

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042707**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.16

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892616

(22) Дата подачи заявки
2017.05.17

(54) АНТИТЕЛО К PD1, СПОСОБЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ

(31) EP16170174.3

(56) WO-A2-2014179664
WO-A2-2010019570
WO-A1-2015069571
WO-A1-2014140180
WO-A1-2015138920

(32) 2016.05.18

(33) EP

(43) 2019.05.31

(86) PCT/EP2017/061901

(87) WO 2017/198741 2017.11.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Цетгль Маркус (DE), Лоренц Иво
(US), Шааф Отмар, Вурм Мелани
(DE), Форген Жан-Франсуа (CA),
Бродёр Скотт, Кэнада Кит Э.,
Хлевицкий Лукаш (US), Дэвидсон
Уолтер Кэрролл (умер), Гупта
Панкадж, Гупта Приянка, Перес
Росио К., Уоска Джозеф Роберт, мл.,
Сяо Хайгуан, Ян Даньлинь (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к новым молекулам антител к PD1. Изобретение относится также к нуклеиновым кислотам, кодирующим такие молекулы антител, экспрессионному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанное антитело; к способам получения таких молекул антител; к клеткам-хозяевам, экспрессирующим или способным экспрессировать такие молекулы антител; к фармацевтическим композициям или наборам, содержащим такие молекулы антител; к применению таких молекул антител для терапевтических целей для лечения злокачественных заболеваний и способам лечения с их помощью.

042707 B1

042707 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым молекулам антител к PD1 и к LAG3. Изобретение относится также к нуклеиновым кислотам, кодирующим такие молекулы антител; к способам приготовления таких молекул антител; к клеткам-хозяевам, экспрессирующим или способным экспрессировать такие молекулы антител; к композициям, содержащим такие молекулы антител; и к применениям таких молекул антител или таких композиций, в особенности, для терапевтических целей в области злокачественных заболеваний.

Предпосылки создания изобретения

Злокачественное новообразование представляет собой заболевание, которое характеризуется аномально локализованным клеточным ростом с потенциалом распространения в организме. В экономически развитых странах он является второй наиболее распространенной причиной смертности. Наиболее распространенными типами злокачественных новообразований у мужчин являются рак легких, рак предстательной железы, рак ободочной и прямой кишки, и рак желудка, и у женщин, наиболее распространенными типами являются рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак легких, и рак шейки матки. Несмотря на то, что шансы на выживание зависят главным образом от типа злокачественного новообразования и стадии на момент идентификации, для рака легких суммарный 10-ти летний коэффициент выживаемости составляет около 5%.

Ранее, наиболее частыми методами лечения опухолевых злокачественных новообразований (объединенных термином "онкология") являлись непосредственная хирургия, лучевая терапия или применение химиотерапевтических лекарственных средств. Тем не менее, за несколько последних лет, иммунотерапия злокачественных новообразований часто зарекомендовала себя как более перспективная в качестве метода терапии для онкологии.

Иммунотерапия злокачественных новообразований является направлением в онкологии, в котором иммунную систему используют для лечения злокачественного новообразования, что кардинально отличается от существующих общепринятых методов лечения, при которых опухоль непосредственно иссекают или лечат. Эта терапевтическая концепция основана на идентификации различных белков на поверхности Т-клеток, которые действуют путем ингибирования иммунной функции этих клеток. К таким белкам относятся PD1.

PD1 (Запрограммированная гибель клеток 1) представляет собой белок рецептора клеточной поверхности, экспрессируемого на Т-клетках. Этот белок функционирует в качестве ингибитора "контрольной точки иммунного ответа", т.е. он действует путем модуляции активности клеток в иммунной системе таким образом, чтобы регулировать и ограничивать аутоиммунные заболевания. В последнее время было установлено, что многие злокачественные новообразования могут защищать себя от иммунной системы путем модификации ингибиторов "контрольной точки иммунного ответа" и таким образом избегать обнаружения.

По отношению к PD1, этот белок имеет два лиганда, PD-L1 и PD-L2, которые взаимодействуют с рецептором клеточной поверхности. При связывании, PD-1 индуцирует внутриклеточный сигнал, который отрицательно регулирует Т-клеточный ответ.

Как подробно обсуждалось выше, PD1 является ключевым регулятором активности Т-клеток. Недавно было показано в различных злокачественных параметрах, что молекулы антагонистических антител к PD-1 ниволумаб и пембролизумаб могут использоваться для стимуляции иммунной системы, и, следовательно, лечения злокачественного новообразования.

Ген, активирующий лимфоциты-3 (LAG3; CD223), представляет собой трансмембранный белок I типа, экспрессируемый главным образом на клеточной поверхности активированных Т-клеток, но также он был обнаружен на поднаборах NK и дендритных клеток LAG3 тесно связан с CD4, который является ко-рецептором для активации Т-хелперных клеток. Обе молекулы имеют четыре внеклеточных Ig-подобных домена и для их функциональной активности, должны связываться с их лигандом, из класса II главного комплекса гистосовместимости (МНС). При связывании с МНС-II, LAG3 индуцирует внутриклеточный сигнал, который отрицательно регулирует Т-клеточную ответную реакцию. В недавних исследованиях было показано, что LAG3 и PD1 совместно экспрессируются в лимфоцитах, инфильтрующих опухоли (TIL), что свидетельствует о том, что они могут способствовать опосредуемой опухолью иммунной супрессии. Полагают, что хроническое воздействие антигенов приводит к прогрессирующей инактивации Т-клеток посредством процесса, обозначаемого термином "истощение". Истощенные Т-клетки часто совместно экспрессируют отрицательные регуляторные рецепторы, такие как PD1 и LAG3.

Несмотря на обнадеживающие клинические результаты для антагонистических к PD1 моноклональных антител ниволумаба и пембролизумаба, вплоть до 70% леченных пациентов не отвечают на лечение. Данные доклинических исследований на основании Т-клеток, полученных от пациентов, а также на моделях сингенных опухолей у мышей было показано, что Т-клетки, имеющие происхождение из опухолей, часто экспрессируют другие ингибиторные рецепторы, дополнительно к PD1. При комбинированной нейтрализации PD1 и LAG3, используя антагонистические моноклональные молекулы антител, повышается реактивация Т-клеток и улучшается отторжение опухоли по сравнению с PD1 нейтрализацией отдельно, на моделях *in vitro* и *in vivo*. На основании этих результатов, полагают, что нейтрализация LAG3 будет усиливать эффективности антагонистических PD1 mAb.

Тем не менее, для представленных молекул антител к PD1 существуют проблемы, связанные с неспособностью большей части пациентов отвечать на лечение. Следовательно, существует потребность идентификации более эффективных PD1 антагонистических моноклональных антител с контролируемыми профилями побочных эффектов по сравнению с известными из уровня техники существующими лекарственными средствами на основании антител, при использовании отдельно или в комбинации с другими терапевтическими молекулами, в особенности, дополнительными антагонистическими молекулами к дальнейшим ингибиторам контрольных точек Т-клеток.

На основании этих предпосылок, изобретатели предполагают создать дальнейшие антитела к PD1 и к LAG3, имеющие улучшенный терапевтический профиль по сравнению с известными молекулами.

Краткое изложение сущности изобретения

В соответствии с первым аспектом, обеспечиваются молекулы антител к PD1. Как описано далее в настоящей заявке, молекулы антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением имеют неожиданные и благоприятные свойства по сравнению с другими антителами к PD1. В особенности, они проявляют улучшенную активацию Т-клеток и более длительный конечный период полувыведения по сравнению с эталонными молекулами антител к PD1. Следует иметь в виду, что такие свойства являются желательными для молекул антител к PD1 для применения для лечения злокачественных новообразований.

Также обеспечиваются молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие молекулы антител к PD1, экспрессионные векторы, клетки-хозяева и способы получения молекул антител к PD1 согласно изобретению. Также обеспечиваются фармацевтические композиции, содержащие молекулы антител к PD1 согласно изобретению. Молекулы антител к PD1, описанные в настоящей заявке, можно использовать для лечения злокачественных нарушений, включая солидные опухоли и опухоли мягких тканей.

Более специфически, молекула антитела к PD1 согласно изобретению включает: (а) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 (hcCDR1), SEQ ID NO: 2 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 3 (hcCDR3) и которая имеет CDR легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 (lcCDR1), SEQ ID NO: 5 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 6 (lcCDR3); или б) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 (hcCDR1), SEQ ID NO: 8 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 9 (hcCDR3) и которая имеет CDR легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 (lcCDR1), SEQ ID NO: 11 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 12 (lcCDR3); или (в) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13 (hcCDR1), SEQ ID NO: 14 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 15 (hcCDR3) и которая имеет CDR легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16 (lcCDR1), SEQ ID NO: 17 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 18 (lcCDR3).

В соответствии с дальнейшим аспектом осуществления изобретения, также обеспечиваются молекулы антител к LAG3. Как описано далее в настоящей заявке, молекулы антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением имеют неожиданные и благоприятные свойства по сравнению с другими молекулами антител к LAG3. В особенности, они проявляют улучшенную активацию Т-клеток при использовании в комбинации с молекулами антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением по сравнению с эталонными молекулами антител к PD1 и молекулами антител к LAG3. Следует иметь в виду, что такие свойства являются желательными для молекул антител к LAG3 для применения для лечения злокачественных новообразований.

Также обеспечиваются молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие молекулы антител, экспрессионные векторы, клетки-хозяева и способы получения молекул антител к LAG3. Также обеспечиваются фармацевтические композиции, содержащие молекулы антител к LAG3 согласно изобретению. Молекулы антител к LAG3, описанные в настоящей заявке, можно использовать для лечения злокачественных нарушений, включая солидные опухоли и опухоли мягких тканей.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, молекула антитела к LAG3 согласно изобретению связывает эпитоп LAG3 человека, содержащий аминокислотную последовательность LLRRAGVT (SEQ ID NO: 111) и/или YRAAVHLRDRA (SEQ ID NO: 112). Способы определения эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в настоящей заявке.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, молекула антитела к LAG3 согласно изобретению включает (а) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39 (hcCDR1), SEQ ID NO: 40 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 41 (hcCDR3) и которая имеет CDR легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42 (lcCDR1), SEQ ID NO: 43 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 44 (lcCDR3); или (б) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45 (hcCDR1), SEQ ID NO: 46 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 47 (hcCDR3) и которая имеет CDR легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48 (lcCDR1), SEQ ID NO: 49 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 50 (lcCDR3).

В соответствии с дальнейшим аспектом осуществления изобретения, также обеспечиваются способы лечения злокачественных новообразований, в которых молекулы антител к PD1 согласно изобретению могут использоваться в комбинации с молекулами антител к LAG3 согласно изобретению. Вариан-

ты осуществления этих аспектов изобретения включают, когда антитело к LAG3 вводят одновременно, конкурентно, последовательно, один за другим, альтернативно или отдельно, с молекулами антител к PD1. Дальнейшие варианты осуществления этих аспектов изобретения включают, когда молекулы антител к PD1 вводят одновременно, конкурентно, последовательно, один за другим, альтернативно или отдельно, с молекулами антител к LAG3. Дальнейшие варианты осуществления этих аспектов изобретения включают, когда указанные применения молекул антител согласно изобретению можно комбинировать с другими лекарственными средствами.

Дальнейшие аспекты, варианты осуществления, применения и способы, действующие молекулы антител согласно изобретению, будут становиться понятными на основании последующего подробного описания изобретения и из пунктов приложенной формулы изобретения.

Изобретение обеспечивает новые молекулы антител, которые предоставляют возможность более эффективного лечения некоторых типов злокачественных новообразований, таких как рак легких, в особенности NSCLC.

Условные обозначения на фигурах

Фиг. 1. Аминокислотные последовательности варибельного домена молекул антител к PD1. 77E11 является названием мышинового предшественника антитела. PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5 представляют собой антитела к PD1, как определено в настоящей заявке. CDR последовательности подчеркнуты. VK 77E11 (SEQ ID NO: 113); VK PD1-1 (SEQ ID NO: 20); VK PD1-2; (SEQ ID NO: 22); VK PD1-3 (SEQ ID NO: 24); VK PD1-4, (SEQ ID NO: 26); VK PD1-5 (SEQ ID NO: 28); VH 77E11 (SEQ ID NO: 114); VH PD1-1 (SEQ ID NO: 19); VH PD1-2; (SEQ ID NO: 21); VH PD1-3 (SEQ ID NO: 23); VH PD1-4, (SEQ ID NO: 25); VH PD1-5 (SEQ ID NO: 27).

Фиг. 2. Ингибирование связывания PD1-L1/L2 человека с PD1 с помощью молекул антител к PD1. (A) Представленные антитела к PD1 согласно изобретению индуцируют блокаду связывания PD-L1 с PD-1 человека, экспрессируемым на поверхности CHO клеток. (B) Представленные антитела к PD1 согласно изобретению индуцируют блокаду связывания PD-L2 с PD-1 человека, экспрессируемым на поверхности CHO клеток.

Фиг. 3. Стимуляция антиген-специфического Т-клеточного ответа с помощью молекул антител к PD1. Показана способность антител к PD1 согласно изобретению стимулировать продукцию интерферон-гамма (ИФН-гамма) специфическими к столбняку CD4 Т-клетками памяти от четырех индивидуальных доноров. Для этого исследования, Т-клетки имеющие происхождение из РВМС здоровых доноров выращивали в присутствии столбнячного анатоксина и совместно культивировали с аутологическими зрелыми дендритными клетками (DC), загруженными с помощью столбнячного анатоксина в течение 2 дней. Стадию совместного культивирования повторяли второй раз сходным образом в присутствии PD1-1 и PD1-3. После окончания второй стадии совместного культивирования супернатанты анализировали для определения уровней ИФН-гамма с помощью ELISA.

Фиг. 4. Эффективность *in vivo* молекул антител к PD1 на hPD-1 модели "нокин" у мышей. Представлены индивидуальные кривые роста опухолей у мышей, несущих клеточную линию карциномы толстой кишки (MC38). Мышей лечили с помощью (A) PBS q3ог4d, (B) Изотип q3ог4d, (C) PD1-3 q3ог4d или (D) PD1-3 в виде однократной дозы. PD1-3 и Изотип дозировали в количестве 10 мг/кг.

Фиг. 5. Доклинические фармакокинетики молекул антител к PD1. Доклинические параметры PD1 антител при внутривенном дозировании, представленные графически по отношению к дозам, вводимым яванским макакам. (A) Площадь под кривой (AUC), (B) максимальная концентрация в плазме (c_{max}), (C), клиренс из плазмы (CL), (D) период полувыведения в конечной фазе ($t_{1/2,z}$).

Фиг. 6. Аминокислотные последовательности варибельного домена молекул антител к LAG3. 496G6 является названием мышинового предшественника антитела. LAG3-1, LAG3-2, LAG3-3, LAG3-4 и LAG3-5 представляют собой антитела к LAG3, как определено в настоящей заявке. VK 496G6 (SEQ ID NO: 117); VK LAG3-1 (SEQ ID NO: 52); VK LAG3-2; (SEQ ID NO: 54); VK LAG3-3 (SEQ ID NO: 56); VK LAG3-4, (SEQ ID NO: 58); VK LAG3-5 (SEQ ID NO: 60); VH 496G6 (SEQ ID NO: 118); VH LAG3 -1 (SEQ ID NO: 51); VH LAG3-2; (SEQ ID NO: 53); VH LAG3-3 (SEQ ID NO: 55); VH LAG3-4, (SEQ ID NO: 57); VH LAG3-5 (SEQ ID NO: 59).

Фиг. 7. Ингибирование связывания LAG3 человека с МНСII с помощью молекул антител к LAG3. Представлена специфическая активность указанных LAG3 mAb и контрольных mAb блокировать связывание рекомбинантного LAG3 с МНСII, экспрессируемого на поверхности Raji клеток.

Фиг. 8. Стимуляция антиген-специфического Т-клеточного ответа с помощью молекул антител к PD1 и к LAG3. (A) Представлен % кратности повышения PD1/LAG3 mAb комбинаций относительно насыщающих количеств пембролизумаба (Keytruda(R)). Фиксированные 100 нМ концентрации PD1-3 и ниволумаба (Opdivo(R)) комбинировали с возрастающим количеством LAG3 mAb (LAG3-1 представлено в виде черной линии или сравнительная молекула антитела, имеющая такую же аминокислотную последовательность, как и BMS-986016, представлена в виде пунктирной линии, антагонистическое LAG3 антитело). (B) Представлен % кратности повышения комбинаций PD1/LAG3 mAb молекулы согласно изобретению по сравнению с активностью пембролизумаба (Keytruda(R)). Уровень активности комбинации mAb оценивали при 100 нМ для PD1 и 200 нМ для LAG3 mAb. Статистическое тестирование осуществ-

ляли с использованием Graph Pad Prism путем однофакторного дисперсионного анализа с последующим ретроспективным анализом с критерием Тьюки.

Фиг. 9. Эффективность *in vivo* комбинированной терапии с использованием PD1 и LAG3 антител на моделях сингенной опухоли. Представлены индивидуальные кривые роста опухолей у мышей, которые лечили с помощью наборов антител два раза в неделю в дозе 10 мг/кг. (А) Мышей, несущих карциному толстой кишки (MC38), лечили с помощью PBS, анти-LAG3, анти-PD1 или комбинации анти-PD1 и анти-LAG3. Мышей, несущих меланому (B16-F10) (В), карциному легких (LL/2) (С), карциному толстой кишки (Ободочная кишка-26) (D) или рак молочной железы (4T1) (Е) опухоль, лечили с помощью PD1 Изотипа, анти-PD1 или комбинации анти-PD1 и анти-LAG3.

Подробное описание изобретения

Определения.

Описанные выше и другие аспекты и варианты осуществления изобретения будут понятным на основании дальнейшего описания, представленного в настоящей заявке.

Если не указано или определено иное, то все применяемые понятия употребляются в их обычном значении, принятом в данной области, которое очевидно специалистам в данной области. В качестве ссылки можно указать, например, стандартные руководства, такие как Sambrook и др., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2-е изд.), тома 1-3, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", изд-во Oxford University Press, New York, (1990), и Roitt и др., "Immunology" (2-е изд.), изд-во Gower Medical Publishing, London, New York (1989), а также документы, касающиеся общего уровня техники, процитированные в настоящем описании. Кроме того, если не указано иное, все методы, стадии, процессы и манипуляции, которые не описаны конкретно в деталях, можно осуществлять и их осуществляли хорошо известными методами, что должно быть очевидно специалисту в данной области. И в этом случае также в качестве ссылки можно, например, указать на известные руководства, сведения, касающиеся общего уровня техники, указанные выше, и дополнительные процитированные в них ссылки.

Как используется в настоящей заявке, формы единственного числа относятся к одному или более чем одному (например, по меньшей мере одному) из указанных грамматических объектов.

Термин "или" используется в настоящей заявке, обозначает и используется взаимозаменяемо с термином "и/или", если из контекста не очевидно другое.

"Приблизительно" и "около" будет обозначать приемлемую степень погрешности измеренной величины, представленной в природе или точности измерений. Типичные степени погрешностей находятся в пределах 20 процентов (%), типично, в пределах 10%, и более типично, в пределах 5% данного значения или диапазона значений.

"Молекулы антител" или "антитела" (используются синонимично в настоящей заявке) представляют собой гаммаглобулиновые белки, которые можно обнаружить в крови или других жидкостях организмов позвоночных, и которые используются иммунной системой для идентификации и нейтрализации чужеродных объектов, таких как бактерии и вирусы. Они типично состоят из основных структурных единиц - каждое из двух больших тяжелых цепей и двух небольших легких цепей - с образованием, например, мономеров с одной единицей, димеров с двумя единицами или пентамеров с пятью единицами. Молекулы антител могут связываться, путем нековалентного взаимодействия, с другими молекулами или структурами, известными как антигены. Это связывание является специфическим в том значении, что молекула антитела будет связываться только со специфической структурой с высокой аффинностью. Уникальная часть антигена, распознаваемая молекулой антитела, называется эпитопом или антигенной детерминантой. Часть молекулы антитела, связывающаяся с эпитопом, иногда называется паратоп и остаток в так называемом переменном домене, или переменном участке (Fv) антитела. Переменный домен включает три так называемых участка, определяющих комплементарность (CDR), разделенные каркасными участками (FR).

В контексте настоящей заявки, ссылка на CDR основывается на определении (Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196: 901-917), совместно с Kabat (E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller и H. Perry, Sequence of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda (1983)).

В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела имеет константную область тяжелой цепи, выбранную из, например, константных областей тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE; в особенности, выбранную из, например, (например, человеческих) константных областей тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3, и IgG4. В другом варианте осуществления, молекула антитела имеет константную область легкой цепи, выбранную из, например, (например, человеческих) константных областей легкую цепь каппа или лямбда. Константная область может быть изменена, например, мутирована, для модификации свойств антитела (например, для повышения или снижения одного или нескольких из: связывание Fc рецептора, гликозилирование антитела, количества цистеиновых остатков, эффекторной клеточной функции и/или функции комплемента). В некоторых вариантах осуществления, антитело имеет эффекторную функцию и может фиксировать комплемент. В других вариантах осуществления, антитело не захватывает эффекторные клетки или не фиксирует комплемент. В определенных вариантах осуществления, антитело имеет уменьшенную способность или не имеет способности связывать Fc ре-

цептор. Например, оно может представлять собой изотип или подтип, фрагмент или другой мутант, который не поддерживает связывания с Fc рецептором, например, оно имеет мутированный или делетированный участок связывания Fc рецептора.

Константный участок антитела изменяют в некоторых вариантах осуществления. Методы изменения константного участка антитела хорошо известны в данной области техники. Антитела с измененной функцией, например, измененной аффинностью к эффекторному лиганду, такому как FcR на клетке, или C1 компоненту комплемента могут быть получены путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка в константном участке антитела на другой остаток (см., например, EP 388, 151 A1, U.S. Pat. No. 5,624,821 и U.S. Pat. No. 5,648,260, содержание всех источников таким образом полностью включено в качестве ссылки). Также охватываются аминокислотные мутации, которые стабилизируют структуру антитела, такие как S228P (EU номенклатура, S241P в номенклатуре Kabat) в IgG4 человека. Сходные типы изменений могут быть описаны, которые, если применяются к мышинным или другим видам иммуноглобулинов, будут уменьшать или элиминировать эти функции.

Термин "вариабельный домен", как используется в настоящей заявке, обозначает участок молекулы антитела, который по существу состоит из четырех "каркасных участков", как они определены в данной области, и обозначены ниже как "каркасный участок 1" или "FR1"; "каркасный участок 2" или "FR2"; "каркасный участок 3" или "FR3"; и "каркасный участок 4" или "FR4", соответственно; указанные каркасные участки перемежаются тремя "гипервариабельными участками" или "CDR", как они определены в данной области, и обозначены ниже как "гипервариабельный участок 1" или "CDR1"; "гипервариабельный участок 2" или "CDR2"; и "гипервариабельный участок 3" или "CDR3", соответственно. Таким образом, общую структуру или последовательность вариабельного домена иммуноглобулина можно обозначить следующим образом: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Именно вариабельный(е) домен(ы) иммуноглобулина придает(ют) специфичность антителу в отношении антигена, поскольку он(они) несут антиген-связывающий сайт.

Термины "вариабельный тяжелый (или VH)" и "вариабельный легкий (или VL)" относятся к вариабельным доменам из тяжелых или легких цепей, соответственно, молекулы антитела.

В данной области дополнительно были разработаны молекулы антител и из них получены универсальные средства в медицине и технологии. Таким образом, в контексте настоящего изобретения, термины "молекула антитела" или "антитело" не только включают антитела, как они могут быть обнаружены в природе, содержащие, например, две легкие цепи и две или тяжелые цепи, но также дополнительно охватывают все молекулы, содержащие по меньшей мере один паратоп со специфичностью связывания с антигеном и со структурным сходством с вариабельным доменом молекулы антитела.

Таким образом, молекула антитела в соответствии с изобретением включает моноклональное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, фрагмент антитела, в особенности Fv, Fab, Fab', или F(ab')₂ фрагмент, одноцепочечное антитело, в особенности одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP), домен антитела, нанотело, диантело.

Моноклональные антитела (mAb) представляют собой моносpezifические антитела, которые являются идентичными по аминокислотной последовательности. Они могут быть получены с помощью гибридомной технологии из гибридной клеточной линии (называемые гибридомой), представляющие собой клон слияния специфической антитело-продуцирующей В-клетки с миеломной клеткой (В-клеточный рак) (Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-7.). Альтернативно, моноклональные антитела могут быть получены путем рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (May 1997). "Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells." *J Immunol Methods* 204 (1): 77-87.

Для применения у людей, часто является желательным уменьшить иммуногенность антител, изначально имеющих происхождение из других видов, таких как мыши. Это может быть осуществлено путем конструирования химерных антител, или с помощью процесса, называемого "гуманизацией". В этом контексте, "химерное антитело" понимается как антитело, содержащее часть последовательности (например, вариабельный домен), имеющее происхождение из одних видов (например, мыши), слитое с частью последовательности (например, константные домены), имеющие происхождение из других видов (например, человека). "Гуманизированное антитело" представляет собой антитело, содержащее вариабельный домен, изначально имеющий происхождение из нечеловеческих видов, где определенные аминокислоты были мутированы для придания суммарной последовательности такого вариабельного домена более тесного сходства с последовательностью вариабельного домена человека. Методы химеризации и гуманизации антител хорошо известны в данной области техники (Billetta R, Lobuglio AF. "Chimeric antibodies". *Int Rev Immunol.* 1993; 10(2-3): 165-76; Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988). "Reshaping human antibody for therapy". *Nature*: 332:323.).

Кроме того, были разработаны технологии для создания антител на основании последовательностей, имеющих происхождение из генома человека, например, путем фагового дисплея или применения трансгенных животных (WO 90/05144; D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J.

