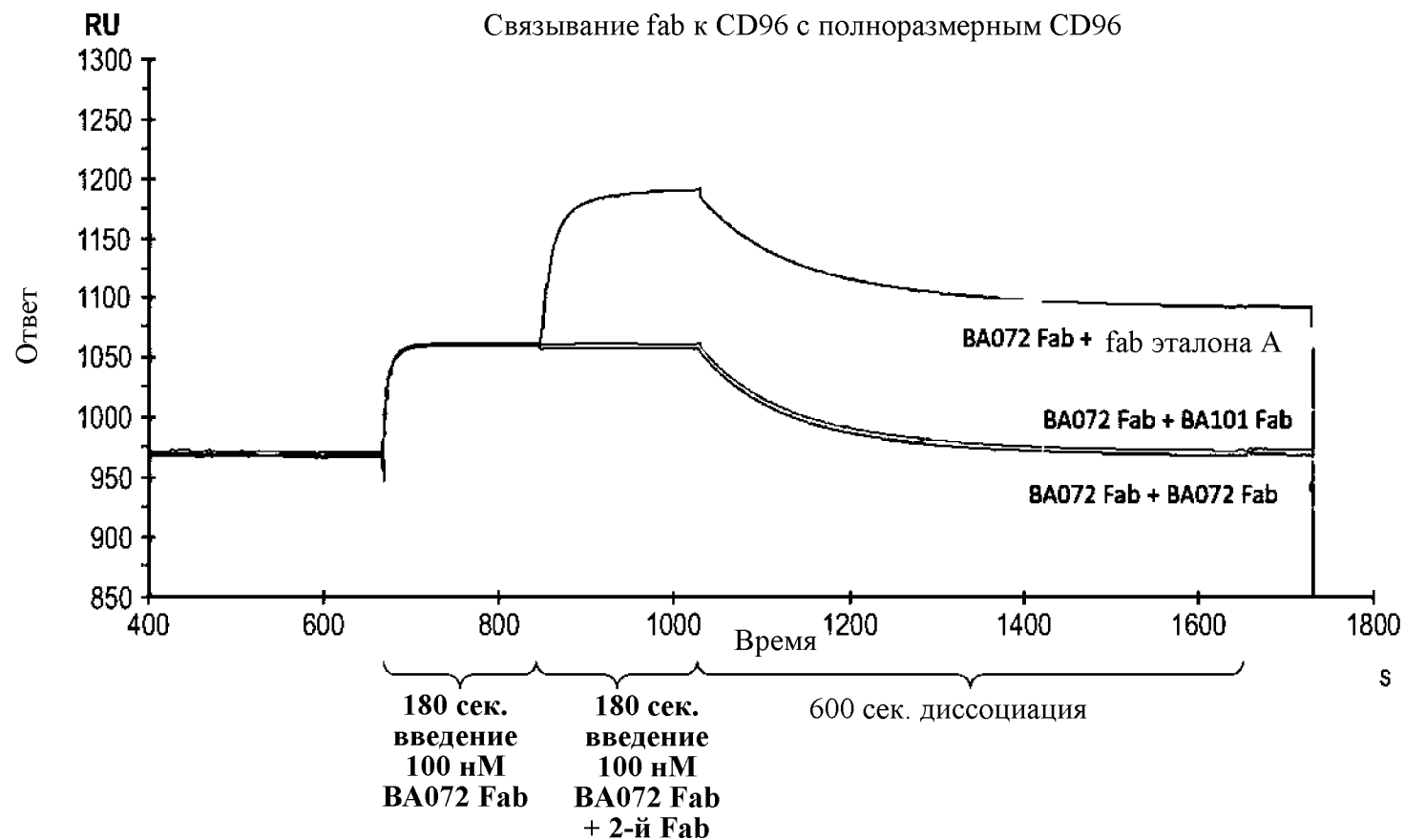
Фиг. 36А