McCafferty, A.D. Griffiths и G. Winter (1991) "By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." *J.Mol.Biol.*, 222, 581-597; Knappik и др., *J. Mol. Biol.* 296: 57-86, 2000; S. Carmen и L. Jermutus, "Concepts in antibody phage display". *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2002 1(2): 189-203; Lonberg N, Huszar D. "Human antibodies from transgenic mice". *Int Rev Immunol.* 1995; 13(1): 65-93.; Brüggemann M, Taussig MJ. "Production of human antibody repertoires in transgenic mice". *Curr Opin Biotechnol.* 1997 Aug;8(4):455-8.). Такие антитела представляют собой "антитела человека" в контексте настоящего изобретения.

Молекулы антител в соответствии с настоящим изобретением также включают фрагменты молекул, которые сохраняют антигенсвязывающие свойства, такие как Fab, Fab', или F(ab')₂ фрагменты. Такие фрагменты могут быть получены путем фрагментации молекул антител, например, путем протеолитического расщепления или путем рекомбинантной экспрессии таких фрагментов. Например, расщепление молекул антител может быть осуществлено с помощью рутинных технологий, например, используя папаин или пепсин (WO 94/29348). При расщеплении антител с помощью папаина типично получают два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, так называемые Fab фрагменты, каждый с единственным антигенсвязывающим сайтом, и оставшийся Fc фрагмент. При расщеплении пепсином получают F(ab')₂. В Fab молекулах, переменные домены каждый слит с константным доменом иммуноглобулина, предпочтительно человеческого происхождения. Таким образом, переменный домен тяжелой цепи может быть слит с CH₁ доменом (так называемый Fd фрагмент), и переменный домен легкой цепи может быть слит с CL доменом. Fab молекулы могут быть получены путем рекомбинантной экспрессии соответствующих нуклеиновых кислот в клетках-хозяевах, см. ниже.

Были разработаны различные технологии для помещения переменных доменов молекул антител, или молекул, имеющих происхождение из таких переменных доменов, в различных молекулярных контекстах. Их также следует рассматривать как "антитела" в соответствии с настоящим изобретением. В целом, такие молекулы антител являются меньшими по размеру по сравнению с природными молекулами антител, и могут содержать единственную аминокислотную цепь или несколько аминокислотных цепей. Например, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) представляет собой слияние переменных участков тяжелых и легких цепей молекул антител, соединенных вместе коротким линкером, обычно серином (S) или глицином (G) (WO 88/01649; WO 91/17271; Huston и др.; *International Reviews of Immunology*, том 10, 1993, 195-217). "Однодоменные антитела" или "нанотела" заякоривают антигенсвязывающий сайт в единичном Ig-подобном домене (WO 94/04678; WO 03/050531, Ward и др., *Nature*. 1989 Oct 12; 341(6242): 544-6; Revets и др., *Expert Opin Biol Ther.* 5(1): 111-24, 2005). Один или несколько единичных доменов антител со связывающей специфичностью к одному и тому же или различным антигенам могут быть соединены вместе. Диатела представляют собой двухвалентные молекулы антител, состоящие из двух аминокислотных цепей, содержащих два переменных домена (WO 94/13804, Holliger и др., *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Jul 15; 90(14): 6444-8). Другими примерами антителоподобных молекул являются иммуноглобулиновое суперсемейство антител (IgSF; Srinivasan и Roeske, *Current Protein Pept. Sci.* 2005, 6(2): 185-96). Другая концепция привела к созданию так называемого малого модульного иммунофармацевтического средства (SMIP), которое содержит Fv домен, связанный с одноцепочечным петлевым и эффекторными доменами, лишенный константного домена CH₁ (WO 02/056910).

Молекула антитела может быть слита (в качестве слитого белка) или другим образом связана (с помощью ковалентных или нековалентных связей) с другими молекулярными структурами, оказывающими желательное влияние на свойства молекулы антитела. Например, может быть желательным улучшать фармакокинетические свойства молекул антител, стабильность, например, в жидкостях организма, таких как кровь, в особенности в случае одноцепочечного антитела или домена антитела. Для этого были разработаны различные технологии, в особенности для пролонгирования периода полужизни таких молекул антител в кровообращении, такие как пегилирование (WO 98/25971; WO 98/48837; WO 2004081026), слияние или другим способом ковалентное присоединение молекулы антитела к другой молекуле антитела, имеющей аффинность к сывороточному белку, такому как альбумин (WO 2004041865; WO 2004003019), или экспрессия молекул антитела в качестве слитого белка со всеми или частью сывороточного белка, такого как альбумин или трансферрин (WO 01/79258).

Термины "эпитоп" и "антигенная детерминанта", которые можно применять взаимозаменяемо, относятся к части макромолекулы, такой как полипептид, которая распознается антиген-связывающими молекулами, такими как молекулы антител согласно изобретению, и более предпочтительно, антиген-связывающим сайтом указанных молекул. Эпитопы определяются как минимальный сайт связывания для молекулы антитела, и поэтому представляют собой специфическую мишень молекулы антитела.

Считают, что молекула антитела, которая может "связывать", "связываться с", "специфически связывать", или "специфически связываться с", которая "имеет аффинность к" и/или которая "имеет специфичность к" определенному эпитопу, антигену или белку (или к по меньшей мере его одной части, фрагменту или эпитопу) "действует против" или "нацелена к" указанному эпитопу, антигену или белку или является "связывающей" молекулой по отношению к такому эпитопу, антигену или белку.

Как правило, термин "специфичность" относится к ряду антигенов или эпитопов различных типов, с которыми конкретная антиген-связывающая молекула или антиген-связывающий белок (такая как им-

муноглобулин, антитело, единичный вариабельный домен иммуноглобулина) может связываться. Специфичность антиген-связывающего белка может быть определена на основании его аффинности и/или avidности. Аффинность, характеризующаяся константой равновесия реакции диссоциации антигена от антиген-связывающего белка (K_D), является мерой силы связывания между эпитопом и антиген-связывающим сайтом на антиген-связывающем белке: чем меньше величина K_D , тем выше сила связывания между эпитопом и антиген-связывающей молекулой (альтернативно, аффинность может быть выражена как константа аффинности (K_A), которая представляет собой $1/K_D$). Как должно быть очевидно специалисту в данной области (например, после ознакомления с представленным ниже дополнительным описанием), аффинность можно определить с помощью метода, известного *per se*, в зависимости от специфичности антигена, представляющего интерес. Avidность представляет собой меру силы связывания между антиген-связывающей молекулой (такой как антитело согласно изобретению) и соответствующим антигеном. Avidность связана как с аффинностью между эпитопом и его антиген-связывающим сайтом на антиген-связывающей молекуле, так и количеством соответствующих связывающих сайтов, присутствующих на антиген-связывающей молекуле.

Типично, антиген-связывающие белки (такие как молекулы антител согласно изобретению) будут связывать с константой диссоциации (K_D) от $10E-5$ до $10E-14$ моль/литр (M) или меньше, и предпочтительно от $10E-7$ до $10E-14$ моль/литр (M) или меньше, более предпочтительно от $10E-8$ до $10E-14$ моль/литр, и еще более предпочтительно от $10E-11$ до $10E-13$ (как измеряется, например, в анализе Kipexa; известном в данной области техники), и/или с константой ассоциации (K_A) по меньшей мере $10E7$ ME-1, предпочтительно по меньшей мере $10E8$ ME-1, более предпочтительно по меньшей мере $10E9$ ME-1, такой, как по меньшей мере $10E11$ ME-1. Любое значение K_D больше, чем $10E-4$ M, обычно рассматривается как показатель неспецифического связывания. Предпочтительно антитело согласно изобретению будут связываться с желательным антигеном с K_D меньше чем 500 нМ, предпочтительно меньше чем 200 нМ, более предпочтительно меньше чем 10 нМ, например меньше чем 500 пМ. Специфическое связывание антиген-связывающего белка с антигеном или эпитопом может быть определено с помощью любого подходящего способа, известного *per se*, включая, например, исследования, описанные в настоящей заявке, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания, такие как радиоиммуноанализы (RIA), ферментативные иммуноанализы (EIA) и сэндвич-конкурентные анализы, и их различные вариации, известные *per se* в данной области техники.

Связывающая аффинность молекулы антитела может быть усилена с помощью процесса, известного как созревание аффинности (Marks и др., 1992, *Biotechnology* 10: 779-783; Barbas, и др., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813; Shier и др., 1995, *Gene* 169: 147-155). Следовательно, аффинность зрелого антитела также охватывается в настоящем изобретении.

Термины "конкурирует" или "перекрестно-конкурирует" используются взаимозаменяемо в настоящей заявке для обозначения способности молекулы антитела препятствовать связыванию молекулы антитела, например, молекула антитела к PD1 или к LAG3 согласно изобретению, с мишенью, например, PD1 или LAG3 человека. Препятствование связыванию может быть прямым или опосредованным (например, путем аллостерической модуляции молекулы антитела или мишени). Степень, до которой молекула антитела способна препятствовать связыванию другой молекулы антитела с мишенью, и, следовательно, можно ли сказать, что она является конкурентом, можно определить, используя анализ конкурентного связывания, например, FACS анализ, ELISA или BIACORE анализ. В некоторых вариантах осуществления, анализ конкурентного связывания представляет собой количественный конкурентный анализ. В некоторых вариантах осуществления, первая молекула антитела к PD1 или к LAG3 конкурирует за связывание с мишенью со второй молекулой антитела к PD1 или к LAG3, если связывание первой молекулы антитела с мишенью уменьшается на 10% или больше, например, 20% или больше, 30% или больше, 40% или больше, 50% или больше, 55% или больше, 60% или больше, 65% или больше, 70% или больше, 75% или больше, 80% или больше, 85% или больше, 90% или больше, 95% или больше, 98% или больше, 99% или больше в анализ конкурентного связывания (например, в конкурентном анализе, описанном в настоящей заявке).

Композиции и методы, описанные в настоящей заявке, охватывают полипептиды и нуклеиновые кислоты, имеющие указанные последовательности, или последовательности существенно идентичные или сходные с ними, например, последовательности по меньшей мере на 85, 90, 95% идентичные или больше к указанной последовательности. В контексте аминокислотной последовательности, термин "существенно идентичные" используется в настоящей заявке для обозначения первой аминокислоты, которая содержит достаточное или минимальное количество аминокислотных остатков, которые I) идентичны к, или II) консервативные замены выровненных аминокислотных остатков во второй аминокислотной последовательности, таким образом, что первая и вторая аминокислотные последовательности могут иметь общий структурный домен и/или общую функциональную активность. Например, аминокислотные последовательности, которые содержат общий структурный домен, имеющие по меньшей мере приблизительно 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности к референс-последовательности, например, последовательности, раскрытой в настоящей заявке. В контексте нуклеотидной последовательности, термин "существенно идентичные" используется в настоящей заявке по отношению к первой

последовательности нуклеиновых кислот, которая содержит достаточное или минимальное количество нуклеотидов, идентичная выровненным нуклеотидам во второй последовательности нуклеиновых кислот таким образом, что первая и вторая нуклеотидные последовательности кодируют полипептид, имеющий общую функциональную активность, или кодируют общий структурный полипептидный домен или общую функциональную полипептидную активность. Например, нуклеотидные последовательности, имеющие по меньшей мере приблизительно 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности к референс-последовательности.

Термины "идентичные" или "процент идентичности," в контексте двух или больше нуклеотидных или полипептидных последовательностей, относятся к двум или больше последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Для определения процента идентичности, последовательности выравнивают для возможностей оптимального сравнения (например, могут быть введены гэпы в последовательность первых аминокислот или последовательность нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью). После этого сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или нуклеотидных положениях. Если положение в первой последовательности занято таким же аминокислотным остатком или нуклеотидом, как и в соответствующем положении во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении. Процент идентичности для двух последовательностей является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % идентичности = $\frac{\text{№ идентичных положений}}{\text{общее № положений}}$ (например, перекрывающиеся положения) $\times 100$). В некоторых вариантах осуществления, две последовательности, которые сравниваются, имеют одинаковую длину после введения гэпов в последовательности, если это является подходящим (например, исключая дополнительную последовательность, выходящую за пределы последовательностей, подлежащие сравнению). Например, если сравнивают переменные участки последовательностей, то лидерные последовательности и/или последовательности константного домена не рассматривают. Для сравнения последовательностей между двумя последовательностями, "соответствующий" CDR относится к CDR в том же расположении в обеих последовательностях (например, CDR-H1 каждой последовательности).

Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями можно осуществлять, используя математический алгоритм. Предпочтительным, неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin и Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, модифицированный Karlin и Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST от Altschul и др., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410. BLAST поиск нуклеотидов можно осуществлять с программой NBLAST, шкала=100, длина слова=12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных к нуклеиновой кислоте, кодирующей белок, представляющий интерес. BLAST поиск белков можно осуществлять с помощью программы XBLAST, шкала=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белку, представляющему интерес. Для получения гэповых выравниваний для сравнений, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul и др., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Альтернативно, можно использовать PSI-Blast для осуществления итерационного поиска, который определяет отдаленные взаимоотношения между молекулами (там же). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast, можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным, неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers и Miller, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью программного обеспечения выравнивания GCG последовательности. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей, можно использовать PAM120 таблицу весов замен остатков, штраф за продление гэпа 12, и штраф за гэп 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей известны в данной области техники и включают ADVANCE и ADAM, как описано в Torellis и Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; и FASTA, описанные в Pearson и Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8. Для FASTA, ktpur представляет собой контрольную опцию, которая устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если ktpur=2, то сходные участки в двух сравниваемых последовательностей обнаруживают путем поиска пар выровненных остатков; если ktpur=1, то исследуют единичные выровненные аминокислоты, ktpur может быть установлена на 2 или 1 для белковых последовательности, или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. По умолчанию, если не указано, то ktpur равен 2 для белков и 6 для ДНК. Альтернативно, выравнивание белковых последовательностей можно осуществлять, используя CLUSTAL W алгоритм, как описано Higgins и др., 1996, Methods Enzymol. 266: 383-402.

Аминокислотные остатки можно обозначать в соответствии со стандартным трехбуквенным или однобуквенным кодом аминокислот, что хорошо известно и является общепринятым в данной области. При сравнении двух аминокислотных последовательностей, термин "различие в аминокислотах" относится к инсерциям, делециям или заменам указанного количества аминокислотных остатков в указанном

положении референс-последовательности, по сравнению со второй последовательностью. В случае замены(ы), указанные(ая) замены(а) предпочтительно должны(а) представлять собой консервативные(ую) аминокислотные(ную) замены(у), это означает, что аминокислотный остаток заменяют на другой аминокислотный остаток сходного химического строения, который оказывает незначительное влияние или практически не оказывает влияния на функцию, активность или другие биологические свойства полипептида. Такие консервативные аминокислотные замены хорошо известны в данной области техники, например, из WO 1998/49185, где консервативные аминокислотные замены предпочтительно представляют собой замены, при которых одну аминокислоту в пределах следующих групп (I)-(V) заменяют на другой аминокислотный остаток, входящий в эту же группу: (I) небольшие алифатические неполярные или имеющие невысокую полярность остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; (II) полярные отрицательно заряженные остатки и их (незаряженные) амиды: Asp, Asn, Glu и Gln; (III) полярные положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys; (IV) крупные алифатические неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys; и (V) ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp. Наиболее предпочтительными являются следующие аминокислотные замены: Ala на Gly или на Ser; Arg на Lys; Asn на Gln или на His; Asp на Glu; Cys на Ser; Gln на Asn; Glu на Asp; Gly на Ala или на Pro; His на Asn или на Gln; Ile на Leu или на Val; Leu на Ile или на Val; Lys на Arg, на Gln или на Glu; Met на Leu, на Tyr или на Ile; Phe на Met, на Leu или на Tyr; Ser на Thr; Thr на Ser; Trp на Tyr; Tyr на Trp или на Phe; Val на Ile или на Leu.

Термины "полипептид", "пептид" и "протеин" (если одноцепочечный) используются взаимозаменяемо в настоящей заявке.

Термины "нуклеиновая кислота," "последовательность нуклеиновых кислот" "нуклеотидная последовательность", или "полинуклеотидная последовательность," и "полинуклеотид" используются взаимозаменяемо.

Термин "выделенный", как используется в настоящей заявке, относится к материалу, который был удален из его исходной или нативной окружающей среды (например, природной окружающей среды, если он встречается в природе). Например, встречающийся в природе полинуклеотид или полипептид, присутствующий в живом организме, не является выделенным, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенный путем вмешательства человека от некоторых или всех материалов, с которым он совместно существует в природной системе, является выделенным. Такие полинуклеотиды могут быть частью вектора и/или такие полинуклеотиды или полипептиды могут быть частью композиции, и все еще могут быть выделенными в том отношении, что такой вектор или композиция не являются частью окружающей среды, в которой они находятся в природе.

Предпочтительно, нуклеиновая кислота будет составлять часть экспрессионного вектора, где указанная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, где такая регуляторная последовательность может представлять собой промоторную, энхансерную, или терминирующую последовательность, и наиболее предпочтительно гетерологичную промоторную, энхансерную, или терминирующую последовательность.

Подробное описание изобретения

Варианты осуществления изобретения, относящиеся к антителам к PD1.

Как подробно обсуждалось выше, PD1 играет важную роль в регуляции активности Т-клеток и, следовательно, активности иммунной системы. На моделях различных злокачественных новообразований было показано, что антагонистическое молекулы антител к PD1 могут повышать активность Т-клеток, таким образом активируя иммунную систему для нападения на опухоли и, следовательно, лечения злокачественного новообразования.

Тем не менее, существующие молекулы антител к PD1 страдают от проблем, связанных с побочными эффектами, и также наличием большого количества пациентов, неспособных отвечать на лечение. Таким образом, существует потребность идентифицировать альтернативные молекулы антител к PD1, которые имеют улучшенный терапевтический индекс по сравнению с известными из уровня техники. Такие молекулы можно использовать для монотерапии, а также в комбинации с дополнительными лекарственными средствами, в особенности другими модуляторами активности Т-клеток.

Принимая во внимание данные обстоятельства, изобретатели стремились создать дополнительные антитела к PD1. Используя в качестве исходной предшественник мышинового антитела к PD1 (обозначаемую как 77E11), они приготовили 5 гуманизированных производных, которые являются заявляемыми молекулами антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением. Молекулы антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением обозначаются как PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5.

Используя исследование активации Т-клеток *in-vitro* (дополнительно описанное в примере 4), они исследовали функциональные характеристики репрезентативных антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением. Как можно увидеть в примере 12 и фиг. 8, тестируемые антитела способны индуцировать активацию Т-клеток на более высоком уровне при комбинировании с антителами к LAG3 по сравнению с эталонной комбинацией антител к PD1/LAG3, что подтверждает факт о том, что они имеют более желательную терапевтическую активность, чем сравнительные антитела к PD1.

Как можно понять, эта неожиданная способность антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением более эффективно индуцировать активацию Т-клеток по сравнению с сравнительным антите-

лом к PD1 из уровня техники свидетельствует о том, что их можно использовать для лечения злокачественного новообразования при более низком уровне дозирования, чем сравнительное антитело к PD1 из уровня техники, что может предоставлять терапевтическое применение с меньшим количеством нежелательных побочных эффектов.

Стимулируемые этими данными, изобретатели дополнительно исследовали различные другие функциональные характеристики молекул антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением. В эту оценку было включено определение фармакокинетических свойств *in vivo*. Как изложено в примере 7 и показано на фиг. 5, как определяли на яванских макаках, период полувыведения в конечной фазе, наблюдаемый для примера антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением при внутривенной дозе 1 мг/кг, был в 1,5-2 раза выше, чем таковой у сравнительных антител к PD1 из уровня техники.

В отличие от антител к PD1, известных из уровня техники, это свидетельствует о том, что антитела к PD1 согласно изобретению имеют период полужизни в сыворотке 11 дней. Это противоречит известным сравнительным молекулам антител к PD1, которые типично имеют период полужизни от 4 до 6 дней в диапазоне дозирования 0,3-3 мг/кг, как можно увидеть из сопровождающих примеров. Эта неожиданная характеристика особенность заявляемых молекул антител может предоставить пациенту, подвергаться лечению с применением антител согласно изобретению, менее часто по сравнению с известными антителами из уровня техники, что может привести к уменьшению количества антитела, которое следует вводить, либо в форме уменьшенной частоты введения или в уменьшении используемого количества антитела. Принимая во внимание, что молекулы антител к PD1 могут индуцировать нежелательные побочные эффекты у пациентов, как обсуждалось выше, то антитела к PD1 согласно изобретению могут иметь существенное и неожиданное клиническое преимущество по сравнению с известным уровнем техники.

Следовательно, первый аспект изобретения обеспечивает молекулы антител к PD1, содержащие:

(а) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 (hcCDR1), SEQ ID NO: 2 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 3 (hcCDR3) и которая имеет CDR легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 (lcCDR1), SEQ ID NO: 5 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 6 (lcCDR3); или

(б) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 (hcCDR1), SEQ ID NO: 8 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 9 (hcCDR3) и которая имеет CDR легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 (lcCDR1), SEQ ID NO: 11 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 12 (lcCDR3); или

(в) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13 (hcCDR1), SEQ ID NO: 14 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 15 (hcCDR3) и которая имеет CDR легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16 (lcCDR1), SEQ ID NO: 17 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 18 (lcCDR3).

Как было изложено выше, молекулы антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением обозначаются как PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5. В настоящей заявке представлена таблица с последовательностями, которая предоставляет возможность легкой идентификации индивидуальных аминокислотных последовательностей для специфических молекул антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением. Обобщенные данные приведены в табл. 1 в примере 2.

Дополнительно к CDR последовательностям, как изложено в настоящей заявке, молекулы антител согласно изобретению включают последовательности каркасного участка (FR) иммуноглобулина. Эти последовательности предпочтительно не являются иммуногенными у людей, и, следовательно, предпочтительно представляют собой человеческие или гуманизированные FR последовательности. Подходящие человеческие или гуманизированные FR последовательности известны из уровня техники. Специфически предпочтительные FR последовательности можно получить на основании вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящей заявке, раскрывающие полные молекулы антител и, следовательно, CDR последовательности, а также FR последовательности.

Способы приготовления молекул антител первого аспекта изобретения хорошо известны в данной области техники, и квалифицированный специалист в данной области техники легко может приготовить молекулу антитела, имеющую характерные особенности первого аспекта изобретения. Примеры таких методов представлены далее в настоящей заявке.

Для получения антител, содержащих две полные тяжелые и две полные легкие цепи, такие как цепи IgG1 или IgG4 типа, см. Norderhaug и др., *J Immunol Methods* 1997, 204 (1): 77-87; Kipriyanow и Le Gall, *Molecular Biotechnology* 26: 39-60, 2004; Shukla и др., 2007, *J. Chromatography B*, 848(1): 28-39.

Также известны способы приготовления scFv антител путем рекомбинантной экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих scFv конструкции в клетках-хозяевах (такие как клеточные линии *E. coli*, *Pichia pastoris*, или млекопитающих, например, CHO или NS0), получая функциональные scFv молекулы (Rippmann и др., *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64(12): 4862-4869; Yamawaki и др., *J. Biosci.* 2007, 104(5): 403-407; Sonoda и др., *Protein Expr. Purif.* 2010, 70(2): 248-253).

Для исключения неопределенности, каждый из специфических вариантов осуществления, перечисленный ниже для первого аспекта изобретения также может рассматриваться как независимые аспекты согласно изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 имеет легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19 и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21 и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23 и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25 и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27 и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

Для всех вышеописанных вариантов осуществления, следует понимать, что при использовании термина "содержащий", также охватывает вариант осуществления изобретения, в котором соответствующий домен или молекула "состоит из" аминокислотной последовательности, как указано.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 способна связываться с PD1 человека с константой диссоциации (K_D) меньше, чем 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к PD1 способна связываться с PD1 человека и PD1 яванских макаков с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления, высокая аффинность относится к K_D меньше, чем 10 нМ, например, 9, 8, 7, 6 или ниже, как определено с помощью SPR. Протокол для определения K_D , используя SPR, представлен в сопровождающих примерах.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 не связывается с мышечным PD1.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 способна уменьшать связывание PD-L1/L2 человека с PD1 человека. Анализ для определения связывания PD-L1/L2 человека с PD1 человека обеспечивается в сопровождающих примерах.

В некоторых вариантах осуществления, молекула антитела к PD1 способна ингибировать связывание лигандов PD-L1 и PD-L2 с PD1 с IC_{90} меньше, чем 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 нМ или ниже. Протокол для определения IC_{90} обеспечивается в сопровождающих примерах.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к PD1 способна усиливать антиген-специфический Т-клеточный ответ. Анализ для определения антиген-специфического Т-клеточного ответа описан в примере 4.

Дальнейший аспект настоящего изобретения обеспечивает выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие переменный домен тяжелой цепи и/или переменный домен легкой цепи молекулы антитела к PD1 любого из первых аспектов осуществления изобретения.

Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 71, 73, 75, 77 или 79 соответственно, кодирующую переменный домен тяжелой цепи SEQ

ID NO: 19, 21, 23, 25 или 27. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 72, 74, 76, 78 или 80 соответственно, кодирующую вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26 или 28.

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает экспрессионный вектор, содержащий молекулу ДНК содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи молекулы антитела к PD1 согласно изобретению. Предпочтительно экспрессионный вектор содержит молекулу ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 71 и/или SEQ ID NO: 72, или содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 73 и/или SEQ ID NO: 74, или содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 75 и/или SEQ ID NO: 76, или содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 77 и/или SEQ ID NO: 78 или содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 79 и/или SEQ ID NO: 80.

Предпочтительно экспрессионный вектор включает, дополнительно, молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулу ДНК, кодирующую константные домены тяжелой цепи и/или константный домен легкой цепи, соответственно, связанную с молекулой нуклеиновой кислоты, предпочтительно молекулу ДНК, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи, соответственно.

В специфическом предпочтительном варианте осуществления, можно использовать два экспрессионных вектора, один из них для экспрессии тяжелой цепи, а второй для экспрессии легкой цепи, затем два экспрессионных вектора оба могут быть трансфектированы в клетку-хозяина для экспрессии рекомбинантного белка.

Предпочтительно, экспрессионный вектор будет представлять собой вектор, содержащий указанную(ые) молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты, функционально связанную с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, где такая регуляторная последовательность может представлять собой промоторную, энхансерную, или терминирующую последовательность, и наиболее предпочтительно гетерологичную промоторную, энхансерную, или терминирующую последовательность.

Нуклеиновые кислоты согласно изобретению могут быть приготовлены или получены с помощью метода, известного *per se* (например, путем автоматизированного синтеза ДНК и/или рекомбинантных ДНК технологий), на основании информации относительно аминокислотных последовательностей для антител согласно изобретению, представленных в данной заявке.

В другом аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, имеющей экспрессионный вектор, кодирующий тяжелую цепь молекулы антитела к PD1 согласно изобретению и экспрессионный вектор, кодирующий легкую цепь молекулы антитела к PD1 согласно изобретению.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления, указанные клетки-хозяева представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих. В другом варианте осуществления, такие клетки-хозяева представляют собой бактериальные клетки. Другие пригодные клетки представляют собой клетки дрожжей или другие грибовые клетки.

Подходящие клетки млекопитающих включают, например, CHO клетки, ВНК клетки, HeLa клетки, COS клетки, и другие. Тем не менее, также можно использовать клетки земноводных, клетки насекомых, клетки растений и любые другие клетки, используемые в данной области техники для экспрессии гетерологичного белка.

Варианты осуществления изобретения, относящиеся к молекулам антител к LAG3 и комбинации с антителами к PD1.

Как подробно обсуждалось выше, PD1 играет важную роль в регуляции активности Т-клеток и, следовательно, активности иммунной системы. На моделях различных злокачественных новообразований было показано, что антагонистические молекулы антител к PD1 могут повышать активность Т-клеток, таким образом активируя иммунную систему для нападения на опухоли и, следовательно, лечения злокачественного новообразования.

Также было показано, что комбинации антагонистических антител к PD1 с молекулами антител, которые нацеливают другие ингибиторы контрольной точки иммунных клеток ингибиторы контрольной точки, могут потенцировать противораковые свойства антагонистических антител к PD1. Один такой ингибитор контрольной точки называется LAG3.

Как и в случае с PD1, полагают, что LAG3 играет роль в опосредовании активности Т-клеток. Кроме того, в данной области техники известно, что дуальная блокада PD1 пути и LAG3 является более эффективной для противоопухолевого иммунитета, чем блокировка любой молекулы отдельно.

Принимая во внимание данные обстоятельства, изобретатели стремились создать дополнительные молекулы антител к LAG3, которые могут использоваться либо отдельно или в комбинации с молекулами антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением. Используя в качестве исходной предшественник мышинового антитела к LAG3 (обозначаемый как 496G6), они приготовили пять гуманизованных производных, которые являются заявляемыми молекулами антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением. Молекулы антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением обозначаются как LAG3-1, LAG3-2, LAG3-3, LAG3-4 и LAG3-5.

Используя анализ активации *in-vitro* Т-клеток (дополнительно описанный в примере 12), они исследовали

довали функциональные характеристики репрезентативных молекул антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением. Как можно увидеть в примере 12 и на фиг. 8, комбинация молекулы антитела к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением с молекулой антитела к PD1 в соответствии с настоящим изобретением неожиданно является лучше по сравнению с комбинацией антител к PD1/LAG3, известной из уровня техники.

Как можно понять, это преимущество комбинации молекул антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением с молекулами антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением свидетельствует о том, что они могут применяться для лечения злокачественного новообразования при более низком уровне дозирования по сравнению с известными из уровня техники терапевтическими антителами, что может предоставлять для терапевтического применения меньше нежелательных побочных эффектов.

Принимая во внимание, что молекулы антител к PD1 и к LAG3 могут индуцировать нежелательные побочные эффекты у пациентов, как обсуждалось выше, то антитела к PD1 и антитела к LAG3 согласно изобретению могут иметь существенное и неожиданное клиническое преимущество по сравнению с известным уровнем техники путем применения меньших дозировок и/или менее частых схем введения.

Учитывая обнадеживающие данные, изобретатели дополнительно исследовали различные другие функциональные характеристики молекул антител к LAG3 согласно изобретению. В эту оценку было включено определение эпитопа, связываемого примерами молекул антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением. Как можно увидеть в примере 11, изобретатели определили, что молекулы антител к LAG3 согласно изобретению могут связываться с двумя разными участками LAG-3 человека, LLRRAGVT (SEQ ID NO: 111) и/или YRAAVHLRDRA (SEQ ID NO: 112).

По имеющимся сведениям у изобретателей, ни одно из известных из уровня техники антител к LAG3 не имело такого же профиля связывания эпитопа, что и молекулы антител к LAG3 согласно изобретению. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, изобретатели предполагают, что неожиданное улучшение эффективностей комбинации молекул антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением с антителами к PD1 в соответствии с настоящим изобретением при сравнении с известными молекулами из уровня техники может быть обусловлено профилем связывания эпитопа молекул антител к LAG3 согласно изобретению.

Следовательно, дальнейший аспект изобретения обеспечивает выделенную молекулу антитела к LAG3, где указанная молекула антитела к LAG3 связывает эпитоп LAG3 человека, содержащий аминокислотную последовательность LLRRAGVT (SEQ ID NO: 111) и/или YRAAVHLRDRA (SEQ ID NO: 112). Такие молекулы обозначаются в настоящей заявке как "молекулы антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением".

Способы приготовления молекул антител к LAG3, имеющие характеристики связывания эпитопа согласно изобретению, хорошо известны в данной области техники.

Способы создания антител и фрагментов антител хорошо известны в данной области техники. Например, антитела могут быть созданы с помощью любого из различных методов, в котором применяют индукцию *in vivo* продукции молекул антител, скрининг библиотек иммуноглобулинов (Orlandi и др., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 3833-3837; Winter и др. 1991, Nature 349: 293-299) или создание моноклональных молекул антител с помощью клеточных линий в культуре. Они включают, но не ограничиваясь только ими, гибридную технологию, гибридную технологию В-клеток человека, и вирус Эпштейна-Барра (EBV)-гибридную технологию (Kohler и др. 1975. Nature 256: 4950497; Kozbor и др. 1985. J. Immunol. Methods 81: 31-42; Cote и др. 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030; Cole и др. 1984. Mol. Cell. Biol. 62: 109-120).

Используя эти методы, для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятным, как приготовить антитела, имеющие сайт связывания с необходимой специфичностью для LAG3. После этого кандидатные молекулы антител можно подвергать скринингу, используя картирование эпитопов для определения того, будут ли они связываться с теми же самыми эпитопными последовательностями, как и требуемые антитела к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением. Такие методы картирования эпитопов хорошо известны и используются в данной области техники и легко могут быть адаптированы квалифицированным специалистом в данной области техники. Кроме того, пример такой методологии описан в примере 11 в настоящей заявке.

Для исключения неопределенности, каждый из специфических вариантов осуществления, перечисленный ниже для антитела к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением также может рассматриваться как независимые аспекты согласно изобретению.

Предпочтительный вариант первого аспекта изобретения представляет вариант, где указанная молекула антитела представляет собой молекулу гуманизированного антитела.

Дальнейшим предпочтительным вариантом осуществления является вариант, где указанная молекула антитела представляет собой моноклональное антитело, Fab, F(ab')₂, Fv или scFv.

Термины "гуманизированное", "Fab", "F(ab')₂", "Fv" и "scFv" хорошо известны в данной области техники и дополнително обсуждаются в настоящей заявке в разделе описания "Определения".

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет константную об-

ласть тяжелой цепи, выбранную из группы, включающей константные области IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA и IgE. Предпочтительно, константная область тяжелой цепи представляет собой IgG4 с S241P мутацией.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет константную область легкой цепи, которая представляет собой каппа или ламбда.

Дальнейшим предпочтительным вариантом осуществления является вариант, где указанная молекула антитела к LAG3 включает:

(а) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39 (hcCDR1), SEQ ID NO: 40 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 41 (hcCDR3) и которая имеет CDR легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42 (lcCDR1), SEQ ID NO: 43 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 44 (lcCDR3); или

(б) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45 (hcCDR1), SEQ ID NO: 46 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 47 (hcCDR3) и которая имеет CDR легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48 (lcCDR1), SEQ ID NO: 49 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 50 (lcCDR3).

Как было изложено выше, молекулы антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением обозначаются как LAG3-1, LAG3-2, LAG3-3, LAG3-4 и LAG3-5. В настоящей заявке описана таблица с последовательностями, которая предоставляет возможность легкой идентификации индивидуальных аминокислотных последовательностей для специфических молекул антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением. Обобщенные данные приведены в табл. 6 в примере 9.

Способы приготовления молекул антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением хорошо известны в данной области техники, и квалифицированный специалист в данной области техники легко может приготовить молекулу антитела. Примеры таких методов представлены выше по отношению к первому аспекту изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную любой из SEQ ID NO: 51, 53, 55, 57 и 59. Предпочтительно, указанная молекула антитела имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 51, 53, 55, 57 и 59.

В предпочтительном варианте осуществления молекула антитела к LAG3 имеет переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную любой из SEQ ID NO: 52, 54, 56, 58 и 60. Предпочтительно, указанная молекула антитела имеет переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, 54, 56, 58 и 60.

Способы расчета идентичностей аминокислотных последовательностей хорошо известны в данной области техники и дополнительно обсуждаются в настоящей заявке в разделе описания "Определения".

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52.

В предпочтительном варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 имеет легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62.

В предпочтительном варианте осуществления, антитело к LAG3 имеет переменный домен легкой

В дальнейшем варианте осуществления, молекула антитела к LAG3 способна проявлять одно или несколько из следующих свойств: (I) связывание с LAG3 яванских макак; (II) отсутствие связывания с мышинным LAG3; (III) ингибирование связывания LAG3 с МНС II; и (IV) стимулирование иммунного ответа.

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает молекулу антитела к LAG3 согласно изобретению для применения в медицине.

Дальнейший аспект настоящего изобретения обеспечивает выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие переменный домен тяжелой цепи и/или переменный домен легкой цепи молекулы антитела к LAG3 согласно изобретению. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 91, 93, 95, 97 или 99 соответственно, кодирующую переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 51, 53, 55, 57 или 59. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 92, 94, 96, 98 или 100 соответственно, кодирующую переменный домен легкой цепи SEQ ID NO: 52, 54, 56, 58 или 60.

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает экспрессионный вектор, содержащий молекулу ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь и/или легкую цепь молекулы антитела к LAG3 согласно изобретению. Предпочтительно экспрессионный вектор содержит молекулу ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 101 и/или SEQ ID NO: 102, или содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 103 и/или SEQ ID NO: 104, или содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 105 и/или SEQ ID NO: 106, или содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 107 и/или SEQ ID NO: 108 или содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 109 и/или SEQ ID NO: 110.

В специфическом предпочтительном варианте осуществления, можно использовать два экспрессионных вектора, один из них для экспрессии тяжелой цепи, а второй для экспрессии легкой цепи, затем два экспрессионных вектора оба могут быть трансфектированы в клетку-хозяина для экспрессии рекомбинантного белка.

Предпочтительно, экспрессионный вектор будет представлять собой вектор, содержащий указанную(ые) молекулу или молекулы нуклеиновой кислоты, функционально связанную с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью, где такая регуляторная последовательность может представлять собой промоторную, энхансерную, или терминирующую последовательность, и наиболее предпочтительно гетерологичную промоторную, энхансерную, или терминирующую последовательность.

Нуклеиновые кислоты согласно изобретению могут быть приготовлены или получены с помощью метода, известного *per se* (например, путем автоматизированного синтеза ДНК и/или рекомбинантных ДНК технологий), на основании информации относительно аминокислотных последовательностей для антител согласно изобретению, представленных в данной заявке, как описано дополнительно выше по отношению к антителам к PD1 в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, имеющей экспрессионный вектор, кодирующий тяжелую цепь молекулы антитела к LAG3 согласно изобретению и экспрессионный вектор, кодирующий легкую цепь молекулы антитела к LAG3 согласно изобретению.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления, указанные клетки-хозяева представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, например, те, которые были уже описаны выше в связи с вариантом осуществления антител к PD1. В другом варианте осуществления, такие клетки-хозяева представляют собой бактериальные клетки. Другие пригодные клетки представляют собой клетки дрожжей или другие грибковые клетки.

Варианты осуществления изобретения, относящиеся к фармацевтическим композициям, включающим антитела к PD1 и к LAG3, набор частей, способы и применения.

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает набор, содержащий молекулу антитела к PD1 согласно изобретению и молекулу антитела к LAG3. Предпочтительно молекула антитела к LAG3 представляет собой молекулу антитела к LAG3 согласно изобретению.

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает набор, содержащий молекулу антитела к LAG3 согласно изобретению и молекулу антитела к PD1. Предпочтительно молекула антитела к PD1 представляет собой молекулу антитела к PD1 согласно изобретению. Альтернативно, другое антитело к PD1, такое как пембролизумаб или ниволумаб, может использоваться в таком наборе частей.

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую молекулу антитела к PD1 согласно изобретению. Обеспечивается вариант осуществления изобретения, в котором фармацевтическая композиция дополнительно включает молекулу антитела к LAG3. Предпочтительно молекула антитела к LAG3 представляет собой молекулу антитела к LAG3 согласно изобретению.

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую молекулу антитела к LAG3 согласно изобретению. Обеспечивается вариант осуществления изобретения, в котором фармацевтическая композиция дополнительно включает молекулу антитела к PD1. Предпочтительно молекула антитела к PD1 представляет собой молекулу антитела к PD1 согласно изобретению. Альтернативно, другое антитело к PD1, такое как пембролизумаб или ниволумаб, может использоваться в такой фармацевтической композиции.

Для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятным, что на основании изложенного выше, также в настоящей заявке раскрываются фармацевтические композиции для лечения заболевания (как более подробно описано ниже), используя молекулы антител согласно изобретению, описанные выше, а также способы лечения заболевания (как более подробно описано ниже) с применением таких фармацевтических композиций или молекул антител согласно изобретению.

Для исключения неопределенности, набор и фармацевтическая композиция согласно изобретению может содержать любую из специфических молекул антител к PD1 согласно изобретению и/или молекул антитела к LAG3 согласно изобретению, как описано выше.

Если молекула антитела к PD1 согласно изобретению и молекула антитела к LAG3 согласно изобретению вводятся одновременно с помощью одного и того же пути введения, то они могут вводиться в качестве различных фармацевтических препаратов или композиций или в виде части комбинированного фармацевтического препарата или композиции. Также, если молекулу антитела к PD1 согласно изобретению и молекулу антитела к LAG3 согласно изобретению используют в качестве части комбинированной схемы лечения, то каждое из антител может вводиться в таком же количестве и в соответствии с такой же схемой, как используется, когда одно из антител используется самостоятельно, и такое комбинированное применение может приводить или может не приводить к синергетическому эффекту. Тем не менее, если комбинированное применение антител приводит к синергетическому эффекту, то также может быть возможно уменьшать количество одного или обоих антител, при этом все еще достигается желательное терапевтическое действие. Это может быть пригодно, например, для избегания, ограничения или уменьшения любых нежелательных побочных действий, которые связаны с применением одного или нескольких веществ или начал, когда они используются в их общепринятых количествах, при этом все еще получая желательный фармакологический или терапевтический эффект.

Фармацевтические композиции, способы введения, дозировки.

Изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям для лечения заболеваний (как более подробно описано ниже), где такие композиции содержат по меньшей мере одну молекулу антитела согласно изобретению. Изобретение дополнительно охватывает способы лечения заболевания (как более подробно описано ниже) с использованием по меньшей мере одной молекулы антитела согласно изобретению или фармацевтической композиции, как описано ранее, и дополнительно охватывает применение лекарственного средства для лечения такого заболевания путем применения такой(их) молекулы (молекул) антитела согласно изобретению или фармацевтической композиции.

Молекулы антител согласно изобретению и/или композиции, которые их содержат, могут вводиться пациенту, который в этом нуждается, любым подходящим образом, в зависимости от специфического(ой) используемого(ой) фармацевтического препарата или композиции. Таким образом, молекулы антител согласно изобретению и/или композиции, которые их содержат, могут вводиться, например, внутривенно (в/в), подкожно (п/к), внутримышечно (в/м), внутрибрюшинно (в/б), чрескожно, перорально, подязычно (например, в форме сублингвальной таблетки, спрея или капель, помещаемых под язык и абсорбируемых через слизистые мембраны в сеть капилляров под языком), (интра-)назально (например, в форме назального спрея и/или в виде аэрозоля), местно, с помощью суппозитория, путем ингаляции, или с помощью любого другого подходящего способа в эффективном количестве или дозе.

Молекулы антител согласно изобретению и/или композиции, которые их содержат, вводятся в соответствии со схемой лечения, которая является подходящей для лечения и/или ослабления заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению или ослаблению. Лечащий врач обычно может определить подходящую схему лечения, в зависимости от таких факторов, как заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению или ослаблению, тяжесть заболевания, тяжесть его симптомов, специфических используемых молекул антител согласно изобретению, специфического пути введения и используемого фармацевтического препарата или композиции, возраста, пола, веса, питания, общего состояния пациента, и сходных факторов, хорошо известных лечащему врачу. В целом, схема лечения будет включать введение одной или нескольких молекул антител согласно изобретению, или одной или нескольких композиций, содержащих такие антитела, в терапевтически эффективных количествах или дозах.

В целом, для лечения и/или ослабления заболеваний, нарушений и состояний, указанных в настоящей заявке, и в зависимости от специфического заболевания, нарушения или состояния, подвергаемого лечению, эффективности используемой специфической молекулы антитела согласно изобретению, специфического пути введения и специфического используемого фармацевтического препарата или композиции, молекулы антител согласно изобретению обычно будут вводить в количестве в диапазоне от 0,005 до 20,0 мг на кг веса тела и дозе, предпочтительно в диапазоне от 0,05 до 10,0 мг/кг/дозу, и более предпочтительно в диапазоне от 0,5 до 10 мг/кг/дозу, либо непрерывно (например, путем инфузии) или более предпочтительно в виде однократных доз (таких как, например, два раза в неделю, недельных, или месячных доз; см. ниже), но могут существенно изменяться, в особенности, в зависимости от вышеуказанных параметров. Таким образом, в некоторых случаях, может быть достаточным применить дозу, меньшую, чем минимальная доза, указанная выше, в то время как в других случаях верхний предел может быть превышен. При введении больших количеств, может быть желательным разделить их на несколько меньших доз, распределенных в течение суток.

В зависимости от специфической молекулы антитела согласно изобретению и ее специфических фармакокинетических и других свойств, она может вводиться раз в сутки, каждый второй, третий, четвертый, пятый или шестой день, еженедельно, ежемесячно и др. Схема введения может включать длительное, продолжающееся неделями, лечение. "Длительное" обозначает по меньшей мере две недели и предпочтительно длительность составляет месяцы или годы.

Эффективность молекул антител согласно изобретению и композиций, которые их содержат, можно тестировать, используя любые подходящие исследования в условиях *in vitro*, анализы на основании клеток, анализы *in vivo* и/или на животных моделях, известные *per se*, или любые их комбинации, в зависимости от специфического вовлеченного заболевания. Подходящие анализы и животные модели будут понятными для квалифицированного специалиста в данной области техники, и например, включают анализы и животные модели, используемые в примерах ниже.

Препараты.

Для фармацевтического применения, молекулы антител согласно изобретению могут быть приготовлены в виде фармацевтического препарата, содержащего (I) по меньшей мере одно антитело согласно изобретению (т.е. антитело к PD1 согласно изобретению или антитело к LAG3 согласно изобретению или оба типа антител согласно изобретению совместно) и (II) по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, наполнитель, адъювант, и/или стабилизатор, и (III) необязательно один или несколько дополнительных фармакологически активных полипептидов и/или соединений. "Фармацевтически приемлемый" обозначает, что соответствующий материал не проявляет какого-либо биологического или других нежелательных побочных эффектов, при введении индивидууму и не взаимодействует отрицательным образом с любыми другими компонентами фармацевтической композиции (такими как, например, фармацевтически активный компонент), в которой он содержится. Специфические примеры можно найти в стандартных пособиях, таких как, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Publishing Company, USA (1990). Например, антитела согласно изобретению могут быть приготовлены в виде препарата и вводиться с помощью любого способа, известного *per se*, для общепринятых антител и фрагментов антител и других фармацевтически активных белков. Таким образом, в соответствии с дальнейшим вариантом осуществления, изобретение относится к фармацевтической композиции или препарату, которая(ый) содержит по меньшей мере одно из антител согласно изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, наполнитель, адъювант и/или стабилизатор, и необязательно один или несколько дополнительных фармакологически активных веществ.

Фармацевтические препараты для парентерального введения, такого как внутривенная, внутримышечная, подкожная инъекция или внутривенная инфузия, могут представлять собой, например, стерильные растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии, или порошки, которые содержат активный компонент и которые являются подходящими, необязательно после дополнительной стадии растворения или разведения, для инфузии или инъекции. Подходящие носители или разбавители для таких препаратов включают, например, без ограничений, стерильную воду и фармацевтически приемлемые водные буферы и такие растворы, как физиологический фосфатно-солевой буферный раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы, и раствор Хенска; водные масла; глицерин; этанол; гликоли, такие как пропиленгликоль, а также минеральные масла, животные масла и растительные масла, например, арахисовое масло, соевое масло, а также их подходящие смеси.

Растворы молекул антител согласно изобретению также могут содержать консервант для предотвращения роста микроорганизмов, такой как антибактериальные и противогрибковые агенты, например, п-гидроксibenзоаты, парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота, тиомерсаль, (соли щелочных металлов) этилендиамин тетрауксусной кислоты, и другие. Во многих случаях, будет являться желательным включать изотонические агенты, например, сахара, буферы или хлорид натрия. Необязательно, можно использовать эмульсификаторы и/или диспергирующие вещества. Можно поддерживать надлежащую текучесть, например, путем образования липосом, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии или путем применения поверхностно-активных веществ. Также можно добавлять другие агенты, замедляющие абсорбцию, например, моностеарат алюминия и желатин. Растворы можно заполнять во флаконы для инъекций, ампулы, сосуды для инфузий, и другие.

Во всех случаях, конечная дозированная форма должна быть стерильной, жидкой и стабильной в условиях изготовления и хранения. Стерильные растворы для инъекций приготавливаются путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с различными другими компонентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительными методами приготовления является технологии сушки в вакууме и лиофильной сушки, с помощью которых получают порошок активного компонента плюс любой дополнительный желательный компонент, присутствующий в предварительно профильтрованных стерилизацией растворах.

Обычно, предпочтительными являются водные растворы или суспензии. Как правило, подходящие препараты для терапевтических белков, таких как антитела согласно изобретению, представляют собой забуференные белковые растворы, такие как растворы, включающие белок в подходящей концентрации

(такой как, от 0,001 до 400 мг/мл, предпочтительно от 0,005 до 200 мг/мл, более предпочтительно от 0,01 до 200 мг/мл, более предпочтительно 1,0-100 мг/мл, например 1,0 мг/мл (в/в введение) или 100 мг/мл (п/к введение) и водный буфер, такой как:

фосфатно-солевую забуференный раствор, pH 7,4,

другие фосфатные буферы, pH от 6,2 до 8,2,

ацетатные буферы, pH от 3,2 до 7,5, предпочтительно pH от 4,8 до 5,5,

гистидиновые буферы, pH от 5,5 до 7,0,

сукцинатные буферы, pH от 3,2 до 6,6, и

цитратные буферы, pH от 2,1 до 6,2,

и, необязательно, соли (например, NaCl) и/или сахара (такие как, например, сахароза и трегалоза) и/или другие полиспирты (такие как, например, маннит и глицерин) для обеспечения изотоничности раствора.

Предпочтительными буферными белковыми растворами являются растворы, включающие приблизительно 0,05 мг/мл антитела согласно изобретению, растворенного в 25 мМ фосфатного буфера, pH 6,5, доведенного до изотоничности путем добавления 220 мМ трегалозы. Дополнительно, в такие растворы можно включать другие агенты, такие как детергент, например, 0,02% Твин-20 или Твин-80. Препараты для подкожного введения могут включать существенно более высокие концентрации антитела согласно изобретению, такие как вплоть до 100 мг/мл или даже выше 100 мг/мл. Тем не менее, для квалифицированного специалиста в данной области техники будет понятным, что компоненты и их количества, как описано выше, представляют только один, предпочтительный вариант. Их альтернативы и вариации будут легко понятными для квалифицированного специалиста в данной области техники, или легко могут быть представлены, на основании вышеприведенного раскрытия.

В соответствии с дальнейшим аспектом осуществления изобретения, молекула антитела согласно изобретению может использоваться в комбинации с устройством, пригодным для введения антитела, таким как шприц, шприц-ручка, микронасос или другое устройство.

Терапевтические применения.

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает способ лечения злокачественного новообразования, включающий введение пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества молекулы антитела к PD1 согласно изобретению. В предпочтительном варианте осуществления способ дополнительно включает введение такому пациенту молекулы антитела к LAG3. Предпочтительно молекула антитела к LAG3 представляет собой молекулу антитела к LAG3 согласно изобретению.