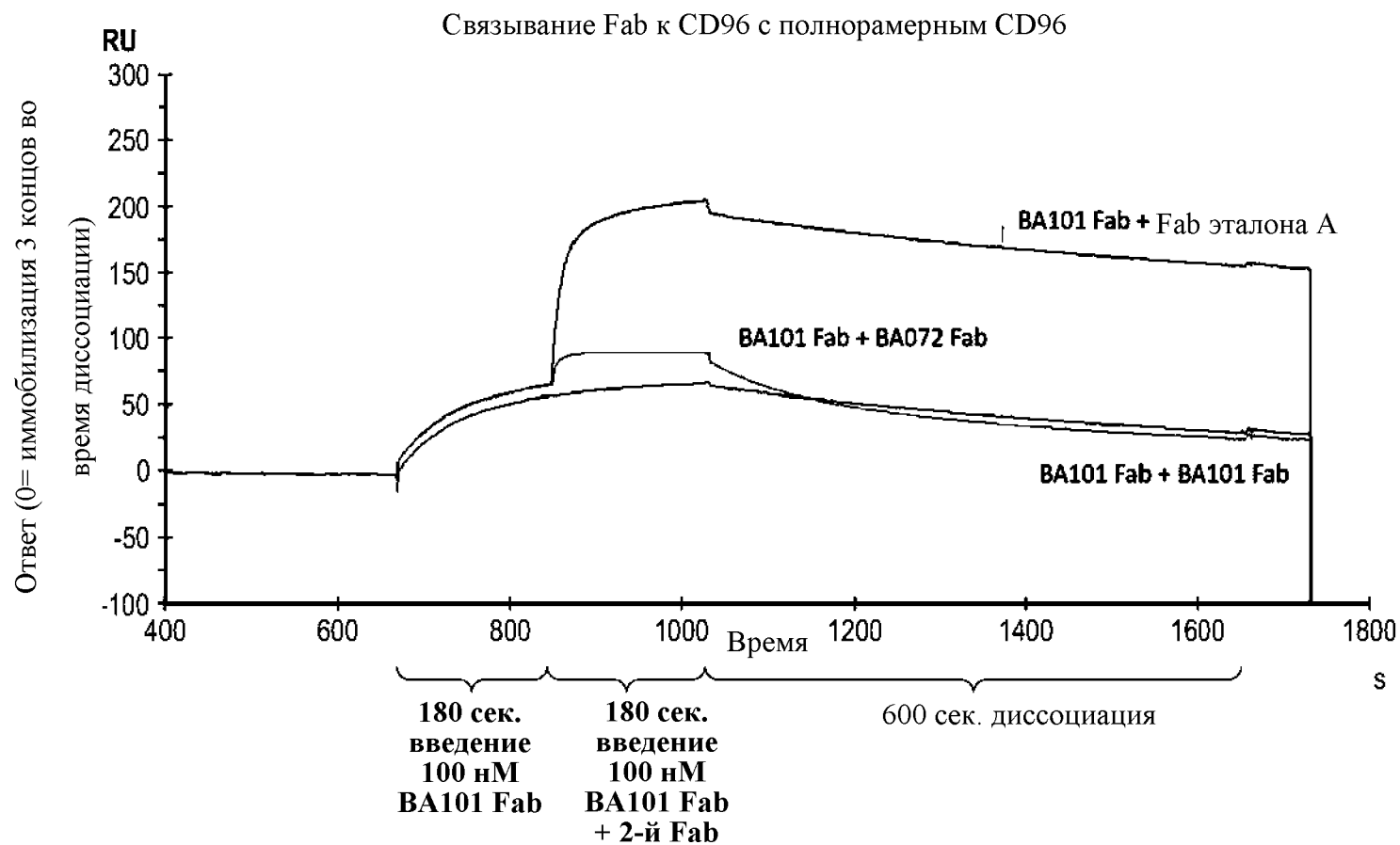
Фиг. 36В



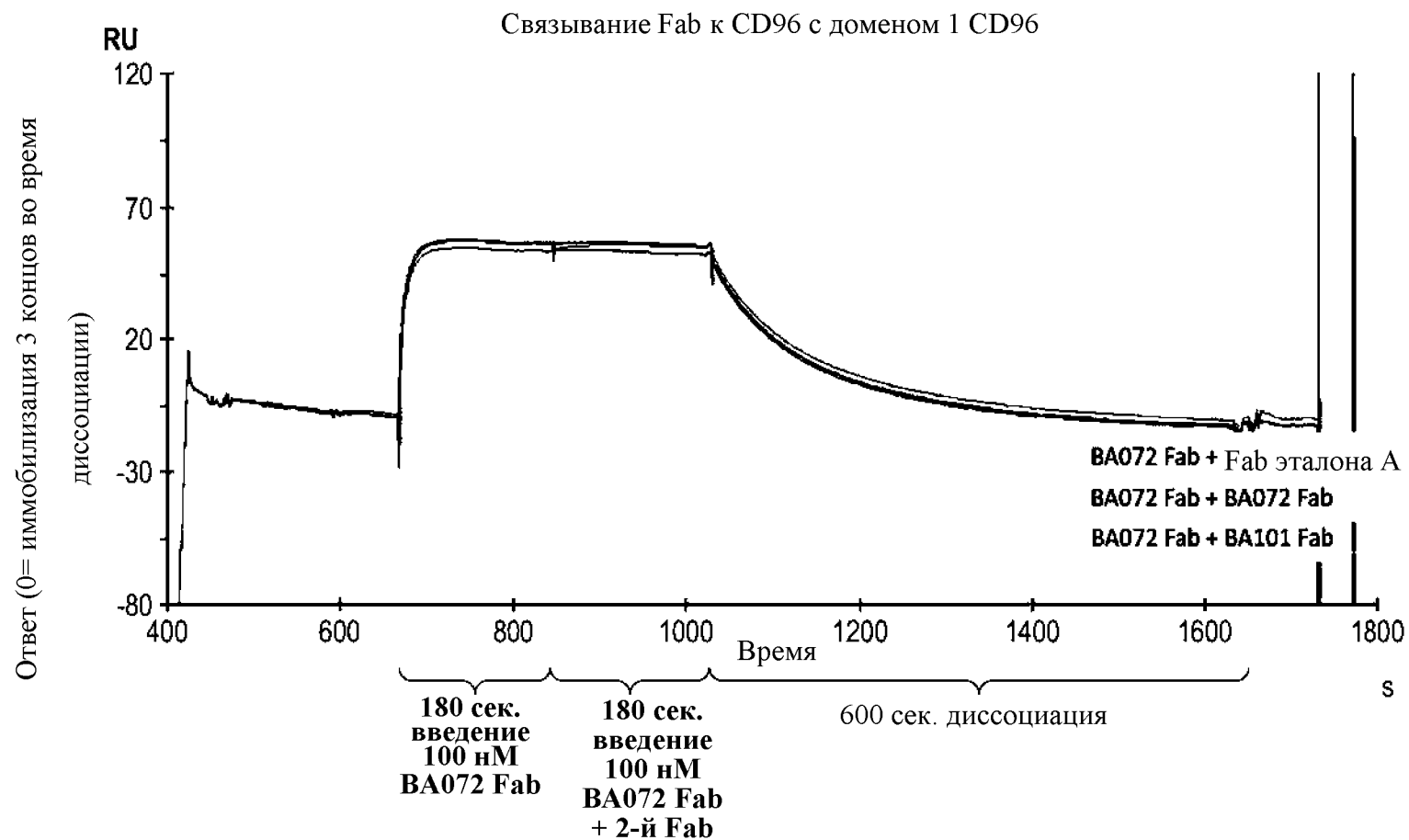
Фиг. 37А



Фиг. 37В



Фиг. 37С



Фиг. 37D