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает молекулу антитела к PD1 согласно изобретению для применения в способе лечения злокачественного новообразования. В предпочтительном варианте осуществления, дальнейший аспект включает дополнительное применение молекулы антитела к LAG3. Предпочтительно молекула антитела к LAG3 представляет собой молекулу антитела к LAG3 согласно изобретению.

Дальнейший аспект изобретения представляет собой применение молекулы антитела к PD1 согласно изобретению для приготовления фармацевтической композиции для лечения злокачественного новообразования. В предпочтительном варианте осуществления, дальнейший аспект включает дополнительное применение молекулы антитела к LAG3. Предпочтительно молекула антитела к LAG3 представляет собой молекулу антитела к LAG3 согласно изобретению.

В варианте осуществления, молекулу антитела к PD1 вводят одновременно, конкурентно, последовательно, один за другим, альтернативно или раздельно, с молекулой антитела к LAG3.

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает способ лечения злокачественного новообразования, включающий введение пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества молекулы антитела к LAG3 согласно изобретению. В предпочтительном варианте осуществления способ дополнительно включает введение такому пациенту молекулы антитела к PD1. Предпочтительно молекула антитела к LAG3 представляет собой молекулу антитела к PD1 согласно изобретению.

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает молекулу антитела к LAG3 согласно изобретению для применения в способе лечения злокачественного новообразования. В предпочтительном варианте осуществления, дальнейший аспект включает дополнительное применение молекулы антитела к PD1. Предпочтительно молекула антитела к PD1 представляет собой молекулу антитела к PD1 согласно изобретению.

Дальнейший аспект изобретения представляет собой применение молекулы антитела к LAG3 согласно изобретению для приготовления фармацевтической композиции для лечения злокачественного новообразования. В предпочтительном варианте осуществления, дальнейший аспект включает дополнительное применение молекулы антитела к PD1. Предпочтительно молекула антитела к PD1 представляет собой молекулу антитела к PD1 согласно изобретению.

В варианте осуществления, молекулу антитела к LAG3 вводят одновременно, конкурентно, последовательно, один за другим, альтернативно или раздельно, с молекулой антитела к PD1.

Для исключения неопределенности, аспекты медицинских применений согласно изобретению могут включать любые их специфических молекула антител к PD1 согласно изобретению и/или молекул

антитела к LAG3 согласно изобретению, как описано выше.

Благодаря их биологическим свойствам, антитела согласно изобретению пригодны для лечения заболеваний, характеризующихся чрезмерной или атипичной пролиферацией клеток, таких как злокачественное новообразование.

Как используется в настоящей заявке, термин "злокачественное новообразование" охватывает все типы злокачественного роста или онкогенных процессов, метастатических тканей или злокачественно трансформированных клеток, тканей или органов, независимо от гистопатологического типа или стадии инвазивности. Примеры злокачественных нарушений включают, но не ограничиваясь только ими, солидные опухоли, гематологические злокачественные опухоли, опухоли мягких тканей и метастатические поражения. Примеры солидных опухолей включают злокачественные образования, например, саркомы, и карциномы (включая аденокарциномы и плоскоклеточные карциномы) различных систем органов, такие как те, которые поражают печень, легкие, молочную железу, лимфоидную систему, желудочно-кишечный тракт (например, ободочную кишку), мочеполовой тракт (например, почечные, уротелиальные клетки), предстательной железы и глотки. Аденокарциномы включают злокачественные образования, такие как главным образом, рак ободочной кишки, рак прямой кишки, почечно-клеточную карциному, рак печени, немелкоклеточный рак легких, рак тонкого кишечника и рак пищевода. Плоскоклеточные карциномы включают злокачественные образования, например, в легких, пищеводе, коже, области головы и шеи, ротовой полости, анального отверстия и шейки матки. В одном варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой меланому, например, меланому на поздней стадии. Метастатические поражения вышеуказанных злокачественных новообразований также можно лечить или предотвращать, используя способы и композиции, описанные в настоящей заявке.

Типичные злокачественные новообразования, рост которых можно ингибировать, используя молекулы антител, описанные в настоящей заявке, включают злокачественные новообразования, типично отвечающие на иммунотерапию.

Например, можно лечить следующие злокачественные новообразования, опухоли и другие пролиферативные заболевания с помощью антител в соответствии с изобретением, но не ограничиваясь только ими.

Злокачественные новообразования головы и шеи; злокачественные новообразования легких, такие как, например, немелкоклеточный рак легких (NSCLC) и мелкоклеточный рак легких (SCLC); опухоли средостения, такие как, например, нейрогенные опухоли и мезенхимальные опухоли; злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), такие как, например, злокачественные новообразования пищевода, желудка (рак желудка), поджелудочной железы, печени и желчных протоков (включая, например, гепато-целлюлярную карциному (HCC)), и тонкого и толстого кишечника (включая, например, рак ободочной и прямой кишки); рак предстательной железы; рак яичек; злокачественные новообразования женских половых органов, такие как, например, злокачественные новообразования яичников; злокачественные новообразования молочной железы, такие как, например, карцинома молочной железы, гормон-рецептор-положительный рак молочной железы, Her2 положительный рак молочной железы, и трижды негативный рак молочной железы; злокачественные новообразования эндокринной системы; саркомы мягких тканей, такие как, например, фибросаркома, рабдомиосаркома, ангиосаркома, саркома Капоши; саркомы костей, такие как, например, миелома, остеосаркома, опухоль Юинга, фибросаркома, остеохондрома, осетобластома, и хондробластома; мезотелиомы;

злокачественные новообразования кожи, такие как, например, базальноклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, карцинома из клеток Меркеля, и меланома; новообразования центральной нервной системы и головного мозга, такие как, например, астроцитомы, глиобластома, глиомы нейробластомы, и ретинобластомы; лимфомы и лейкозы такие как, например, неходжкинские В-клеточные лимфомы (NHL), неходжкинские Т-клеточные лимфомы, хронический В-клеточный лимфоцитарный лейкоз (B-CLL), хронический Т-клеточный лимфоцитарный лейкоз (T-CLL), болезнь Ходжкина (HD), лейкоз из больших зернистых лимфоцитов (LGL), хронический миелоидный лейкоз (CML), острый миелоидный/миелоидный лейкоз (AML),

острый лимфатический/лимфобластный лейкоз (ALL), множественная миелома (MM), плазмацитома и миелодиспластические синдромы (MDS); и злокачественные новообразования неизвестного первичного участка.

В предпочтительном варианте осуществления согласно изобретению злокачественное новообразование представляет собой рак легких, предпочтительно немелкоклеточный рак легких (NSCLC).

Все злокачественные новообразования, опухоли, неоплазмы и т.д., указанные выше, которые характеризуются их специфической локализацией/происхождением в организме, охватывают как первичные опухоли, так и метастатические опухоли, имеющие происхождение из них.

Представляется возможным, что пациент более вероятно отвечает на лечение с применением молекулы антитела согласно изобретению (как описано в настоящей заявке), если пациент имеет злокачественное новообразование, которое характеризуется наличием высокой экспрессии PD-L1, и/или где злокачественное новообразование собой инфильтровано противоопухолевыми иммунными клетками, например, лимфоцитами, инфильтрующими опухоль. В данном случае, обеспечивается вариант осуществ-

ления изобретения, в котором пациент, подвергаемый лечению, имеет злокачественное новообразование, которое характеризуется наличием высокой экспрессии PD-L1 и/или где злокачественное новообразование инфильтровано противоопухолевыми иммунными клетками.

Кроме того, представляется возможным, что пациент более вероятно отвечает на лечение с применением молекулы антитела согласно изобретению (как описано в настоящей заявке), если пациент имеет злокачественное новообразование, которое характеризуется наличием высокой мутационной нагрузки. Примеры, как может быть оценена высокая мутационная нагрузка, включают определение того, будет ли злокачественное новообразование характеризоваться наличием микросателлитных нестабильностей, или плохими эффективностями репарации ошибочно спаренных оснований ДНК. Полагают, что такие злокачественные новообразования являются более иммуногенными и, следовательно, более вероятно отвечают на лечение с применением иммуномодуляторных терапевтических схем, таких как молекула антитела согласно изобретению. В данном случае, обеспечивается вариант осуществления изобретения, в котором пациент, подвергаемый лечению, имеет злокачественное новообразование, которое характеризуется наличием высокой мутационной нагрузки.

Молекулы антител согласно изобретению могут использоваться в терапевтических схемах в контексте лечения первой линии, второй линии, или любой дальнейшей линии лечения.

Молекулы антител согласно изобретению могут использоваться для предотвращения, кратковременного или продолжительного лечения вышеуказанных заболеваний, необязательно также в комбинации с лучевой терапией и/или хирургией.

Несомненно, описанное выше также включает применение молекул антител согласно изобретению в различных способах лечения вышеописанных заболеваний путем введения терапевтически эффективной дозы пациенту, который в этом нуждается, а также применения этих молекул антител для приготовления лекарственных средств для лечения таких заболеваний, а также фармацевтических композиций, включающих такие молекулы антител согласно изобретению, а также препараты и/или приготовление лекарственных средств, включающих такие антитела согласно изобретению, и др.

Комбинации с другими активными веществами или лечениями.

Молекула антитела согласно изобретению, или комбинация антитела к PD1 согласно изобретению и антитела к LAG3 согласно изобретению, может использоваться самостоятельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами, в особенности выбранными из химиотерапевтических средств, таких как средства, повреждающие ДНК, или терапевтически активных соединений, которые ингибируют ангиогенез, пути передачи сигналов или митотические контрольные точки в раковых клетках.

Дополнительное терапевтическое средство может вводиться одновременно с, необязательно в качестве компонента одного и того же фармацевтического препарата, или перед или после введения молекулы антитела.

В определенных вариантах осуществления, дополнительное терапевтическое средство может представлять собой, без ограничений, один или несколько ингибиторов, выбранных из группы ингибиторов EGFR, VEGFR, HER2-neu, Her3, AuroraA, AuroraB, PLK и PI3 киназы, FGFR, PDGFR, Raf, Ras, KSP, PDK1, PTK2, IGF-R или IR.

Дальнейшими примерами дополнительных лекарственных средств являются ингибиторы CDK, Akt, src/bcr abl, cKit, cMet/HGF, c-Myc, Flt3, HSP90, hedgehog антагонисты, ингибиторы JAK/STAT, Mek, mTog, NFκappaB, протеасомы, Rho, ингибитор wnt передачи сигналов или ингибитор пути убиквитинирования или другой ингибитор Notch пути передачи сигналов.

Примерами ингибиторов Aurora являются, без ограничений, PHA-739358, AZD-1152, AT 9283, CYC-116, R-763, VX-680, VX-667, MLN-8045, PF-3814735.

Примером для PLK ингибитора является GSK-461364.

Примерами для raf ингибиторов являются BAY-73-4506 (также VEGFR ингибитор), PLX 4032, RAF-265 (также дополнительно VEGFR ингибитор), сорафениб (также дополнительно VEGFR ингибитор), и XL 281.

Примерами для KSP ингибиторов являются испинесиб, ARRY-520, AZD-4877, CK-1122697, GSK 246053A, GSK-923295, MK-0731, и SB-743921.

Примерами для src и/или bcr-abl ингибиторов являются дазатиниб, AZD-0530, бозутиниб, XL 228 (также IGF-1R ингибитор), нилотиниб (также PDGFR и cKit ингибитор), иматиниб (также cKit ингибитор), и NS-187.

Примером для PDK1 ингибитора является BX-517.

Примером для Rho ингибитора является BA-210.

Примерами для ингибиторов PI3 киназы являются PX-866, BEZ-235 (также mTog ингибитор), XL 418 (также Akt ингибитор), XL-147, и XL 765 (также mTog ингибитор).

Примерами для ингибиторов cMet или HGF являются XL-184 (также ингибитор VEGFR, cKit, Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (также ингибитор VEGFR), MGCD-265 (также ингибитор VEGFR, Ron, Tie2), SU-11274, PHA-665752, AMG-102, и AV-299.

Примером для c-Myc ингибитора является CX-3543.

Примерами для Flt3 ингибиторов являются AC-220 (также ингибитор cKit и PDGFR), KW 2449, лестауртиниб (также ингибитор VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348 (также ингибитор JAK2), XL-999 (также ингибитор cKit, FGFR, PDGFR и VEGFR), сунитиниб (также ингибитор PDGFR, VEGFR и cKit), и тандутиниб (также ингибитор PDGFR, и cKit).

Примерами для HSP90 ингибиторов являются танеспимицин, алвеспимицин, IPI-504 и CNF 2024.

Примерами для JAK/STAT ингибиторов являются CYT-997 (также взаимодействующий с тубулином), TG 101348 (также ингибитор Flt3), и XL-019.

Примерами для Мек ингибиторов являются ARRY-142886, PD-325901, AZD-8330, и XL 518.

Примерами для mTog ингибиторы являются темсиролимус, AP-23573 (который также действует в качестве VEGF ингибитора), эверолимус (VEGF ингибитор дополнительно). XL-765 (также PI3 киназа ингибитор), и BEZ-235 (также ингибитор PI3 киназы).

Примерами для Akt ингибиторов являются перифозин, GSK-690693, RX-0201, и трицирибин.

Примерами для cKit ингибиторов являются AB-1010, OSI-930 (также действует в качестве VEGFR ингибитора), AC-220 (также ингибитор Flt3 и PDGFR), тандутиниб (также ингибитор Flt3 и PDGFR), акситиниб (также ингибитор VEGFR и PDGFR), XL-999 (также ингибитор Flt3, PDGFR, VEGFR, FGFR), сунитиниб (также ингибитор Flt3, PDGFR, VEGFR), и XL-820 (также действует в качестве VEGFR- и PDGFR ингибитор), иматиниб (также bcr-abl ингибитор), нилотиниб (также ингибитор bcr-abl и PDGFR).

Примерами для hedgehog антагонистов являются IPI-609 и CUR-61414.

Примерами для CDK ингибиторов являются селициклиб, AT-7519, P-276, ZK-CDK (также ингибирующий VEGFR2 и PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-690509, и AG 024322.

Примерами для ингибиторов протеасомы являются бортезомиб, карфилзомиб, и NPI-0052 (также ингибитор NFκappaB).

Примером для ингибитора NFκappaB пути является NPI-0052.

Примером для ингибитора пути убиквитинилирования является NBX-41108.

В предпочтительных вариантах осуществления, дополнительное терапевтическое средство представляет собой антиангиогенное средство.

Примерами антиангиогенных средств являются ингибиторы FGFR, PDGFR и VEGFR или соответствующие лиганды (например, VEGF ингибиторы, такие как пегаптаниб или анти-VEGF антитело бевацизумаб), и талидомиды, такие агенты выбирают из, но не ограничиваясь только ими, нинтеданиб, бевацизумаб, мотезаниб, CDP-791, SU-14813, телатиниб, KRN-951, ZK-CDK (также ингибитор CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiD (иммуномодулирующие лекарственные средства), производное талидомида CC-4047, леналидомид, ENMD 0995, IMC-D11, Ki 23057, бриваниб, цедираниб, XL-999 (также ингибитор cKit и Flt3), 1B3, CP 868596, IMC 3G3, R-1530 (также ингибитор Flt3), сунитиниб (также ингибитор cKit и Flt3), акситиниб (также ингибитор cKit), лестауртиниб (также ингибитор Flt3 и PKC), ваталаниб, тандутиниб (также ингибитор Flt3 и cKit), пазопаниб, GW 786034, PF-337210, IMC-1121B, AVE-0005, AG-13736, E-7080, CHIR 258, сорафениб тозилат (также ингибитор Raf), RAF-265 (также ингибитор Raf), вандетаниб, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (также ингибитор EGFR и Her2), BAY-57-9352 (также ингибитор Raf), BAY-73-4506 (также ингибитор Raf), XL 880 (также ингибитор cMet), XL-647 (также ингибитор EGFR и EphB4), XL 820 (также ингибитор cKit), и нилотиниб (также ингибитор cKit и bcr-abl).

Дополнительное терапевтическое средство также может выбрано из EGFR ингибиторов, оно может представлять собой низкомолекулярный EGFR ингибитор или анти-EGFR антитело. Примерами для анти-EGFR антитела, без ограничений, являются цетуксимаб, панитумумаб, матузумаб; примерами для низкомолекулярного EGFR ингибитора, без ограничений, являются gefitinib, афатиниб, осимертиниб и олмутиниб. Другим примером для EGFR модулятора является EGF слитый токсин.

В качестве EGFR и Her2 ингибиторов, пригодных для комбинации с молекулой антитела согласно изобретению, можно указать лапатиниб, gefitinib, эрлотиниб, цетуксимаб, трастузумаб, нимотузумаб, залутумумаб, вандетаниб (также ингибитор VEGFR), пертузумаб, XL-647, HKI-272, BMS-599626 ARRY-334543, AV 412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (также ингибитор VEGFR), ARRY-333786, IMC-11F8, Zemab.

Другими агентами, которые благоприятно могут комбинироваться в терапии с молекулами антител согласно изобретению, являются тозитумумаб и ибритумумаб тиуксетан (два радиоактивно-меченных анти-CD20 антитела), алемтузумаб (анти-CD52 антитело), денозумаб, (ингибитор лиганда фактора дифференциации остеокластов), галиксимаб (CD80 антагонист), офатумумаб (CD20 ингибитор), зиолиму-маб (CD4 антагонист), SGN40 (модулятор рецептора CD40 лиганда), ритуксимаб (CD20 ингибитор) или мапатумумаб (агонист TRAIL-1 рецептора).

Другие химиотерапевтические средства, которые могут использоваться в комбинации с молекулам антител в соответствии с настоящим изобретением выбирают из, но не ограничиваясь только ими: гормоны, аналоги гормонов и антигормоны (например, тамоксифен, торемифен, ралоксифен, фулвестрант, мегестрол ацетат, флутамид, нилутамид, бикалутамид, ацетат ципротерона, финастерид, ацетат бусерелина, флудрокортисон, флуоксиместрон, медроксипрогестерон, октреотид, арзоксифен, пазиреотид, вапреотид), ингибиторы ароматазы (например, анастрозол, летрозол, лиарозол, эксеместан, атаместан,

форместан), агонисты и антагонисты LHRH (например, ацетат гозерелина, лупролид, абареликс, цетро-реликс, деслорелин, гистрелин, трипторелин), антиметаболиты (например, антифолаты, такие как метотрексат, пеметрексед, аналоги пиримидина, такие, как 5 фторурацил, капецитабин, децитабин, неларабин и гемцитабин, аналоги пурина и аденозина, такие как меркаптопурин тиогуанин, кладрибин и пентостатин, цитарабин, флударабин); противоопухолевые антибиотики (например, антрациклины, такие, как доксорубицин, даунорубицин, эпирубицин и идарубицин, митомицин-С, блеомицин дактиномицин, пликамицин, митоксантрон, пиксантрон, стрептозоцин); производные платины (например, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин, лобоплатин, сатраплатин); алкилирующие агенты (например, эстрамустин, мелхлорэтамин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, дакарбазин, циклофосфамид, ифосфамид, гидроксимочевина, темозоломид, нитрозомочевина, такие, как кармустин и ломустин, тиотепа); антимитотические агенты (например, алкалоиды барвинка, такие, как винбластин, виндезин, винорелбин, винфлунин и винкристин; и таксаны, такие, как паклитаксел, доцетаксел и их препараты, ларотаксел; симотаксел, и эпотилоны, такие, как иксабепилон, патупилон, ZK-EPO); ингибиторы топоизомеразы (например, эпидофиллотоксины, такие, как эпопозид и эпопифос, тенипозид, амсакрин, топотекан, иринотекан) и различные химиотерапевтические агенты, такие, как амифостин, анагрелид, интерферон альфа, прокарбазин, митотан, и порфирин, бексаротен, целекоксиб.

В определенных вариантах осуществления, дополнительное терапевтическое средство может представлять собой дополнительное иммунотерапевтическое средство, такое, как модуляторы следующих ингибиторов контрольной точки: TIM3, PD-L1 (например, атезолизумаб, авелумаб или дурвалумаб), PD-L2, CTLA-4, VISTA, BTLA, TIGIT, CD160, LAIR1, 2B4, CEACAM.

В других вариантах осуществления, иммунотерапевтическое средство может представлять собой противораковую вакцину.

Если два или более веществ или начала используются в качестве части комбинированной схемы лечения, то они могут вводиться с помощью одного и того же пути введения или с помощью различных путей введения, по существу в одно и то же время (т.е. одновременно, конкурентно) или в разное время (например, последовательно, один за другим, попеременно, поочередно, или в соответствии с любым другим типом чередующейся схемы).

Если вещества или начала вводятся одновременно с помощью одного и того же пути введения, то они могут вводиться в виде различных фармацевтических препаратов или композиций или в виде части комбинированного фармацевтического препарата или композиции. Также, если два или более активных веществ или начал используются в виде части комбинированной схемы лечения, то каждое из этих веществ или начал может вводиться в одном и том же количестве и в соответствии с такой же схемой, которая используется, если соединение или начало используется самостоятельно, и такие комбинированные применения могут приводить или могут не приводить к синергетическим эффектам. Тем не менее, если комбинированное применение двух или более активных веществ или начал приводит к синергетическому эффекту, то также может быть возможно уменьшать количество одного, нескольких или всех вводимых веществ или начал, при этом все еще достигается желательное терапевтическое действие. Это может быть пригодно, например, для избегания, ограничения или уменьшения любых нежелательных побочных действий, которые связаны с применением одного или нескольких веществ или начал, когда они используются в их общепринятых количествах, при этом все еще получая желательный фармакологический или терапевтический эффект.

Несомненно, описанное выше включает препараты, и способы приготовления, антитела согласно изобретению для комбинированного применения с вышеописанными партнерами комбинации. Также охватываются препарат, и способы приготовления, вышеописанных партнеров комбинации для комбинированного применения с антителами согласно изобретению.

Молекулы антител согласно изобретению могут использоваться самостоятельно или в комбинации с другими схемами лечения, например, хирургическим вмешательством и/или лучевой терапией.

Наборы и способы приготовления и очистки.

Изобретение также охватывает наборы, содержащие по меньшей мере одно антитело согласно изобретению и один или несколько других компонентов, выбранных из группы, включающей другие лекарственные средства, используемые для лечения заболеваний и нарушений, как описано выше.

В одном варианте осуществления, набор включает композицию, содержащую эффективное количество молекулы антитела к PD1 согласно изобретению в единичной дозированной форме. В другом варианте осуществления, набор включает композицию, содержащую эффективное количество молекулы антитела к LAG3 согласно изобретению в единичной дозированной форме. В дальнейшем варианте осуществления, набор включает как композицию, содержащую эффективное количество молекулы антитела к PD1 согласно изобретению в единичной дозированной форме, так и композицию, содержащую эффективное количество молекулы антитела к LAG3 согласно изобретению в единичной дозированной форме.

В некоторых вариантах осуществления, набор включает стерильный контейнер, который содержит такую композицию; такие контейнеры могут представлять собой коробки, ампулы, бутылки, флаконы, пробирки, пакеты, мешочки, блистер-пакеты, или другие подходящие формы контейнеров, известные из уровня техники. Такие контейнеры могут быть изготовлены из пластика, стекла, ламинированной бума-

ги, металлической фольги или других материалов, подходящих для удерживания лекарственных средств.

Если это является желательным, то молекула антитела согласно изобретению, или комбинация обоих типов антител согласно изобретению, обеспечиваются совместно с инструкцией по введению антитела/антител субъекту, имеющему злокачественное новообразование. Инструкции обычно будут включать информацию относительно применения композиции для лечения или предотвращения злокачественного новообразования. В других вариантах осуществления, инструкции включают по меньшей мере одно из следующих: описание терапевтического средства; схема дозирования и введения для лечения или предотвращения злокачественного новообразования или его симптомов; предосторожности; предупреждения; показания; противопоказания; информация о передозировке; побочные реакции; фармакология на животных; клинические исследования; и/или ссылки. Инструкции могут быть напечатаны непосредственно на контейнере (если он есть), или в виде наклейки, наклеенной на контейнер, или в виде отдельного листа, брошюры, карты, или проспекта, поставляемых в или с контейнером.

Изобретение дополнительно обеспечивает способы приготовления молекулы антитела согласно изобретению, такие способы обычно включают стадии:

культивирование клеток-хозяев, содержащих экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу антитела согласно изобретению в условиях, которые предоставляют возможность образования антитела согласно изобретению; и

восстановление молекулы антитела, экспрессируемой клетками-хозяевами из культуры; и необязательно дополнительную очистку и/или модификацию и/или приготовление препарата молекулы антитела согласно изобретению.

Нуклеиновая кислота согласно изобретению может представлять собой, например, молекулу ДНК, содержащую кодирующие последовательности, а также регуляторные последовательности и необязательно природные или искусственные интроны, или может представлять собой молекулу кДНК. Она может иметь свои исходные кодоны или могут иметь оптимизированные используемые кодоны, которые были специфически адаптированы для экспрессии в предназначенной клетке-хозяине или организме-хозяине. В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения, нуклеиновая кислота согласно изобретению по существу находится в выделенной форме, как определено выше.

Нуклеиновую кислоту согласно изобретению типично инкорпорируют в экспрессионный вектор, т.е. в вектор, который может обеспечивать экспрессию полипептида, при трансфекции в подходящей клетке-хозяине или другой экспрессионной системе.

Для приготовления антител согласно изобретению, квалифицированный специалист в данной области техники может выбирать из различных экспрессионных систем, хорошо известных в данной области техники, например, тех, которые описаны в обзоре Kirgjanow и Le Gall, 2004.

Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, космиды, EBV производные эписом и другие. Экспрессионный вектор и последовательности, контролирующие экспрессию, выбирают таким образом, чтобы они были совместимыми с клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела могут быть вставлены в отдельные векторы. В определенных вариантах осуществления, обе последовательности ДНК инсертируют в тот же самый экспрессионный вектор.

Общепринятые векторы представляют собой такие векторы, которые кодируют функционально полные СН (константную тяжелую) или CL (константную легкую) последовательности иммуноглобулина человека, с подходящими рестрикционными сайтами, конструируют таким образом, чтобы любую VH (вариабельную тяжелую) или VL (вариабельную легкую) последовательность легко можно было вставить и экспрессировать, как описано выше. Для тяжелой цепи антитела, она может представлять собой, без ограничений, любой IgG изотип (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) или другие иммуноглобулины, включая аллельные варианты.

Рекомбинантный экспрессионный вектор также может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. ДНК, кодирующая цепь антитела, может быть клонирована в векторе таким образом, что сигнальный пептид связан в рамке с аминоконцом ДНК цепи зрелого антитела. Сигнальный пептид может представлять собой иммуноглобулиновый сигнальный пептид или гетерологичный пептид из неиммуноглобулинового белка. Альтернативно, ДНК последовательность, кодирующая цепь антитела, уже может содержать последовательность сигнального пептида.

Дополнительно к ДНК последовательности цепи антитела, рекомбинантные экспрессионные векторы типично несут регуляторные последовательности, необязательно гетерологичные регуляторные последовательности, включая промоторы, энхансеры, сигналы терминации и полиаденилирования и другие элементы, контролирующие экспрессию, которые контролируют экспрессию цепи антитела в клетке-хозяине. Примерами для промоторных последовательностей (иллюстрирующие экспрессию в клетках млекопитающих) являются промоторы и/или энхансеры, имеющие происхождение из CMV (такие как CMV вирус обезьян 40 (SV40) промотор/энхансер), аденовирус, (например, основной поздний промотор аденовируса (AdMLP)), полиома и сильные промоторы млекопитающих, такие как нативный иммуноглобулиновый и актиновый промоторы. Примерами для сигналов полиаденилирования являются BGH polyA, SV40 поздний или ранний polyA; альтернативно, можно использовать 3'UTR генов иммуноглобулинов, и т.д.

Рекомбинантные экспрессионные векторы также могут нести последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и селективируемые маркерные гены. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие тяжелую цепь или ее антиген-связывающую часть и/или легкую цепь или ее антиген-связывающую часть антитела согласно изобретению, и векторы, содержащие такие молекулы ДНК, могут быть интродуцированы в клетки-хозяева, например, бактериальные клетки или клетки высших эукариот, например, клетки млекопитающих, в соответствии с методами трансфекции, хорошо известными в данной области техники, включая опосредованную липосомами трансфекцию, опосредованную поликатионами трансфекцию, слияние протопластов, микроинъекции, осаждение с помощью фосфата кальция, электропорацию или перенос вирусными векторами.

Предпочтительно, молекулы ДНК, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь, присутствуют в двух экспрессионных векторах, которые совместно трансфектируют в клетку-хозяин, предпочтительно клетку млекопитающего.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области техники и включают, в частности, клетки яичника китайского хомячка (CHO), NS0, SP2/0 клетки, HeLa клетки, клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки карциномы человека (например, Нер G2 и А-549 клетки), 3Т3 клетки или производные/потомства любой такой клеточной линии. Можно использовать другие клетки млекопитающих, включая, но не ограничиваясь только ими, клеточные линии человека, мыши, крысы, обезьяны и грызунов, или другие эукариотические клетки, включая, но не ограничиваясь только ими, клетки дрожжей, насекомых и растений, или прокариотические клетки, такие как бактериальные.

Молекулы антител согласно изобретению продуцируются путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточном для предоставления возможности экспрессии молекул антитела в клетках-хозяевах. Молекулы антител предпочтительно восстанавливают из культуральной среды в виде секретируемого полипептида или они могут быть восстановлены из лизатов клеток-хозяев, если, например, они экспрессируются без секреторного сигнала. Также необходимо очищать молекулы антител, используя стандартные методы очистки белков, используемые для рекомбинантных белков и белков клеток-хозяев таким образом, чтобы получить по существу гомогенные препараты антитела. В качестве примера, ультрасовременные методы очистки в данной области техники, пригодные для получения молекул антител согласно изобретению, включают, в качестве первой стадии, удаление клеток и/или корпускулярного клеточного дебриса из культуральной среды или лизата. После этого антитело очищают от загрязняющих растворимых белков, полипептидов и нуклеиновых кислот, например, путем фракционирования на иммуноаффинных или ионо-обменных колонках, осаждением этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, сефадексовой хроматографии, хроматографии на диоксиде кремния или на катионо-обменной смоле. В качестве конечной стадии в процессе получения препарата молекулы антитела, очищенную молекулу антитела можно высушивать, например, лиофилизировать, как описано ниже, для терапевтических применений.

Примеры

Пример 1. Создание мышинных антител, которые связываются с PD1 и блокируют связывание PDL-1 с PD1.

Синтезировали внеклеточный домен (ECD) белка PD1 человека (аминокислоты 21-170 номер доступа GenBank AAO63583.1) и приготавливали в качестве иммуногена. После этого мышей иммунизировали и затем бустировали с PD1 ECD белком человека с последующими стандартными лабораторными методиками иммунизации.

После этого у иммунизированных мышей отбирали образцы плазмы и подвергали скринингу для идентификации особей с достаточным титром иммуноглобулина к PD1. После осуществления стандартных лабораторных методов, собирали лимфоциты от отобранных мышей и сливали с мышинными миеломными клетками для создания гибридом. Впоследствии эти гибридомы подвергали скринингу для идентификации гибридомных линий, которые продуцируют молекулы антител, которые проявляют связывание в нМ диапазоне низкой аффинности с PD1 человека (ECD), и также блокируют связывание PD-L1 человека с PD1, используя анализы, описанные в настоящей заявке ниже.

Отбирали некоторые гибридомы, продуцирующие антитела, которые связываются с PD1 человека и блокируют связывание с PD-L1 человека, вариабельные домены антител выделяли и клонировали, используя стандартные наборы ПЦР праймеров.

С помощью этого исследования, идентифицировали мышиную гибридомную линию, обозначаемую как 77E11, которая продуцирует моноклональные антитела, проявляющие низкие нМ аффинности связывания с PD1 человека (ECD) и также блокируют связывание PD-L1 с PD1.

Аминокислотная последовательность вариабельного домена моноклонального антитела, продуцируемого 77E11, представлена на фиг. 1.

Пример 2. Создание гуманизированных антител к PD1.

V-гены мышинной 77E11 гибридомной клеточной линии идентифицировали с помощью ПЦР и протоколов секвенирования, хорошо известных в данной области техники. После этого V-гены сливали с

наиболее близкими подходящими генами зародышевой линии человека, используя стандартные техники молекулярной биологии. В случае 77E11, это приводит к получению химерных мышинных/человеческих молекул антител, имеющих мышинные V_k и V_h аминокислотные остатки, слитые с человеческими C_k и C_{h1} аминокислотными остатками.

После приготовления, впоследствии химерное мышинное/человеческое антитело подвергали протоколам "гуманизации". В данном случае, приготавливали мутированные аминокислотные библиотеки химерных 77E11 Fab клонов. Дополнительные положения библиотек также приготавливали таким образом, чтобы удалить препятствующие последовательности (т.е. аминокислотные остатки, которые, как известно, являются иммуногенными или создают потенциальные проблемы при производстве). Эти мутированные библиотеки обычно имеют от 5 до 10 бинарных (мышинных отн. человеческих) положений на V-участок. Некоторые небольшие библиотеки могут быть построены для маркировки специфических проблем в более комплексных V-участках. Такие библиотеки приготавливают, используя стандартные методы в данной области техники, и легко могут использоваться квалифицированным специалистом.

После завершения этой стадии, приготавливали несколько различных "гуманизованных" Fabs, имеющих происхождение из исходной мышинной 77E11 Fab последовательности. Эти гуманизованные Fabs тестировали для определения их способности связываться с PD1 человека и блокировать взаимодействие PD-L1 с PD1. Впоследствии отбирали генетически сконструированные Fabs, которые проявляют активность равную с, или лучше, чем, соответствующие химерные Fab. Их аминокислотную последовательность анализировали для определения доли человеческой последовательности, возможной иммуногенности, и удаления проблемных последовательностей.

После отбора наиболее благоприятных гуманизованных Fabs, их затем помещали в формат человеческого IgG4 (Pro) или IgG1KO иммуноглобулина. IgG4 (Pro) отличается от канонической последовательности IgG4 человека путем наличия серина 241, замененного на пролин, было показано, что это изменение минимизирует динамический обмен Fab-фрагментами между молекулами IgG4. IgG1KO отличается от канонической последовательности IgG1 человека двумя аминокислотными заменами (L234A, L235A), для которых известна минимизация эффекторной функции молекул антител.

После завершения этого исследования, приготавливали 5 различных гуманизованных версий исходного химерного мышинного/человеческого 77E11 Fab. Их обозначали: PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5.

Аминокислотная последовательность CDR для PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5, VH и VL последовательности и полноразмерных HC и LC последовательности представлены в таблице в конце данной заявки. Для исключения неопределенности, корреляция между антителами и их SEQ ID номером также представлена в таблице ниже.

Таблица 1. SEQ ID NO для антител к PD1 согласно изобретению

Анти-тело к PD1	CDR последовательности	VH последовательности	VL последовательности	HC последовательности	LC последовательности
PD1-1	1-6	19	20	29	30
PD1-2	7-12	21	22	31	32
PD1-3	13-18	23	24	33	34
PD1-4	13-18	25	26	35	36
PD1-5	13-18	27	28	37	38

Пример 3. Связывание антитела с PD1 человека и блокирование взаимодействия PD1 лиганда.

Определяли связывание репрезентативных гуманизованных антител к PD1, имеющих происхождение из мышинной 77E11 гибридомы (как описано в примере 2) с PD1 человека.

Аффинности связывания с рекомбинантным мономерным PD1 человека измеряли с помощью SPR, используя прибор ProteOn XPR36. PD1-1, PD1-2 и PD1-3 антитела захватывали на Белок A/G поверхности, которые были амино-связаны с поверхностью. PD1 человека ECD инъецировали над захваченными антителами в течение 600 с при скорости потока 30 мкл/мин и диссоциации в течение 1200 с. Концентрации PD1 человека ECD составляли 0, 6,25, 12,5, 25, 50, и 100 нМ. Фоновые значения от необработанных данных и затем сенсограммы подгоняли универсально к 1:1 связыванию Ленгмюра для получения значений аффинности (K_D).

Используя этот протокол, было определено, что антитела PD1-1, PD1-2 и PD1-3 связываются с PD1 человека, как представлено в таблице ниже.

Таблица 2. Связывание с рекомбинантным PD1 человека (K_D , нМ)

Антитело	K_D , нМ
PD1-1	16,6
PD1-2	61,8
PD1-3	6,0

После этого PD1 антитела согласно изобретению тестировали для определения способности блокировать связывание PD-L1 человека/2 с PD1 человека, экспрессируемых на поверхности CHO клеток.

PD1-экспрессирующие CHO клетки инкубировали с фиксированной концентрацией рекомбинантных меченных биотином PD-L1 или PD-L2 в присутствии антител к PD1 согласно изобретению (PD1 до PD1-5). Смесь инкубировали в течение 1 ч при 37 градусах Цельсия. Клетки, связанные с PD-L1/L2, обнаруживали с помощью меченного европием стрептавидина и флуоресценцию измеряли, используя Perkin Elmer Victor X4 планшет-ридер. Данные представляли в виде процента ингибирования. 0% ингибирование определяли как значение флуоресценции клеток, инкубированных с лигандом без антител, и 100% ингибирование определяли как сигнал, полученный с чистыми клетками без меченных лигандов и антител. Значения процентов ингибирования рассчитывали в Excel и подгонку кривых осуществляли с помощью GraphPad Prism. Экспериментальные точки на кривой представляют собой средние значения измерений в трех повторах.

Кривые ингибирования и mAb концентрации, необходимые для достижения 90% ингибирования (IC₉₀) блокирования лиганда, представлены на фиг. 2 и табл. 3.

Таблица 3. Активности блокирования лиганда PD1 mAbs

Антитело	PD-L1 IC ₉₀ (нМ)	PD-L2 IC ₉₀ (нМ)
PD1-1	2,12	2,09
PD1-2	2,97	3,64
PD1-3	1,68	1,95
PD1-4	2,04	2,71
PD1-5	2,09	3,31

Из этого анализа становится очевидным, что гуманизированные PD1 антитела согласно изобретению проявляют сильные связывающие свойства к PD1, и также эффективно ингибируют взаимодействие PD-1 с PD-L1 и PD-L2.

Пример 4. Стимуляция антиген-специфического Т-клеточного ответа с помощью антитела к PD1.

Гуманизированные антитела к PD1, приготовленные в соответствии со способами, описанными выше, впоследствии тестировали для определения их способности стимулировать продукцию цитокинов специфическими к столбняку CD4 Т-клетками памяти.

Для этого исследования Т-клетки, имеющие происхождение из PBMC здоровых доноров, выращивали в присутствии столбнячного анатоксина и совместно культивировали с аутологическими зрелыми дендритными клетками (DC), загруженными с помощью столбнячного анатоксина в течение 2 дней. Стадию совместного культивирования повторяли второй раз сходным образом в присутствии репрезентативных антител к PD1 согласно изобретению. После окончания второй стадии совместного культивирования, супернатанты анализировали для определения ИФН-гамма с помощью ELISA и результаты представлены на фиг. 3.

Все тестируемые PD1 антитела согласно изобретению проявили четкую дозозависимую очень сильную активацию Т-клеток, как измеряли с помощью высвобождения ИФН-гамма. Когда PD1 антитела согласно изобретению комбинировали с антителами к LAG3, еще более высокую активность можно наблюдать при сравнении с комбинациями эталонных антител к PD1, известных из уровня техники (см. пример 12 и фиг. 8).

Пример 5. Картирование эпитопов гуманизированных моноклональных антител к PD1.

Эпитоп репрезентативного антитела к PD1 согласно изобретению и сравнительной молекулы антитела из уровня техники, имеющей такую же аминокислотную последовательность, как и ниволумаб, анализировали с помощью экспериментов водородно-дейтериевого обмена (HDX), которые обнаруживают отличия эпитопов на уровне индивидуальных аминокислот в эпитопах антител.

HDX анализ показал, что антитело к PD1 согласно изобретению и сравнительная молекула антитела из уровня техники связываются со сходными и перекрывающимися участками PD1 человека. Тем не менее, эпитопы не являются идентичными, с репрезентативным PD1 антителом согласно изобретению, связываясь с дополнительным элементом последовательности, как подробно представлено в табл. 4.

Таблица 4. Картирование эпитопов молекул антител к PD1 с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена

Антитело	PD-1 Участки связывания (ак *)	Эпитоп
сравнительное антитело для ниволумаба	125-138	A ₁₂₅ ISLAPKA QIKESL ** (SEQ ID NO:115)
PD1-3	80-95, 125-138	AAFPEDRSQPGQDCRF (SEQ ID NO:116) A ₁₂₅ ISLAPKA QIKESL ** (SEQ ID NO:115)

* PD1 использовали для нумерации: GenBank AAO63583.1,

** Аминокислоты, задействованные в связывании, показаны жирным шрифтом, отличия подчеркнуты.

Пример 6. Эффективность in vivo молекул антител к PD1 согласно изобретению на hPD-1 модели

"нокин" у мышей.

Целью исследования являлось измерение эффективности молекул антител к PD1 согласно изобретению, используя полностью иммунокомпетентную мышшь, закорнивающей генетическую модификацию, которая заменяет внеклеточный домен мыши PD1 на соответствующий участок PD1 человека. Мышь C57BL/6NTac-PDCD1^{tm(PDCD1)Arte}, используемую в этом эксперименте, получали от ISIS INNOVATION LIMITED, Оксфорд, Англия и обозначали в дальнейшем как "hPD1 нокин мышшь".

MC-38 клетки подкожно инъецировали в лапу hPD1 нокин мышам и лечение начинали в день 6 после инъекции клеток. Мыши получали PBS, изотипный контроль или молекулу антитела к PD1 согласно изобретению в дозе 10 мг/кг два раза в неделю (q3or4d) или PD1-3 вводили только один раз.

На фиг. 4 представлен объем опухоли в динамике во времени для индивидуальных hPD1 нокин мышей, которым имплантировали MC38, и в табл. 5 обобщено ингибирование роста опухоли (TGI) в день 23 после инъекции клеток и полные ответы, наблюдаемые при окончании исследования.

Полный ответ (CR) определяли, если (I) размер опухоли был таким же или меньшим по сравнению с первым измерением и (II) при визуальном осмотре остаточного материала носителя (матригеля) не обнаруживали опухолевой ткани. Может быть продемонстрировано, что однократная схема дозирования PD1-3 показала сильные и противоопухолевые эффекты (TGI=90%; с 2 мышами, у которых проявился CR), эквивалентные по сравнению со схемой дозирования два раза в неделю. В этом исследовании было показано, что даже однократной дозы молекулы антитела к PD1 согласно изобретению достаточно для достижения эффективности, что может быть следствием более длительного периода полужизни.

Таблица 5. TGI для PD1

	TGI [%]	CR [n/10]
PBS	-	0
PD-1 Изотип	12	0
PD1-3 (q3or4d)	83	3
PD1-3 (один раз)	90	2

Пример 7. Доклинические фармакокинетики молекул антител к PD1 согласно изобретению.

Фармакокинетические (ПК) свойства молекулы антитела к PD1 согласно изобретению определяли в в/в ПК исследовании с однократной дозой на яванских макаках.

Молекула антителу к PD1 согласно изобретению, которую вводили в дозе 1 мг/кг в/в, проявляла средний клиренс из плазмы (CL) 0,28 мл/ч/кг. Средний объем распределения (Vss) для PD1-3 составил 58 мл/кг. Средний конечный период полувыведения для PD1-3 составил 11 дней.

AUC и C_{max} PD1-3 в дозе 1 мг/кг у яванских макак были практически идентичными соответствующим параметрам IgG4Pro PD-1 антитела ниволумаб (BMS-936558, опубликованный в Wang, C. и др., Cancer Immunol. Res. 2:846-856, 2014) и пембролизумаб (MK-3475, опубликованный в FDA BLA документе 125514Orig1s000 Pharmacology Review, 2014) в сопоставимым диапазоне доз.

Неожиданно и непредсказуемо, конечный период полужизни, наблюдаемый для PD1-3, был в 1,5-2 раз выше, чем таковой для ниволумаба, как показано на фиг. 5. Это свидетельствует о том, что антитела к PD1 согласно изобретению имеют период полужизни в сыворотке 11 дней. Это отличается от известных сравнительных молекул антител к PD1, которые типично имеют период полужизни от 4 до 6 дней в диапазоне дозирования 0,3-3 мг/кг. Это неожиданная характерная особенность молекул антител согласно изобретению может предоставлять возможность пациенту подвергаться лечению с применением молекул антител согласно изобретению менее часто, по сравнению с таковыми из уровня техники, что может привести к уменьшению количества антител, которое следует принимать, либо в форме уменьшенной частоты введения или в уменьшенной частоте используемого антитела. Принимая во внимание, что молекулы антител к PD1 могут индуцировать нежелательные побочные эффекты у пациентов, как обсуждалось выше, то антитела к PD1 согласно изобретению могут иметь существенное и неожиданное клиническое преимущество по сравнению с уровнем техники.

Пример 8. Идентификация связывания мышинных антител с LAG3.

Синтезировали внеклеточный домен (ECD) белка LAG3 человека (аминокислоты 23-450 номер доступа GenBank NP_002277) и приготавливали в качестве иммуногена. После этого мышей иммунизировали и затем бустировали с помощью белка LAG3 ECD человека с последующими стандартными лабораторными методами иммунизации.

После этого у иммунизированных мышей отбирали образцы плазмы и подвергали скринингу для идентификации особей с достаточным титром иммуноглобулина к LAG3. После осуществления стандартных лабораторных методов, собирали лимфоциты от отобранных мышей и сливали с мышинными миеломными клетками для создания гибридом.

Отбирали некоторые гибридомы, продуцирующие антитела, которые специфически связываются с LAG3 человека, выделяли вариабельные домены антител и клонировали, используя стандартные наборы ПЦР праймеров.

С помощью этого исследования идентифицировали мышиную гибридомную линию, обозначаемую как 49G6b, которые продуцируют моноклональные антитела, проявляющие низкие нМ аффинности свя-

звания с LAG3 (ECD) человека и отбирали для дальнейшего исследования.

Аминокислотная последовательность варибельного домена моноклонального антитела, продуцируемого 496G6, представлена на фиг. 6.

Пример 9. Создание гуманизированных антител к LAG3.

В этом примере, обеспечивали способы и результаты для разработки гуманизированных производных моноклонального антитела, продуцируемого мышью гибридной линией 496G6, описанной в примере 8.

V-гены мышью 496G6 гибридомы идентифицировали с помощью ПЦР и протоколов секвенирования, хорошо известных в данной области техники. Затем V-гены сливали с наиболее близкими подходящими генами зародышевой линии человека, используя стандартные техники молекулярной биологии. В случае 496G6, это приводит к химерному мышиному/человеческому антителу, имеющему мышинные Vk и Vh аминокислотные остатки, слитые с человеческими Ck и Ch1 аминокислотные остатки.

После приготовления, химерное мышиное/человеческое антитело затем подвергли стандартным протоколам "гуманизации", хорошо известных в данной области техники. В этом методе, приготавливали мутированные аминокислотные библиотеки химерных 496G6 Fab клонов. Дополнительные положения библиотек также приготавливали таким образом, чтобы удалить препятствующие последовательности (т.е. аминокислотные остатки, которые, как известно, являются иммуногенными или создают потенциальные проблемы при производстве). Эти мутированные библиотеки обычно имеют от 5 до 10 бинарных (мышинных отн. человеческих) положений на V-участок. Некоторые небольшие библиотеки могут быть построены для маркировки специфических проблем в более комплексных V-участках. Такие библиотеки приготавливают, используя стандартные методы в данной области техники, и легко могут использоваться квалифицированным специалистом.

После завершения этой стадии, приготавливали несколько различных "гуманизированных" Fabs, имеющих происхождение из исходной мышью 496G6 Fab последовательность. Эти гуманизированные Fabs тестировали для определения их способности связываться с LAG3 человека и блокировать взаимодействие МНСII с LAG3. Впоследствии отбирали генетически сконструированные Fabs, которые проявляют активность равную с, или лучше, чем, соответствующие химерные Fab. Их аминокислотную последовательность анализировали для определения доли человеческой последовательности, возможной иммуногенности, и удаления проблемных последовательностей.

После отбора наиболее благоприятных гуманизированных Fabs, их затем помещали в формат IgG4 (Pro) иммуноглобулина человека. IgG4 (Pro) отличается от канонической последовательности IgG4 человека путем наличия серина 241, замененного на пролин, было показано, что это изменение минимизирует динамический обмен Fab-фрагментами между молекулами IgG4.

После завершения этого исследования, приготавливали 5 различных версий гуманизированного антитела исходного химерного мышиное/человеческого 496G6 Fab. Их обозначали: LAG3-1, LAG3-2, LAG3-3, LAG3-4 и LAG3-5.

Аминокислотная последовательность CDR для LAG3-1, LAG3-2, LAG3-3, LAG3-4, LAG3-5, VH и VL последовательности и полноразмерные HC и LC последовательности представлены в таблице в конце данной заявки. Для исключения неопределенности, корреляция между антителами и их SEQ ID номером также представлена в таблице ниже.

Таблица 6. SEQ ID NO для антител к LAG3 согласно изобретению

анти- LAG3 антитело	CDR последова- тельности	VH последова- тельности	VL последова- тельности	HC последова- тельности	LC последова- тельности
LAG3-1	39-44	51	52	61	62
LAG3-2	39-44	53	54	63	64
LAG3-3	39-44	55	56	65	66
LAG3-4	39-44	57	58	67	68
LAG3-5	45-50	59	60	69	70

Пример 10. Связывание антитела с LAG3 человека и блокирование взаимодействия LAG3 лиганда.

Определяли аффинности связывания с рекомбинантным мономерным LAG3 человека, используя SPR.

LAG3-1, LAG3-2, LAG3-3, LAG3-4 и LAG3-5 антитела захватывали на Белок A/G поверхности. LAG3 ECD-Fc человека инъецировали над захваченными антителами в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин и диссоциации в течение 1800 с. Концентрации LAG3 человека ECD составляли 0, 0,625, 1,25, 2,5 и 5 нМ. Фоновые значения отнимали от необработанных данных и затем сенсограммы подгоняли универсально к 1:1 связыванию Ленгмюра для получения значений аффинности (K_D).

Используя этот протокол, определили, что антитела LAG3-1, LAG3-2, LAG3-3, LAG3-4 и LAG3-5 связываются с LAG-3 человека с высокой аффинностью, как представлено в таблице ниже.

Таблица 7. Связывание с рекомбинантным LAG3 человека (K_D, нМ)

Антитело	K _D , нМ
LAG3-1	0,125
LAG3-2	0,09
LAG3-3	0,12
LAG3-4	0,1
LAG3-5	0,07

LAG3 антитела согласно изобретению тестировали для определения блокирования связывания рекомбинантный LAG3 белка человека с Raji клетками, экспрессирующими его лиганд МНС II, используя FACS. Рекомбинантный человеческий LAG3 внеклеточный домен, слитый с Fc человека (hLAG3-hIgFc), инкубировали с LAG3 антителами LAG3-1, LAG3-2, LAG3-3, LAG3-4 и LAG3-5 в течение 15 минут при комнатной температуре (КТ) перед добавлением к Raji клеткам, с последующей дальнейшей инкубацией в течение 30 мин при 4°C. Клетки промывали 3 раза. Определяли HLAG3-mIgFc связывание с Raji клетками, используя PE меченные анти-человеческие IgG. Анализ HLAG3-mIgFc связывания осуществляли с помощью FACS Canto I (BD Bioscience). Результаты обобщены на фиг. 7 и они свидетельствуют о том, что все тестированные LAG3 антитела согласно изобретению селективно и эффективно ингибируют связывание LAG3 с МНС II.

Пример 11. Картирование эпитопов гуманизированных моноклональных антител к LAG3.

Анализировали эпитоп репрезентативного антитела к LAG3 согласно изобретению и сравнительную молекулу антитела, имеющую такую же аминокислотную последовательность, что и BMS-986016 (сравнительная молекула антитела к LAG3 из уровня техники), используя анализ "конкурентного связывания". Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии конкуренции за связывание с LAG3, что указывает на то, что антитело к LAG3 согласно изобретению связывается с другим эпитопом, чем сравнительная молекула антитела к LAG3 из уровня техники.

Эпитоп репрезентативного антитела к LAG3 согласно изобретению дополнительно корректировали с помощью экспериментов водородно-дейтериевого обмена (HDX), которые выявляют отличия эпитопов на уровне индивидуальных аминокислот в эпитопах антител.

HDX анализ показал, что репрезентативное антитело к LAG3 согласно изобретению связывается с двумя различными участками LAG3 человека, что подробно указано в табл. 8.

Таблица 8. Картирование эпитопов анти-LAGS mAbs с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена

Антитело	LAG3 Участки связывания (ак*)	Эпитоп
LAG3-1	33-40 и 125-135	LLRRAGVT (SEQ ID NO: 111) и YRAAVHLRDRA (SEQ ID NO: 112)

*LAG-3 использовали для нумерации: GenBank NP_002277.

Пример 12. Стимуляция антиген-специфического Т-клеточного ответа с помощью антител к PD1 и к LAG3.

Индивидуальные антитела к PD1 и к LAG3 согласно изобретению, и комбинации этих антител, тестировали для определения их способности стимулировать продукцию цитокинов специфическими к столбняку CD4 Т-клетками памяти с применением ELISA и сравнивали с известными из уровня техники антителами к PD1 и к LAG3

Для этого исследования, Т-клетки из PBMC здоровых доноров выращивали в присутствии столбнячного анатоксина и совместно культивировали с аутологическими зрелыми дендритными клетками (DC), загруженными с помощью столбнячного анатоксина в течение 2 дней. Стадию совместного культивирования повторяли второй раз сходным образом в присутствии анти-PD1, анти-LAG3 и комбинация молекул антител к PD1 и к LAG3, используя фиксированное количество анти-PD1 mAb (200 нМ) с возрастающими количествами антител к LAG3. После окончания второй стадии совместного культивирования супернатанты анализировали для определения секреции ИФН-гамма.

С помощью этого анализа, комбинацию антител к PD1 и к LAG3 согласно изобретению сравнивали с ниволумабом (Opdivo (R)) (PD1 mAb) плюс антитело, имеющее такую же аминокислотную последовательность, как и BMS-986016 (LAG3 mAb) у 4 различных доноров. Возрастающие количества антител к LAG3 использовали в комбинации с фиксированной дозой анти-PD1 mAbs.

Представленные данные нормализовали к антителу к PD1, используемому при насыщающей концентрации, указанной как 100% и результаты представлены на фиг. 8.

Эти данные свидетельствуют о том, что комбинация антител к PD1 и к LAG3 согласно изобретению приводит к повышению в 1,5-2 раза продукции ИФН-гамма по сравнению с анти-PD1 mAb отдельно. Неожиданно комбинация антител к PD1 и к LAG3 согласно изобретению является лучше, чем такая комбинация антител к PD1 и к LAG3 из уровня техники.

Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что у 3 из 4 доноров анти-PD1-3 (предста-

витель PD1 антитела согласно изобретению) является лучшим за ниволумаб (Opdivo (R)), что можно наблюдать по более высоким уровням секреции ИФН-гамма при очень низких уровнях анти-LAG3 mAb (фиг. 8).

Как можно понять, это преимущество комбинации молекул антител к LAG3 в соответствии с настоящим изобретением с молекулами антител к PD1 в соответствии с настоящим изобретением свидетельствует о том, что из можно использовать для лечения злокачественного новообразования при очень низком уровне дозирования по сравнению с лекарственными средствами на основании антител из уровня техники, что может предоставить терапевтическое применение с меньшим количеством нежелательных побочных действий.

Учитывая тот факт, что молекулы антител к PD1 и к LAG3 могут индуцировать нежелательные побочные эффекты у пациентов, как обсуждалось выше, то антитела к PD1 и антитела к LAG3 согласно изобретению могут иметь существенное и неожиданное клиническое преимущество по сравнению с известным уровнем техники путем применения меньших дозировок и/или схем введения с меньшей частотой.

Пример 13. Эффективность *in vivo* комбинированной терапии с применением антител к PD1 и к LAG3 на моделях сингенных опухолей.

Для тестирования, будет ли лечение с применением комбинации антител к PD1 и к LAG3 согласно изобретению обеспечивать лучшие результаты эффективности *in vivo*, некоторые доклинические модели опухолей у мышей лечили с применением анти-PD1 и анти-LAG3 mAbs. Всем мышам с опухолевыми клеточными линиями (MC38, Ободочная кишка-26 ободочная кишка-, B16F10 меланома, LL/2 (LLC1) легкого Льюиса- и 4T1 рак молочной железы) инъецировали подкожно либо C57BL/6 или BALB/c в зависимости от происхождения мышинной опухолевой клеточной линии. В день 3 после инъекции клеток, мышей лечили внутривенно (в/в) с последующим дозированием два раза в неделю. Все антитела дозировали в количестве 10 мг/кг и комбинацию антител к LAG3 и к PD1 согласно изобретению дозировали в количестве 10 мг/кг каждого. Антитела, используемые в этом исследовании, все получали от BioXCell, West Lebanon, NH, США. Контрольная группа получала лечение с применением крысиного IgG2a антитела (клон 2A3), используемое антитело к PD1 имело крысиную IgG2a Fc часть (клон RMP1-14) и используемое анти-LAG3 в исследовании имело на IgG1 крысиную Fc часть (клон C9B7W). Размер опухоли измеряли по меньшей мере три раза в неделю в двух измерениях (длина×ширину) и рассчитывали объемы опухолей. Животных умертвляли, если размер опухоли достигал 1500 мм или если опухоли изъязвлялись.

Результаты для TGI и CR, обобщены в табл. 9 и на фиг. 9, показывают объем опухоли в динамике для индивидуальных мышей. В заключение, это исследование свидетельствует о том, что анти-PD1 лечение отдельно проявляет эффективность на MC 38, но не на других тестируемых моделях. Тем не менее, за исключением LL/2 модели, комбинированное лечение с применением антител к PD1 и к LAG3 согласно изобретению существенно улучшает эффективность анти-PD1 монотерапии и у нескольких мышей не обнаруживалось опухоли при окончании исследования на модели MC-38, Ободочная кишка-26 и 4T1 модели. Следует особенно отметить, что на PD1 резистентной 4T1 модели, комбинация проявляет лучший эффект на рост опухоли и 3 из 5 мышей полностью не имели опухолей.

Таблица 9. Обобщенные данные ингибирования роста опухоли для всех тестируемых сингенных моделей

Клеточная линия	MC38	B16-F10	LL/2 (LLC1)	Ободочная кишка-26	4T1
Штамм мышей	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	BALB/c	BALB/c
День расчета TGI	19	22	22	24	31
TGI [%] для PD1	81	38	0	42	5
TGI [%] для LAG3	47	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали
TGI [%] для PD1 + LAG3	99	58	29	99	99
CR для PD1	1 (10)	0 (10)	0 (10)	1 (10)	0 (10)
CR для LAG3	0 (10)	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали
CR для PD-1 + LAG3	4 (10)	0 (10)	0 (10)	3 (5)	3 (5)

Пример 14. Фармацевтический препарат для подкожного введения.

Любые из вышеприведенных молекул антител согласно изобретению можно отбирать для приготовления фармацевтического препарата для подкожного введения, имеющего следующий состав.

Лекарственное вещество:	100 мг/мл (1 - 3 нмоль/мл)
Ацетатный буфер:	25 мМ
Трегалоза:	220 мМ
Твин-20:	0,02 %

Лекарственное вещество приготавливали в виде препарата в растворе, имеющий вышеописанный состав, стерилизовали и хранили при температуре от 2 до 8°C.

Пример 15. Фармацевтический препарат для в/в введения.

Любые из вышеприведенных молекул антител согласно изобретению можно отбирать для приготовления фармацевтического препарата для в/в введения.

Примером подходящего фармацевтического препарата для антитела согласно изобретению являются следующие составы.

Флакон объемом 20 мл содержит 20 мг/мл антитела к PD1 согласно изобретению, в буфере, состоящем из 21,5 мМ ацетата натрия, 3,5 мМ уксусной кислоты, 240 мМ трегалоза, 0,67 мМ L-метионин, 0,04% мас./об. полисорбата 20, и воды для инъекций (ВДИ).

Флакон объемом 20 мл содержит 20 мг/мл антитела к LAG3 согласно изобретению в буфере, состоящем из 25 мМ ацетата, 240 мМ трегалозы, 0,67 мМ метионина, 0,04% (мас./об.) полисорбата 20, pH 5,5, и воды для инъекций (ВДИ).

Пример 16. Фармацевтическое применение у людей.

Растворы, изложенные в примере 15 выше, применяют для пациента, который в этом нуждается, например, человека, страдающего от злокачественного новообразования, путем внутривенной инфузии (дозировка от 100 до 200 мг) каждые две - четыре недели.

Последовательности

НОМЕР ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	НАЗВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	PD1-1HCDR1	GFTFSASAMS
2	PD1-1HCDR2	YISGGGGDTYYSSSVKG
3	PD1-1HCDR3	HSNVNYYAMDY
4	PD1-1LCDR1	RASENIDTSGISFMN
5	PD1-1LCDR2	VASNQGS
6	PD1-1LCDR3	QQSKEVPWT
7	PD1-2HCDR1	GFTFSASAMS
8	PD1-2HCDR2	YISGGGGDTYYSSSVKG
9	PD1-2HCDR3	HSNPNYYAMDY
10	PD1-2LCDR1	RASENIDTSGISFMN
11	PD1-2LCDR2	VASNQGS
12	PD1-2LCDR3	QQSKEVPWT
13	PD1-3HCDR1	GFTFSKSAMS
14	PD1-3HCDR2	YISGGGGDTYYSSSVKG
15	PD1-3HCDR3	HSNVNYYAMDY
16	PD1-3LCDR1	RASENIDVSGISFMN
17	PD1-3LCDR2	VASNQGS
18	PD1-3LCDR3	QQSKEVPWT
19	PD1VH1	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNAK

		NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQ GTLVTVSS
20	PD1VL1	EIVLTQSPATLSLSPGERATMCRASENIDTSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIK
21	PD1VH2	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVR QAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNPVNYAMDYWGQ GTLVTVSS
22	PD1VL2	EIVLTQSPATLSLSPGERATMCRASENIDTSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIK
23	PD1VH3	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKASAMSWVR QAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQ GTLVTVSS
24	PD1VL3	EIVLTQSPATLSLSPGERATMCRASENIDVSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIK
25	PD1VH4	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKASAMSWVR QAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQ GTLVTVSS
26	PD1VL4	EIVLTQSPATLSLSPGERATMCRASENIDVSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIK
27	PD1VH5	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKASAMSWVR QAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQ GTLVTVSS
28	PD1VL5	EIVLTQSPATLSLSPGERATMCRASENIDVSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIK
29	PD1HC1	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVR QAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSV QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSLG
30	PD1LC1	EIVLTQSPATLSLSPGERATMCRASENIDTSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHK KYYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
31	PD1HC2	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVR QAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNPVNYAMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP

		CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLGLG
32	PD1LC2	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNW YQOKPGQAPKLLIYVASNQSGGIPARFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
33	PD1HC3	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWVR QAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRTSEST AALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLGLG
34	PD1LC3	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNW YQOKPGQAPKLLIYVASNQSGGIPARFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	PD1HC4	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWVR QAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRTSEST AALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNYHTQKLSLSLGLG
36	PD1LC4	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNW YQOKPGQAPKLLIYVASNQSGGIPARFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
37	PD1HC5	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWVR QAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRTSEST AALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ

		PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLGLG
38	PD1LC5	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNW YQQKPGQAPKLLIYVASNQGSIGIPARFSGSGGTDFLT ISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTGLEIKRVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHK KYYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
39	LAG-1HCDR1	GFSLSTSDMGVVG
40	LAG-1HCDR2	HIWWDDVKRYNPALKS
41	LAG-1HCDR3	IEDYGVSYFFDY
42	LAG-1LCDR1	KASQDVSTAVA
43	LAG-1LCDR2	SASYRYT
44	LAG-1LCDR3	QQHYSIPLT
45	LAG-2HCDR1	GFSLSTSDMGVVG
46	LAG-2HCDR2	HIWWDDVKRYNPALKS
47	LAG-2HCDR3	IVDYGVSYFFDY
48	LAG-2LCDR1	KASQDVSTAVA
49	LAG-2LCDR2	SASYRYT
50	LAG-2LCDR3	QQHYSIPLT
51	LAGVH1	QVTLVESGGGVVQGRSLRLSCAFSGFSLSTSDMGVVG IRQAPGKGLEWVAHIWWDDVKRYNPALKSRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARIEDYGVSYFFDYWG QGTTVTVSS
52	LAGVL1	DIQMTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGGTDFLTISL QPEDFATYYCQQHYSIPLTFGQGTGLEIK
53	LAGVH2	QVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCSFSGFSLSTSDMGVVG RQPPGKALEWLAHIWWDDVKRYNPALKSRFTITKDT KNQVLTMTNMDPVDATYFCARIEDYGVSYFFDYWG QGTTVTVSS
54	LAGVL2	DIQMTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGGTDFLTISL QPEDFATYYCQQHYSIPLTFGQGTGLEIK
55	LAGVH3	QVTLVESGGGVVQGRSLRLSCAFSGFSLSTSDMGVVG VRQPPGKGLEWVAHIWWDDVKRYNPALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYFCARIEDYGVSYFFDYWG QGTTVTVSS
56	LAGVL3	DIQMTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGGTDFLTISL QPEDFATYYCQQHYSIPLTFGAGTKLEIK
57	LAGVH4	QVTLVESGGGVVQGRSLRLSCAFSGFSLSTSDMGVVG IRQAPGKGLEWVAHIWWDDVKRYNPALKSRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTATYFCARIEDYGVSYFFDYWG QGTTVTVSS
58	LAGVL4	DIVMTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGGTDFLTISL QPEDFATYYCQQHYSIPLTFGQGTGLEIK
59	LAGVH5	QVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCSFSGFSLSTSDMGVVG RQPPGKALEWLAHIWWDDVKRYNPALKSRFTITKDT KNQVLTMTNMDPVDATYFCARIVDYGVSYFFDYWG QGTTVTVSS
60	LAGVL5	DIQMTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGGTDFLTISL QPEDFAVYYCQQHYSIPLTFGQGTGLEIK

61	LAGHC1	QVTLVESGGGVVQPGRSLRLSCAFSGFSLSTSDMGVWV IRQAPGKGLEWVAHIWDDVKRYNPALKSRFTISRDN KNTLYLQMNLSRAEDTAVYFCARIEDYGVSYYFDYWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
62	LAGLC1	DIQMTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQGHYSIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
63	LAGHC2	QVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCSFGFSLSTSDMGVWGI RQPPGKALEWLAHIWDDVKRYNPALKSRLTITKDT KNQVLTMTNMDPVDATYFCARIEDYGVSYYFDYWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
64	LAGLC2	DIQMTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQGHYSIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
65	LAGHC3	QVTLVESGGGVVQPGRSLRLSCAFSGFSLSTSDMGVWV VRQPPGKGLEWVAHIWDDVKRYNPALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYFCARIEDYGVSYYFDYWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
66	LAGLC3	DIQMTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQGHYSIPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
67	LAGHC4	QVTLVESGGGVVQPGRSLRLSCAFSGFSLSTSDMGVWV IRQAPGKGLEWVAHIWDDVKRYNPALKSRFTISRDN KNTLYLQMNLSRAEDTAVYFCARIEDYGVSYYFDYWG

		QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
68	LAGLC4	DIVMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQOHYSIPLTFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
69	LAGHC5	QVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCSFSGFSLSTSDMGVGI RQPPGKALEWLAHIWDDVKRYNPALKSRLTITKDT KNQVVLMTNMDPVDATYFCARIVDYGVSYYFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
70	LAGLC5	DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFAVYYCQOHYSIPLTFGQGTGLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
71	nPD1VH1	GAGGTGATGCTGGTTCGAGAGCGGGCGGGTCTCGTG CAGCCAGGCGGTAGCCTGCGCCTCAGCTGCACCGCCA GCGGCTTACCTTCAGCGCTAGCGCCATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGC CTACATCAGCGGGCGGGCGGCGACACCTACTACAG CTCCAGCGTGAAGGGCCGCTTACCATCAGCCGCGAC AACGCCAAAAACAGCCTGTACTGCAAATGAACAGC CTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCC GCCACAGCAACGTCAACTACTAGCCATGGACTACTG GGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC
72	nPD1VL1	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCCACCTGAGC CTGAGCCCAGGCGAGCGGCCACCATGAGCTGCCGC GCCAGCGAGAATCGACACCAGCGGCATCAGCTTC ATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCA AAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAACCAGGGCAGC GGCATCCCAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCCGCTGGAGCCAG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGCAAGG AAGTCCCATGGACCTTCGGCCAAGGTAAGTACTAAGTGA GATCAAG
73	nPD1VH2	GAGGTGATGCTGGTTCGAGAGCGGGCGGGTCTCGTG CAGCCAGGCGGTAGCCTGCGCCTCAGCTGCACCGCCA GCGGCTTACCTTCAGCGCTAGCGCCATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGC

		CTACATCAGCGGGCGGGCGGGCGACACCTACTACAG CTCCAGCGTGAAGGGCCGCTTACCATCAGCCGCGAC AACGCCAAAAACAGCCTGTACTGCAAATGAACAGC CTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCC GCCACAGCAACCCAACTACTACGCCATGGACTACTG GGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC
74	nPD1VL2	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCCACCCTGAGC CTGAGCCCAGGCGAGCGGCCACCATGAGCTGCCGC GCCAGCGAGAACATCGACACCAGCGGCATCAGCTTC ATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCA AAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAACCAGGGCAGC GGCATCCCAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCCGCTGGAGCCAG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGCAAGG AAGTCCCATGGACCTTCGGCCAAGGTAAGCTGGA GATCAAG
75	nPD1VH3	GAGGTGATGCTGGTCGAGAGCGGGCGGGTCTCGTG CAGCCAGGCGGTAGCCTGCGCCTCAGCTGCACCGCCA GCGGCTTACCTTCAGCAAGAGCGCCATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGC CTACATCAGCGGGCGGGCGGGCGACACCTACTACAG CTCCAGCGTGAAGGGCCGCTTACCATCAGCCGCGAC AACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAAATGAACAGC CTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCC GCCACAGCAACGTCAACTACTACGCCATGGACTACTG GGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC
76	nPD1VL3	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCCACCCTAAGC CTGAGCCCAGGCGAGCGGCCACCATGAGCTGCCGC GCCAGCGAGAACATCGACCACAGCGGCATCAGCTTC ATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCA AAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAACCAGGGCAGC GGCATCCCAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCCGCTGGAGCCAG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGCAAGG AAGTCCCATGGACCTTCGGCCAAGGTAAGCTGGA GATCAAG
77	nPD1VH4	GAGGTGATGCTGGTCGAGAGCGGGCGGGTCTCGTG CAGCCAGGCGGTAGCCTGCGCCTCAGCTGCACCGCCA GCGGCTTACCTTCAGCAAGAGCGCCATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGC CTACATCAGCGGGCGGGCGGGCGACACCTACTACAG CTCCAGCGTGAAGGGCCGCTTACCATCAGCCGCGAC AACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAAATGAACAGC CTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCC GCCACAGCAACGTCAACTACTACGCCATGGACTACTG GGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC
78	nPD1VL4	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCCACCCTAAGC CTGAGCCCAGGCGAGCGGCCACCATGAGCTGCCGC GCCAGCGAGAACATCGACCACAGCGGCATCAGCTTC ATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCA AAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAACCAGGGCAGC GGCATCCCAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCCGCTGGAGCCAG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGCAAGG AAGTCCCATGGACCTTCGGCCAAGGTAAGCTGGA GATCAAG
79	nPD1VH5	GAGGTGATGCTGGTCGAGAGCGGGCGGGTCTCGTG

		CAGCCAGGCGGTAGCCTGCGCCTCAGCTGCACCGCCA GCGGCTTACCTTCAGCAAGAGCGCCATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGC CTACATCAGCGGGCGGGCGGCGACACCTACTACAG CTCCAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCAGCCGCGAC AACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAAATGAACAGC CTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCC GCCACAGCAACGTCAACTACTACGCCATGGACTACTG GGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC
80	nPD1VL5	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCCACCTGAGC CTGAGCCCAGGCGAGCGGCCACCATGAGCTGCCGC GCCAGCGAGAACATCGACGTAAGCGGCATCAGCTTC ATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCA AAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAACCAGGGCAGC GGCATCCCAGCCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCCGCTGGAGCCAG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGCAAGG AAGTCCCATGGACCTTCGGCCAAGGTACTAAGTGGAA ATCAAG
81	nPD1HC1	GAGGTGATGCTGGTCGAGAGCGGGCGGGTCTCGTG CAGCCAGGCGGTAGCCTGCGCCTCAGCTGCACCGCCA GCGGCTTACCTTCAGCGCTAGCGCCATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGC CTACATCAGCGGGCGGGCGGCGACACCTACTACAG CTCCAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCAGCCGCGAC AACGCCAAAAACAGCCTGTACCTGCAAATGAACAGC CTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCC GCCACAGCAACGTCAACTACTACGCCATGGACTACTG GGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTG CACAAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTGGCCCCCTGC TCCCGTCCACCTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCCGT GTCCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGAC ACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTC CCTGTCTCCGTGCTGACCGTGCCCTCCTTAGCCTGG GCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGC CCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGAATCTA AGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTGCCCTGCCCTGA ATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCTCCCAA AGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAAGA TCCCGAGGTCCAGTTAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAA CAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGA CCGTGCTGCCACGAGGACTGGTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCA GCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGC CCCGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCAAGCCA GGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG TCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTG GAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCGAGAACAACACTAC AAGACCACCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTGTACTCTCGGCTGACCGTGGACAAGTCCCG GTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCTCCTGCTCCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC CTGTCCCTGAGCCTGGGC
82	nPD1LC1	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCCACCCCTGAGC

		<p>CTGAGCCCAGGCGAGCGGCCACCATGAGCTGCCGC GCCAGCGAGAACATCGACACCAGCGGCATCAGCTTC ATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCA AAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAACCAGGGCAGC GGCATCCCAGCCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCCGCTGGAGCCAG AGGACTTCGCGTGTACTACTGCCAGCAGAGCAAGG AAGTCCCATGGACCTTCGGCCAAGGTAAGCTGGA GATCAAGCGTACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAATTGAAATCTGGAATG CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>
83	nPD1HC2	<p>GAGGTGATGCTGGTTCGAGAGCGCGCGGCTCGTG CAGCCAGGCGGTAGCCTGCGCCTCAGCTGCACCGCCA GCGGCTTACCTTCAGCGCTAGCGCCATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGC CTACATCAGCGCGCGCGCGGCGACACCTACTACAG CTCCAGCGTGAAGGGCCGCTTACCATCAGCCGCGAC AACGCCAAAAACAGCCTGTACCTGCAAATGAACAGC CTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTAATACTGCGCCC GCCACAGCAACCCAACTACTACGCCATGGACTACTG GGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTC CACAAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTGC TCCCGTCCACCTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGAC ACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTC CCTGTCCCTCCGTCTGACCGTGCCTCCTTAGCCTGG GCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGC CCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGAATCTA AGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTGCCCTGCCCTGA ATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAA AGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGACCCCCGA AGTGACCTGCTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAAGA TCCCGAGGTCCAGTTAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAA CAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGA CCGTGCTGCACCAGGACTGGGTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGAAGGTGTTCAACAAGGGCCTGCCCTCCA GCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGC CCCGCGAGCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCAAGCCA GGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG TCTGGTCAAGGGCTTACCCCTCCGATATCGCCGTG GAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTAC AAGACCACCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTGTAATCTCGGCTGACCGTGGACAAGTCCCG GTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCTCCTGCTCCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC CTGTCCCTGAGCCTGGGC</p>
84	nPD1LC2	<p>GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCCACCCTGAGC CTGAGCCCAGGCGAGCGGCCACCATGAGCTGCCGC GCCAGCGAGAACATCGACACCAGCGGCATCAGCTTC</p>

		<p>ATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCA AAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAACCAGGGCAGC GGCATCCCAGCCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTCACCTGACCATCAGCCGCTGGAGCCAG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGCAAGG AAGTCCCATGGACCTTCGGCCAAGGTAAGCTGGA GATCAAGCGTACTGTGGCTGCACCATCTGTCTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAATTGAAATCTGGAAGT CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAA GTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>
85	nPD1HC3	<p>GAGGTGATGCTGGTGCAGAGCGGGCGGGTCTCGTG CAGCCAGGCGGTAGCCTGCGCCTCAGCTGCACCGCCA GCGGCTTCACCTTCAGCAAGAGCGCCATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGC CTACATCAGCGCGCGGGCGGGCGACACCTACTACAG CTCCAGCGTGAAGGGCCGCTTACCATCAGCCGCGAC AACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAAATGAACAGC CTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCC GCCACAGCAACGTCAACTACTACGCCATGGACTACTG GGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTG CACAAAGGGCCCTTCGTGTTCCCTGGCCCCCTG TCCCGTCCACCTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTACCCT GTCCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC ACCTTCCCTGTGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGACTC CCTGTCTCCGTGCTGACCGTGCCCTCCTTAGCCTGG GCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAG CCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAATCTA AGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTGCCCCTGCCCTGA ATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTCCCCCAA AGCCCAAGGACACCTGATGATCTCCCGACCCCGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAAGA TCCCAGGTCCAGTTAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAA CAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGA CCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCA GCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGC CCCGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCAAGCCA GGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG TCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTG GAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTAC AAGACCACCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTGTACTCTCGGTGACCGTGGACAAGTCCCG GTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCTCTGCTCCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAAGTCC CTGTCCCTGAGCCTGGGC</p>
86	nPD1LC3	<p>GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCCACCCTGAGC CTGAGCCCAGCGAGCGCGCCACCATGAGCTGCCGC GCCAGCGAGAACATCGACGTAAGCGGCATCAGCTTC ATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCA AAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAACCAGGGCAGC</p>

		GGCATCCCAGCCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCCGCTGGAGCCAG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGCAAGG AAGTCCCATGGACCTTCGGCCAAGGTAAGCTGGA AATCAAGCGTACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTATC TTCCCGCATCTGATGAGCAATTGAAATCTGGAATG CCTCTGTTGTGTCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
87	nPD1HC4	GAGGTGATGCTGGTTCGAGAGCGGCGGCGGTCTCGTG CAGCCAGGCGGTAGCCTGCGCCTCAGCTGCACCGCCA GCGGCTTACCTTCAGCCGAGCGCCATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGCG CTACATCAGCGCGGCGGCGGCGACACCTACTACAG CGTCAGCGTGAAGGGCCGCTTACCATCAGCCGCGAC AACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAAATGAACAGC CTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC GCCACAGCAACTACAATACTACGCCATGGACTACTG GGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTC CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCCCTC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCGCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGAACTCAGGGCCCTGACCAGCGGCGTGA CACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACT TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCCGTG CCAGCACCTGAAGCCGCTGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTG AGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTG GTCAGCGTCTCACCGTCTGACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCATCCCGCAGGAGATGACCAAGAACCAGGT AAGTTTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
88	nPD1LC4	GAGATCGTGTGACCCAGAGCCCAGCCACCCTAAGC CTGAGCCCAGGCGAGCGGCCACCATGAGCTGCCGC GCCAGCGAGAACATCGACCACAGCGGCATCAGCTTC ATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCA AAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAACCAGGGCAGC GGCATCCCAGCCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTACCCTGACCATCAGCCGCTGGAGCCAG

		<p>AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGCAAGG AAGTCCCATGGACCTTCGGCCAAGGTAAGCTGGA GATCAAGCGTACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAATTGAAATCTGGAAGT CCTCTGTGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAAGACTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>
89	nPD1HC5	<p>GAGGTGATGCTGGTTCGAGAGCGGCGGGCTTCGTG CAGCCAGGCGGTAGCCTGCGCCTCAGCTGCACCGCCA GCGGCTTACCTTCAGCCGCAGCGCCATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGC CTACATCAGCGCGGCGGCGGCGACACCTACTACAG CGTCAGCGTGAAGGGCCGCTTACCATCAGCCGCGAC AACGCCAAGAACAGCCTGTACTGCAAATGAACAG CTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCC GCCACAGCAACTACAATACTACGCCATGGACTACTG GGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTC CACAAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCCCTGGCCCTTGC TCCCGGTCCACCTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACCTGCGGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC ACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTC CCTGTCTCCGTGCTGACCGTGCCCTCCTTAGCCTGG GCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGC CCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAACTA AGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTGCCCTGCCCTGA ATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTCCCCCAA AGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCGGACCCCGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAAGA TCCCGAGGTCCAGTTAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAA CAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGA CCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCA GCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGC CCCGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCAAGCCA GGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG TCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTG GAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCAGAACTAC AAGACCACCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTGTACTCTCGGTGACCGTGGACAAGTCCCG GTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCTCCTGCTCCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC CTGTCCCTGAGCTGGGC</p>
90	nPD1LC5	<p>GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGCCACCTAAGC CTGAGCCCAGGCGAGCGGCCACCATGAGCTGCCGC GCCAGCGAGAACATCGACCACAGCGGCATCAGCTTC ATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCA AAGCTGCTGATCTACGTGGCCAGCAACCAGGGCAGC GGCATCCCAGCCGCTTACGCGGCAGCGGACGCGG ACCGACTTACCCTGACCATCAGCCGCTGGAGCCAG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGCAAGG AAGTCCCATGGACCTTCGGCCAAGGTAAGCTGGA</p>

		GATCAAGCGTACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAATTGAAATCTGGAACCTG CCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAAATTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
91	nLAGVH1	CAGGTCACCCTGAAGGAGAGCGGCCCAACCCTGGTG AAGCCAACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCAGCTTCA GCGGCTTCTCCCTGAGCACCAGCGACATGGGCGTGGG CTGGATTCCCAACCACCAGGCAAGGCCCTGGAGTG GCTGGCCACATCTGGTGGGACGACGTGAAGCGCTA CAACCCAGCCCTGAAGAGCCGCTGACCATCACCAA GGACACCAGCAAGAACCAGGTGGTGCTGACCATGAC C
92	nLAGVL1	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTTCTGAGCG CCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCTTACCTGCAAGGC CAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTCGCCTGGTATCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTA CAGCGCCAGCTACCGCTACACCGGCGTGCCAGACCG CTTACAGCGGACGCGGCAGCGGCACCGACTTCAACCTG ACCATCAGCAGCCTGCAACCAGAGGACTTCGCCACC
93	nLAGVH2	CAGGTGACCCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCGTCTG CAGCCAGGCCGACGCTGAGCCTGAGCTGCGCTTTCA GCGGCTTACAGCCTCAGCACCAGCGACATGGGCGTGG GCTGGTCCGCCAACCACCAGGCAAGGCCCTGGAGT GGGTGGCCACATCTGGTGGGACGACGTGAAGCGCT ACAACCCAGCCCTGAAGAGCCGCTTACCATCAGCCG CGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAAAATGAA C
94	nLAGVL2	ACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTTCTGAGCGC CAGCGTCGGCGACCGCGTGACGATCACCTGCAAGGC CAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTCGCCTGGTATCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTA CAGCGCCAGCTACCGCTACACCGGCGTGCCAGACCG CTTACAGCGGACGCGGCAGCGGCACCGACTTCAACCTG ACCATCAGCAGCCTGCAACCAGAGGACTTCGCCACC
95	nLAGVH3	CAGGTGACCCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCGTCTG CAGCCAGGCCGACGCTGCGCCTGAGCTGCGCTTTCA GCGGCTTACAGCCTCAGCACCAGCGACATGGGCGTGG GCTGGATCCGCCAAGCCCCAGGCAAGGCCCTGGAGT GGGTGGCCACATCTGGTGGGACGACGTGAAGCGCT ACAACCCAGCCCTGAAGAGCCGCTTACCATCAGCCG CGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAAAATGAA C
96	nLAGVL3	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCTAGCTTCTGAGCG CCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGCAAGG CCAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTCGCCTGGTATCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTA CAGCGCCAGCTACCGCTACACCGGCGTGCCAGACCG CTTACAGCGGACGCGGCAGCGGCACCGACTTCAACCTG ACCATCAGCAGCCTGCAACCAGAGGACTTCGCCACC
97	nLAGVH4	CAGGTGACCCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCGTCTG CAGCCAGGCCGACGCTGCGCCTGAGCTGCGCTTTCA GCGGCTTACAGCCTCAGCACCAGCGACATGGGCGTGG

		GCTGGATCCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGT GGGTGGCCACATCTGGTGGGACGACGTGAAGCGCT ACAACCCAGCCCTGAAGAGCCGCTTTACCATCAGCCG CGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAAATGAA C
98	nLAGVL4	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTTCCTGAGCG CCAGCGTCGGCGACCGCGTGAGCATCACCTGCAAGG CCAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTCGCCTGGTATCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAAAGCTGCTGATCTA CAGCGCCAGCTACCGCTACACCGGCGTGCCAGACCG CTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTG ACCATCAGCAGCTGCAACCAGAGGACTTCGCCACC
99	nLAGVH5	CAGGTCACCCTGAAGGAGAGCGGCCCAACCCTGGTG AAGCCAACCCAGACCCTGACCCTGACCTGACGTTCA GCGGCTTCTCCCTGAGCACCGACATGGGCGTGGG CTGGATTCGCCAACACCAGGCAAGGCCCTGGAGTG GCTGGCCCACATCTGGTGGGACGACGTGAAGCGCTA CAACCCAGCCCTGAAGAGCCGCTGACCATCACCAA GGACACCAGCAAGAACCAGGTGGTGCTGACCATGAC C
100	nLAGVL5	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTTCCTGAGCG CCAGCGTCGGCGACCGCGTGAGCATCACCTGCAAGG CCAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTCGCCTGGTATCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAAAGCTGCTGATCTA CAGCGCCAGCTACCGCTACACCGGCGTGCCAGACCG CTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTG ACCATCAGCAGCTGCAACCAGAGGACTTCGCCGTG
101	nLAGHC1	CAGGTCACCCTGAAGGAGAGCGGCCCAACCCTGGTG AAGCCAACCCAGACCCTGACCCTGACCTGACGTTCA GCGGCTTCTCCCTGAGCACCGACATGGGCGTGGG CTGGATTCGCCAACACCAGGCAAGGCCCTGGAGTG GCTGGCCCACATCTGGTGGGACGACGTGAAGCGCTA CAACCCAGCCCTGAAGAGCCGCTGACCATCACCAA GGACACCAGCAAGAACCAGGTGGTGCTGACCATGAC CAACATGGACCCAGTGACACCGCCACCTACTTCTGC GCCCCGATCGAGGACTACGGCGTGAGCTACTTCTCG ACTACTGGGGCCAGGGCACACCGTGACCGTGAGCA GCGCCTCCACAAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCCCTGGC CCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCTACCGCCGCT CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCG TGACCGTGTCTGGAACCTGCGCGCCCTGACCTCCGG CGTGACACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCCCTCCGGC CTGTACTCCCTGTCTCCGTCGTGACCGTGCCCTCCTC TAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGAC CACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTG GAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTGCCCTG CCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTC CCCCAAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGA CCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCA GGAAGATCCCAGGTCCAGTTAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCAGA GAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGCCG TGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCA AAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCCTGC CCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGG GCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCC AAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT

		GACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCAGAAAC AACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTGTACTCTCGGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCTCCTGTCC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC
102	nLAGLC1	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTTCTGAGCG CCAGCGTGGCGACCCGCGTGACCTTACCTGCAAGGC CAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTGCCTGGTATCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAAGCTGTGATCTA CAGCGCCAGCTACCGCTACACCGCGTGCCAGACCG CTTACAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTACCCCTG ACCATCAGCAGCCTGCAACCAGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTACAGCATCCCACTGACCTT TGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACTGT GGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATG AGCAATTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
103	nLAGHC2	CAGGTGACCCTGGTGGAGAGCGGGCGGGCGTCTGTG CAGCCAGGCCGACGCTGAGCCTGAGCTGCGCTTTCA GCGGCTTACGCTCAGCACCAGCGACATGGGCGTGG GCTGGGTCCGCCAACCAACAGGCAAGGGCCTGGAGT GGGTGGCCACATCTGGTGGGACGACGTGAAGCGCT ACAACCCAGCCCTGAAGAGCCGCTTACCATCAGCCG CGACAACAGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAATGAA CAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCACCTACTACTGC GCCCCATCGAGGACTACGGCGTGAGCTACTACTCG ACTACTGGGGCCAGGGCACACCGTGACCGTGAGCA GCGCCTCCAAAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCCCTGGC CCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCTACCGCGCT CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCG TGACCGTGTCTGGAACCTTGCGGCCCTGACCTCCGG CGTGACACACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTCCGGC CTGTACTCCTGTCTCCGTGCTGACCGTGCCCTCCTC TAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGAC CACAAGCCCTCAAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTG GAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTGCCCTG CCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTC CCCCAAAGCCAAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGGA CCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCA GGAGATCCCGAGGTCCAGTTTAAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCAGGA GAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCG TGCTGACCGTGTGCAACAGGACTGGCTGAACGGCA AAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGC CCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGG GCCAGCCCCGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCTCC AAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCAGAAAC

		AACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTGTACTCTCGGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCTCTGTCC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC
104	nLAGLC2	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTTCTGAGCG CCAGCGTCGGCGACCGCGTGACGATCACCTGCAAGG CCAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTGCGCTGGTATCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAAGCTGCTGATCTA CAGCGCCAGCTACCGCTACACCGGCGTGCCAGACCG CTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTACCCTG ACCATCAGCAGCCTGCAACCAGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTACAGCATCCCACTGACCTT TGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACTGT GGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATG AGCAATTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
105	nLAGHC3	CAGGTGACCCTGGTGGAGAGCGGGCGGGCGTCTGTG CAGCCAGGCCGACGCTGCGCCTGAGCTGCGCTTTC GCGGCTTCAGCCTCAGCACACGACATGGGCGTGG GCTGGATCCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGT GGGTGGCCACATCTGGTGGGACGACGTGAAGCGCT ACAACCCAGCCCTGAAGAGCCGCTTACCATCAGCCG CGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAAAATGAA CAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCACCTACTTCTGC GCCCCATCGAGGACTACGGCGTGAGCTACTACTTTCG ACTACTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTGAGCA GCGCCTCCACAAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCCCTGGC CCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCTACCGCCGCT CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCG TGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCTGACCTCCGG CGTGACACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCCCTCCGGC CTGTACTCCTGTCTCCGTGCTGACCGTGCCCTCCTC TAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGAC CACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTG GAATCTAAGTACGGCCTCCCTGCCCCCTGCCCTG CCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTCTGTT CCCCAAAAGCCCAAGGACACCTGATGATCTCCCGGA CCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCA GGAAGATCCCCAGGTCCAGTTAATTGGTACGTGGAC GGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA GAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCG TGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCA AAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGC CCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGG GCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCTCC AAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAAC AACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTGTACTCTCGGCTGACCGTGGACAA

		GTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCTCCTGCTCC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC
106	nLAGLC3	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCTAGCTTCTGAGCG CCAGCGTCGGCGACCCGCGTGACCATCACCTGCAAGG CCAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTGCGCTGGTATCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTA CAGCGCCAGCTACCGCTACACCGCGTGCCAGACCG CTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCCTG ACCATCAGCAGCCTGCAACCAGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTACAGCATCCCACTGACCTT TGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACTGT GGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATG AGCAATTGAAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGA GTTCAACAGGGGAGAGTGT
107	nLAGHC4	CAGGTGACCCTGGTGGAGAGCGGGCGGGCGTCTG CAGCCAGGCCGACGCTGCGCCTGAGCTGCGCTTTCA GCGGCTTACGCTCAGCACCAGCGACATGGGCGTGG GCTGGATCCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGT GGGTGGCCACATCTGGTGGGACGACGTGAAGCGCT ACAACCCAGCCCTGAAGAGCCGCTTACCATCAGCCC CGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAAAATGAA CAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGACTTCTGC GCCCCATCGAGGACTACGGCGTGAGCTACTACTTCG ACTACTGGGGCCAGGGCACACCGTGACCGTGAGCA GCGCCTCCACAAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCCCTGGC CCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCTACCGCCGCT CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCC TGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCCTGACCTCCGG CGTGACACACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTCCGGC CTGTACTCCCTGTCTCCGTGCTGACCGTGCCTCCTC TAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGAC CACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTG GAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTGCCCTG CCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTCTGTC CCCCAAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGGA CCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCA GGAAGATCCCGAGGTCCAGTTAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGA GAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCG TGCTGACCGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAACGGCA ΛΛAGTACΛΛGTGCAΛΛGGTGTCCΛΛCΛΛGGCCCTGC CCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGG GCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCTCC AAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAAC AACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTGACTCTCGGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCTCCTGCTCC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG

		AAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC
108	nLAGLC4	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTTCTGAGCG CCAGCGTCGGCGACCCGCTGAGCATCACTGCAAGG CCAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTCGCTGGTATCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAAGCTGCTGATCTA CAGCGCCAGCTACCGCTACACCGGCGTGCCAGACCG CTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTG ACCATCAGCAGCCTGCAACCAGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTACAGCATCCCACTGACCTT TGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACTGT GGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAATTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
109	nLAGHC5	CAGGTCACCCTGAAGGAGAGCGGCCAAACCCTGGTG AAGCCAACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCAGCTTCA GCGGCTTCTCCCTGAGCACCAGCGACATGGGCGTGGG CTGGATTCGCCAACCACCAGGCAAGGCCTGGAGTG GCTGGCCCACATCTGGTGGGACGACGTGAAGCGCTA CAACCCAGCCCTGAAGAGCCGCTGACCATCACCAA GGACACCAGCAAGAACCAGGTGGTGCTGACCATGAC CAACATGGACCCAGTGGACACCGCCACTACTTCTGC GCCCGCATCGTGGACTACGGCGTGAGCTACTACTTCG ACTACTGGGGCCAGGGCACCCCGTGACCGTGAGCA GCGCCTCCACAAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCCCTGGC CCCTTGTCCCGGTCCACCTCCGAGTCTACCGCCGCT CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAGCCCG TGACCGTGTCTGGAACCTTGCGGCCCTGACCTCCGG CGTGCACACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTCCGGC CTGTACTCCCTGTCTCCGTCGTGACCGTGCCCTCCTC TAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGAC CACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTG GAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTGCCTG CCCCAAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGA CCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCA GGAAGATCCCGAGGTCCAGTTAATTGGTACGTGGAC GGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGCA GAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCG TGCTGACCGTGTGCAACCAGGACTGGCTGAACGGCA AAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGC CCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGG GCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCTCC AAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCGAGAAC AACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTGTACTCTCGGCTGACCGTGGACAA GTCCCGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCTCCTGCTCC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC
110	nLAGLC5	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTTCTGAGCG

		CCAGCGTCGGCGACCGCGTGAGCATCACCTGCAAGG CCAGCCAGGACGTGAGCACCGCCGTCGCCTGGTATCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTA CAGCGCCAGCTACCGCTACACCGGCGTGCCAGACCG CTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTG ACCATCAGCAGCCTGCAACCAGAGGACTTCGCGGTGT ACTACTGCCAGCAGCACTACAGCATCCCACTGACCTT TGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACTGT GGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATG AGCAATTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCGCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACAAAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
111	LAG3 эпитоп1	LLRRAGVT
112	LAG3 эпитоп2	YRAAVHLRDRA
113	77E11 VK	DIVLTQSPASLA VSLGQRATMSCRASENIDNSGISFMNW FQQKPGQPPKLLIYVASNQSGVVPARFSGSGSDTDFRLT IHLEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGKLEIK
114	77E11 VH	EVMLVESGGGLV KPGGSLKLSCTASGFTFSNSAMSWVR QTPERLEWVAYISGGGGDTYYSDSVKGRFTISRDNAL DTLYLHMSSLRSEDALHYCARHSNSNYAMDYWGQ GTSVTVSS
115	PD1 эпитоп	AISLAPKAQIKESL
116	PD1 эпитоп	AAFPEDRSQPGQDCRF
117	496G6 VK	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSFTCKASQDVNTAVAWYQ QKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGDTDFTTISS VQAEDLALYYCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
118	496G6 VH	QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSDMGVGVWR QPSGKGLEWLAHIWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSSS QVFLMIASVDTADTATYFCARIEDYGVSYFDYWGQ TTLTVSS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула антитела к PD1, содержащая:

(а) CDRs тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 (hcCDR1), SEQ ID NO: 2 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 3 (hcCDR3), и которая имеет CDRs легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 (lcCDR1), SEQ ID NO: 5 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 6 (lcCDR3); или

(б) CDRs тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 (hcCDR1), SEQ ID NO: 8 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 9 (hcCDR3) и которая имеет CDRs легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 (lcCDR1), SEQ ID NO: 11 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 12 (lcCDR3); или

(в) CDRs тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13 (hcCDR1), SEQ ID NO: 14 (hcCDR2) и SEQ ID NO: 15 (hcCDR3), и которая имеет CDRs легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16 (lcCDR1), SEQ ID NO: 17 (lcCDR2) и SEQ ID NO: 18 (lcCDR3).

2. Молекула антитела к PD1 по п.1, которая содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, включающей константные области IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA и IgE.

3. Молекула антитела к PD1 по п.2, где константная область тяжелой цепи представляет собой IgG4, предпочтительно IgG4 с S241P мутацией.

4. Молекула антитела к PD1 по любому из предыдущих пунктов, где указанная молекула антитела имеет переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, или переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, или переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, или переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28.

5. Молекула антитела к PD1 по любому из предыдущих пунктов, где указанная молекула антитела

имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38.

6. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи молекулы антитела по любому из пп.1-5.

7. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи молекулы антитела по любому из пп.1-5.

8. Клетка-хозяин, которая содержит экспрессионный вектор, включающий последовательность, кодирующую тяжелую цепь молекулы антитела по любому из пп.1-5, и экспрессионный вектор, включающий последовательность, кодирующую легкую цепь молекулы антитела по любому из пп.1-5.

9. Способ получения молекулы антитела по любому из пп.1-5, который включает стадии: культивирования клетки-хозяина по п.8 в условиях, которые предоставляют возможность образования молекулы антитела в соответствии с любым из пп.1-5; и выделения указанной молекулы антитела.

10. Способ по п.9, дополнительно включающий стадию очистки указанной молекулы антитела.

11. Применение молекулы антитела к PD1 по любому из пп.1-5 для лечения злокачественного новообразования.

12. Способ лечения злокачественного новообразования с помощью молекулы антитела к PD1 по любому из пп.1-5, который включает введение молекулы антитела к PD1 по любому из пп.1-5 и молекулы антитела к LAG3.

13. Способ по п.12, где молекулу антитела к PD1 вводят одновременно или отдельно, с указанной молекулой антитела к LAG3.

14. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественного новообразования, содержащая антитело к PD1 по любому из пп.1-5, и фармацевтически приемлемый носитель.

15. Фармацевтическая композиция по п.14, которая дополнительно содержит молекулу антитела к LAG3.

16. Набор для лечения злокачественного новообразования, содержащий антитело к PD1 по любому из пп.1-5 и молекулу антитела к LAG3.

17. Композиция или набор по любому из пп.14-16, которая(ый) дополнительно содержит один или несколько дополнительных лекарственных средств.

А – VK ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

77E11 DIVLTQSPASLAVSLGQRATMSCRASENIDNSGISFMNWFQQKPGQPPKLLIY
 PD1-1 EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWFQQKPGQAPKLLIY
 PD1-2 EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWFQQKPGQAPKLLIY
 PD1-3 EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWFQQKPGQAPKLLIY
 PD1-4 EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWFQQKPGQAPKLLIY
 PD1-5 EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWFQQKPGQAPKLLIY

А – VK ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

77E11 VASNQSGVVPARFSGSGSGTDFRLTIHPLEEDDTAMYFCQSQSKEVPWTFGGGTKLEIK
 PD1-1 VASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQSQSKEVPWTFGQGTKLEIK
 PD1-2 VASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQSQSKEVPWTFGQGTKLEIK
 PD1-3 VASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQSQSKEVPWTFGQGTKLEIK
 PD1-4 VASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQSQSKEVPWTFGQGTKLEIK
 PD1-5 VASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQSQSKEVPWTFGQGTKLEIK

В – VH ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

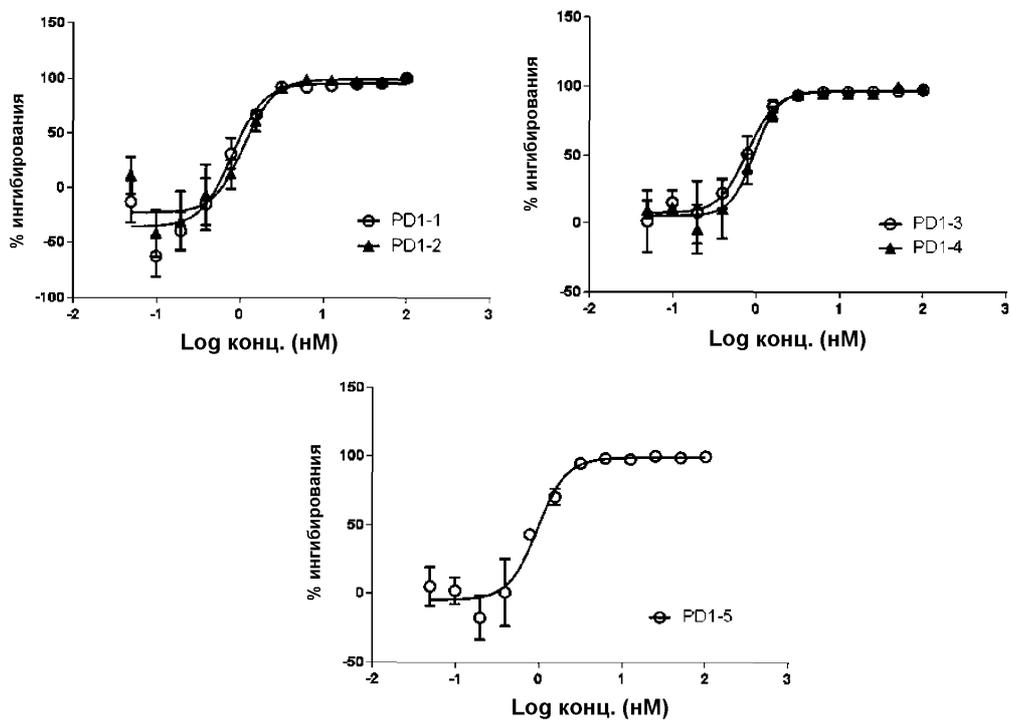
77E11 EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCTASGFTFSNSAMS~~WVRQ~~TPERRLEWVA
 PD1-1 EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMS~~WVRQ~~APGKGLEWVA
 PD1-2 EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMS~~WVRQ~~APGKGLEWVA
 PD1-3 EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKASAMS~~WVRQ~~APGKGLEWVA
 PD1-4 EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKASAMS~~WVRQ~~APGKGLEWVA
 PD1-5 EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKASAMS~~WVRQ~~APGKGLEWVA

В – VH ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

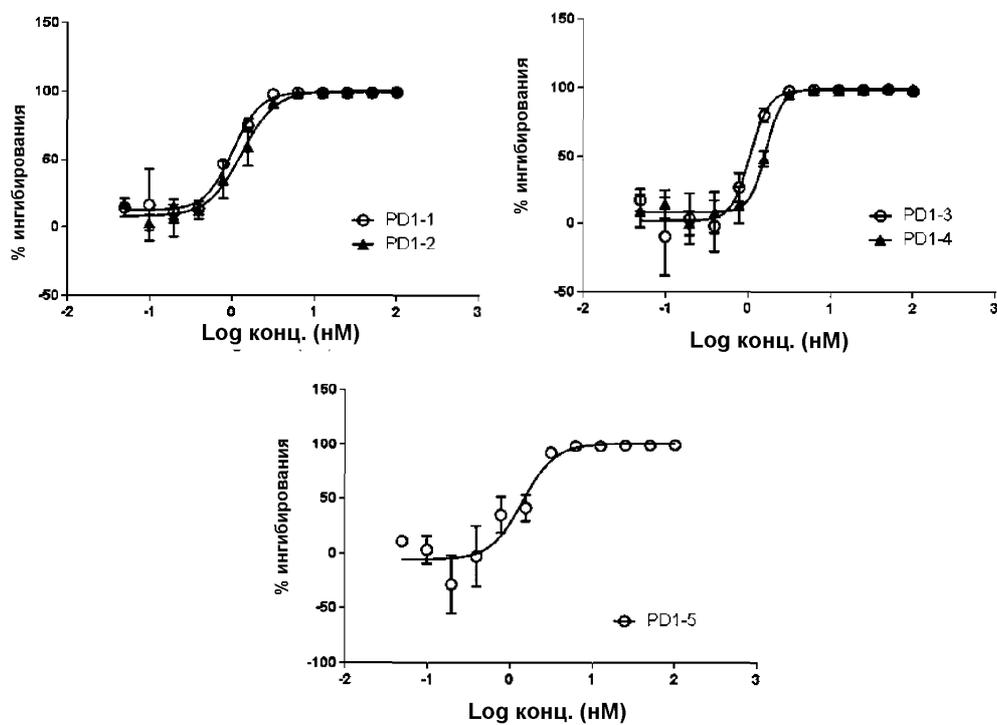
77E11 YISGGGGDTYYSDSVKGRFTISRDNADTLYLHMSSLRSEDTALHYCARHSNSNYYAMDYWGQTSVTVSS
 PD1-1 YISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQTLVTVSS
 PD1-2 YISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNPNYYAMDYWGQTLVTVSS
 PD1-3 YISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQTLVTVSS
 PD1-4 YISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQTLVTVSS
 PD1-5 YISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQTLVTVSS

Фиг. 1

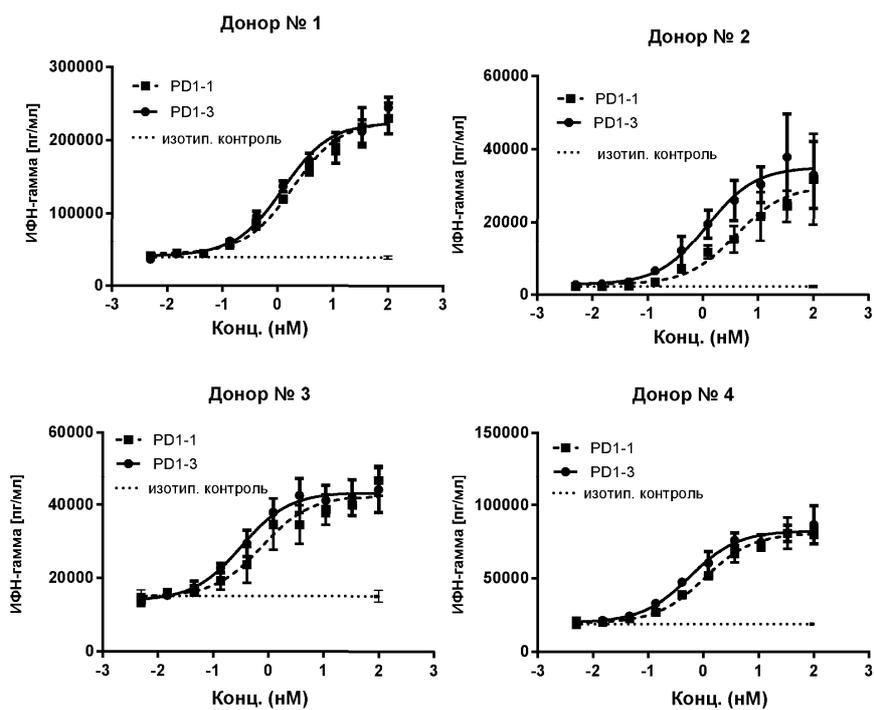
A)



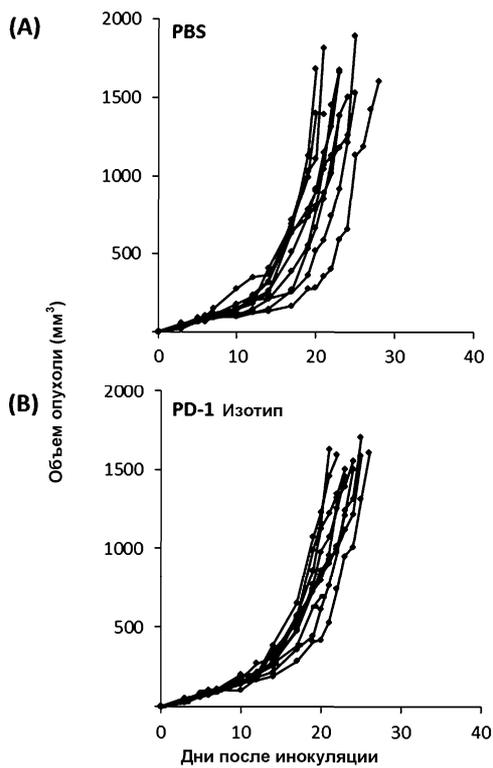
B)

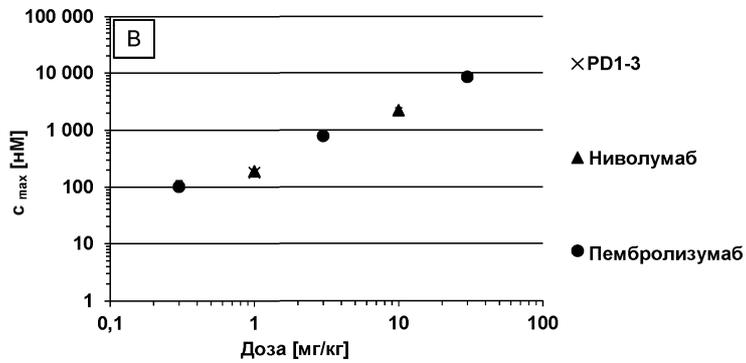
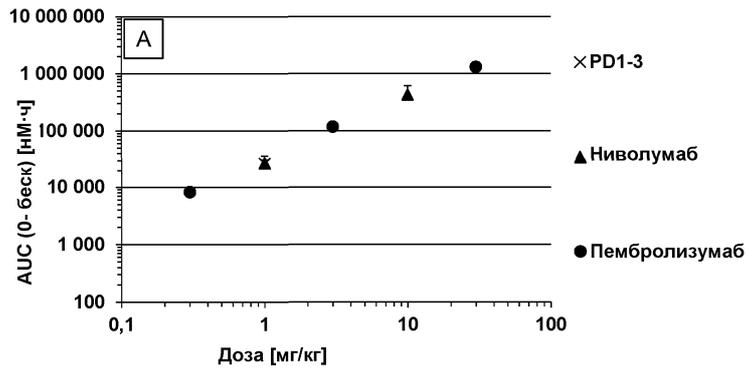
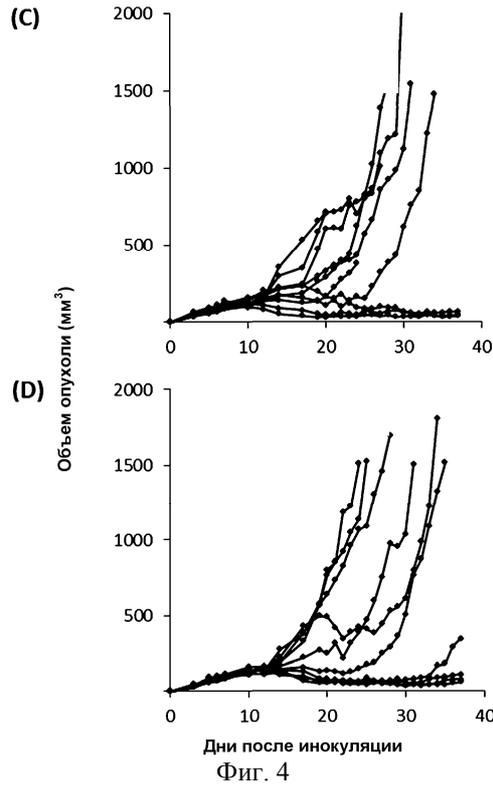


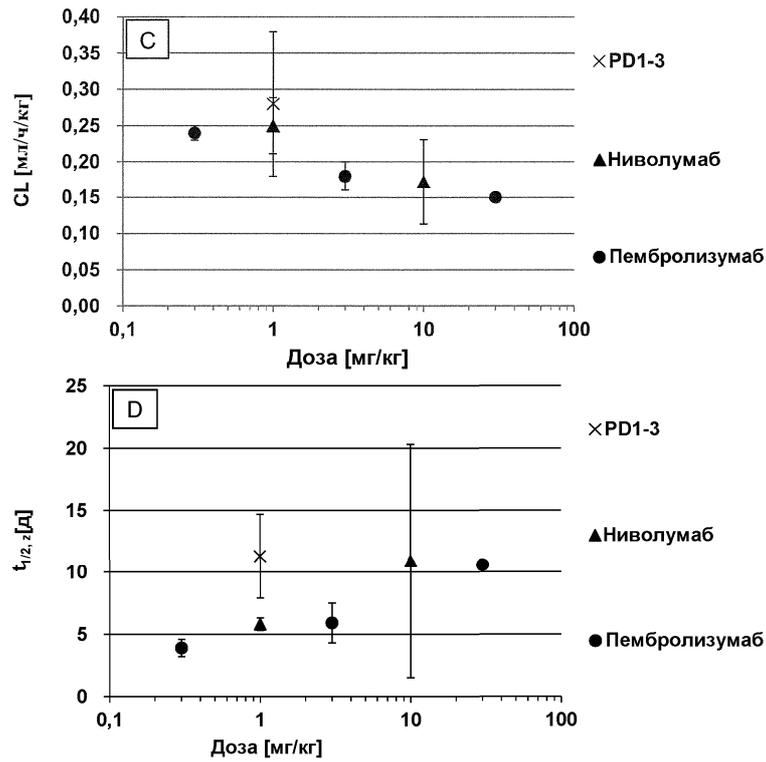
Фиг. 2



Фиг. 3







Фиг. 5

А – ВК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

496G6 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSTFKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIY
LAG3-1 DIQMTQSPSFLSASVGDVSTFKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
LAG3-2 DIQMTQSPSFLSASVGDVSTFKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
LAG3-3 DIQMTQSPSFLSASVGDVSTFKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
LAG3-4 DIVMTQSPSFLSASVGDVSTFKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
LAG3-5 DIQMTQSPSFLSASVGDVSTFKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY

А – ВК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

496G6 SASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLALYYCQOHYSIPLTFGAGTKLEIK
LAG3-1 SASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYSIPLTFGQGTKLEIK
LAG3-2 SASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYSIPLTFGQGTKLEIK
LAG3-3 SASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYSIPLTFGAGTKLEIK
LAG3-4 SASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYSIPLTFGQGTKLEIK
LAG3-5 SASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQOHYSIPLTFGQGTKLEIK

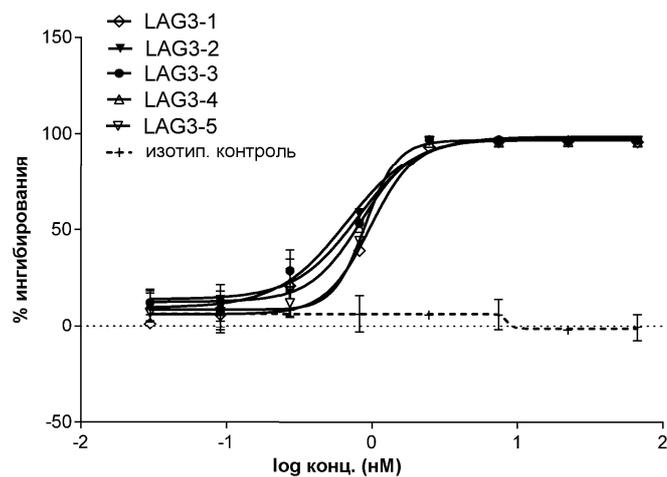
В – VH ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

496G6 QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSDMGVGWIRQPSGKGLEWLA
 LAG3-1 QVTLVESGGGVVQPGRSLRLSCLAFSGFSLSTSDMGVGWIRQAPGKGLEWVA
 LAG3-2 QVTLKESGPTLVKPTQTLTTLTCSFSGFSLSTSDMGVGWIRQPPGKALEWLA
 LAG3-3 QVTLVESGGGVVQPGRSLRLSCLAFSGFSLSTSDMGVGWVRQPPGKGLEWVA
 LAG3-4 QVTLVESGGGVVQPGRSLRLSCLAFSGFSLSTSDMGVGWIRQAPGKGLEWVA
 LAG3-5 QVTLKESGPTLVKPTQTLTTLTCSFSGFSLSTSDMGVGWIRQPPGKALEWLA

В – VH ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

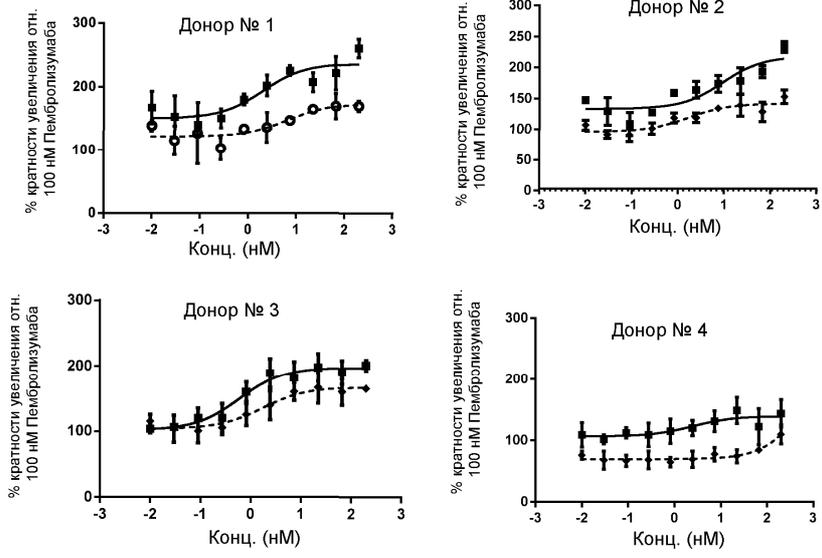
496G6 HIWDDVKRYNPALKSRITISKDTSSSQVFLMIASVDTADTATYFCARIEDYGVSYFFDYWGQTTTLTVSS
 LAG3-1 HIWDDVKRYNPALKSRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARIEDYGVSYFFDYWGQTTTVTVSS
 LAG3-2 HIWDDVKRYNPALKSRITITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYFCARIEDYGVSYFFDYWGQTTTVTVSS
 LAG3-3 HIWDDVKRYNPALKSRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTATYFCARIEDYGVSYFFDYWGQTTTVTVSS
 LAG3-4 HIWDDVKRYNPALKSRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTATYFCARIEDYGVSYFFDYWGQTTTVTVSS
 LAG3-5 HIWDDVKRYNPALKSRITITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYFCARIVDYGVSYFFDYWGQTTTVTVSS

Фиг. 6

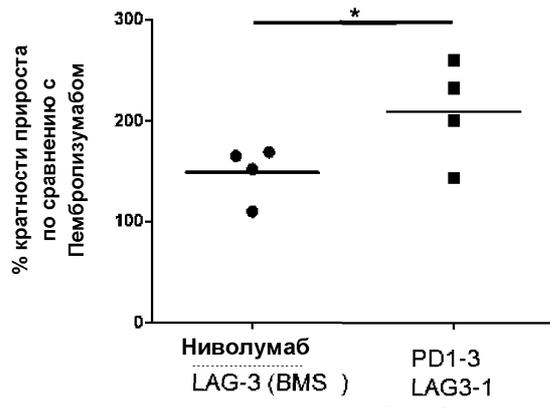


Фиг. 7

A)

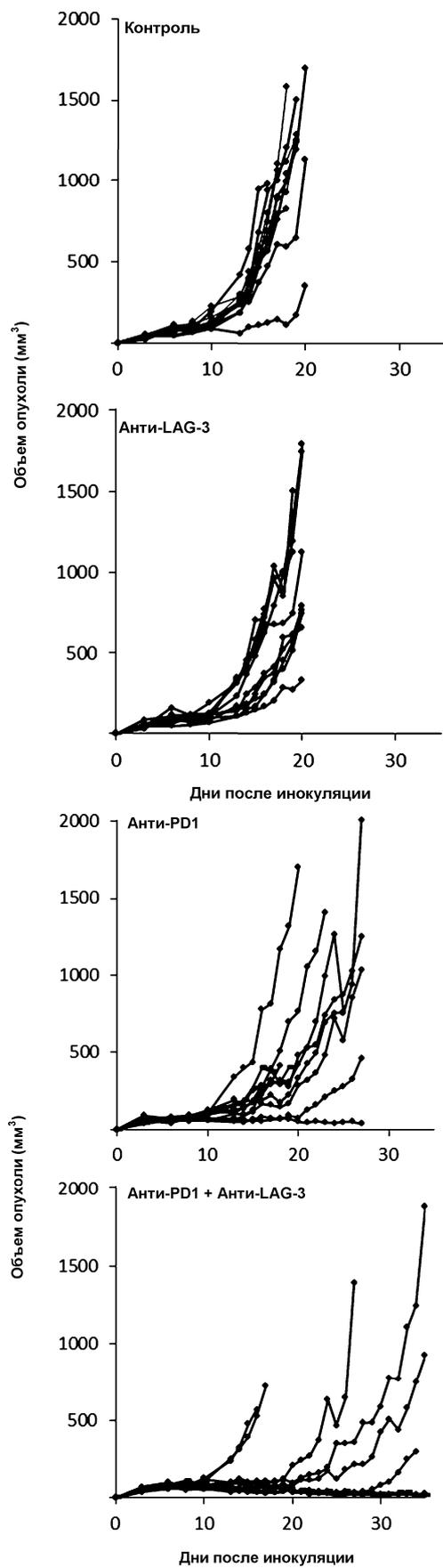


B)

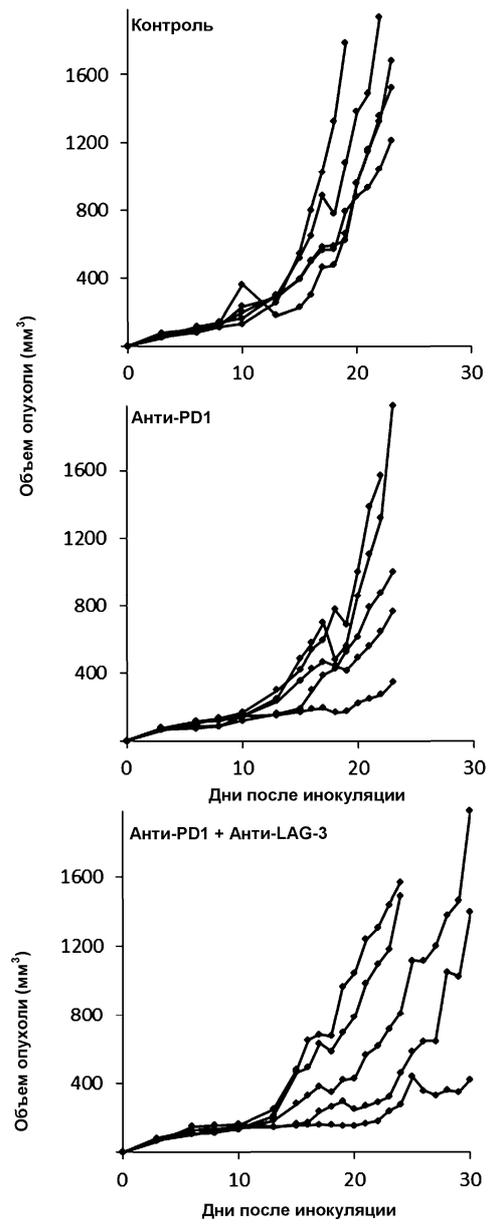


Фиг. 8

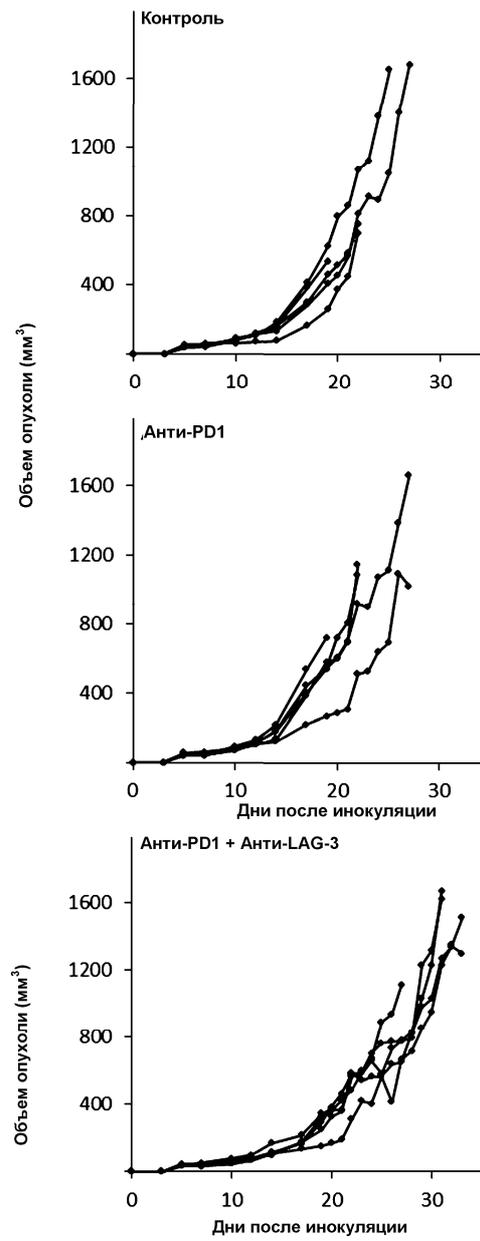
A



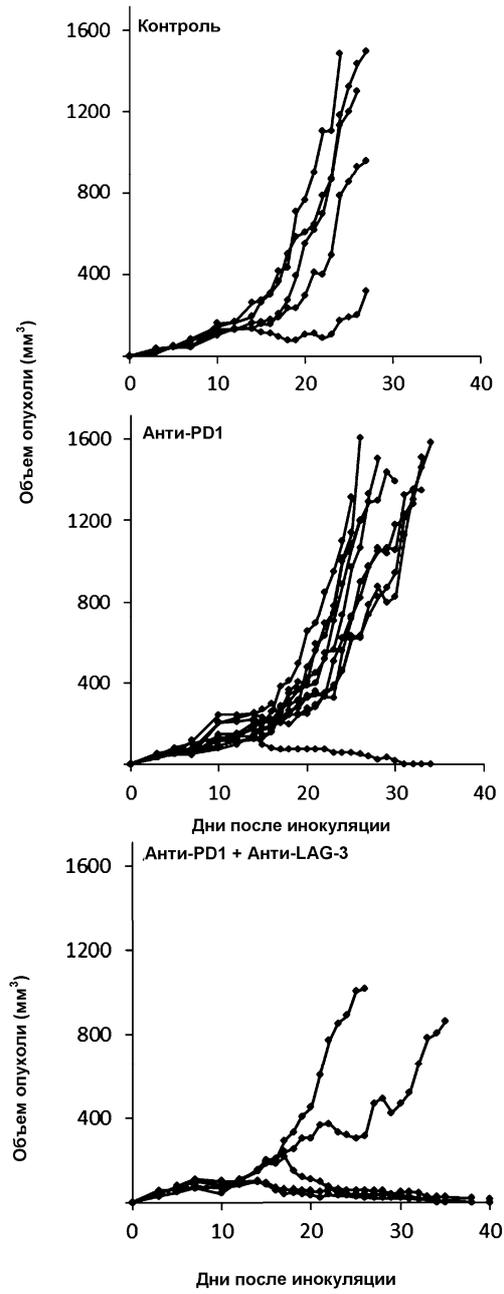
B



С



D



E

