

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042790**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.24

(21) Номер заявки
201992139

(22) Дата подачи заявки
2018.03.13

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С VISTA ПРИ КИСЛОМ pH**

(31) **62/471,196; 62/636,746**

(32) **2017.03.14; 2018.02.28**

(33) **US**

(43) **2020.03.10**

(86) **PCT/US2018/022230**

(87) **WO 2018/169993 2018.09.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФАЙВ ПРАЙМ ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК.; БРИСТОЛЬ-МЕЙЕРЗ
СКВИББ КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Джонстон Роберт Дж., Раджпал
Арвинд, Шеппард Пол О., Борхес
Луис, Рэнкин Эндрю, Бахджат Кейт
Садун, Корман Алан Дж., Дэн Энди
Кс., Су Линь Хой, Рэйкстро Джинджер
(US)**

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

(56) **WO-A2-2015097536
US-A1-20120108455
WO-A9-2011120013
US-A1-20120148571
US-A1-20120100140
WO-A2-2017181139
US-A1-20140378660
WO-A1-2017137830**

(57) Изобретение относится к антителам, специфически связывающимся с V-доменом, содержащим иммуноглобулин-супрессор активации Т-клеток (VISTA) при кислом pH, и их применению при лечении злокачественного новообразования. В изобретении антитела специфически связываются с человеческим VISTA при кислом pH, но не демонстрируют значительного связывания с VISTA человека при нейтральном или физиологическом pH.

B1**042790****042790****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящая заявка относится к антителам, специфически связывающимся с содержащим иммуноглобулин-V-домен супрессором Т-клеточной активации (VISTA) при кислом pH и к их применению при лечении злокачественного новообразования.

Уровень техники и сущность изобретения

Содержащий Ig-V-домен супрессор Т-клеточной активации, или VISTA, является коингибирующим членом семейства иммунорецепторов B7, экспрессируемых миеломоноцитарными клетками и другими лейкоцитами. Однако механизм, с помощью которого VISTA подавляет иммунные ответы, изучен недостаточно.

Авторы изобретения обнаружили, что в отличие от других известных иммунорецепторов, VISTA взаимодействует со своими контр-рецепторами, действуя селективно при кислом pH и проявляя небольшую активность при физиологическом pH (например, 7,3-7,4). Таким образом, VISTA может подавлять иммунные ответы в кислой среде микроокружения, такой как ложе опухоли или места воспаления, без нарушения клеток, циркулирующих в крови или находящихся в незатронутых воспалением тканях с нейтральной средой. Кроме того, авторы изобретения обнаружили, что анти-VISTA антитела могут быть сконструированы таким образом, чтобы они селективно связывались с VISTA при кислом pH, практически не связываясь с ним при физиологическом pH, таким образом отражая свойственную VISTA селективность при кислом pH. Эти селективные при кислом pH антитела могут обладать свойствами, ценными для лечения заболеваний, таких как рак, по сравнению с антителами, которые связываются с VISTA при физиологическом pH.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с внеклеточным доменом (ECD) VISTA, таким как VISTA человека ("hVISTA" или "huVISTA"), при кислых значениях pH (например, в кислых условиях). Настоящее изобретение также относится к антителам, которые специфически связываются с внеклеточным доменом (ECD) VISTA, таким как hVISTA, при кислых значениях pH, при этом демонстрируя слабое связывание или его отсутствие при нейтральном или физиологическом pH. Авторы настоящего изобретения отметили, что аминокислотная последовательность hVISTA-ECD включает несколько консервативных, а также неконсервативных остатков гистидина, и что частота остатков гистидина в VISTA-ECD исключительно высока по сравнению с другими членами семейства B7 и другими членами суперсемейства иммуноглобулинов (см. фиг. 1A и 1B). В растворе pK_a аминокислоты гистидина равны примерно 6,5, что означает, что при pH 6,5 или ниже его остатки в белках часто протонированы и, таким образом, заряжены положительно, в то время как при pH выше 6,5 количество непротонированных, нейтральных остатков увеличивается. Микроокружение опухоли и воспаленные ткани часто имеют кислый pH, и, таким образом, белки VISTA, обнаруживаемые в этих микроокружениях, могут быть, по меньшей мере частично, протонированными по гистидиновым остаткам. Авторы настоящего изобретения, как обсуждалось выше, предположили, что протонирование гистидина может влиять на конформацию, структуру поверхности и/или плотность заряда VISTA, что, в свою очередь, может приводить к образованию pH-специфических или pH-селективных эпитопов как для рецептор-лиганд взаимодействия(ий), так и для связывания антител. Целенаправленное воздействие на VISTA антителами, которые связываются при кислых, а не нейтральных или физиологических значениях pH может препятствовать мишень-опосредованному распределению лекарственного вещества через циркулирующие клетки и миеломоноцитарные клетки, находящиеся в лимфоидных органах, улучшая PK антител, заполнение рецепторов и активность в микроокружении опухоли. Антитела, селективные при кислом pH, также могут улучшать специфичность анти-VISTA антител в отношении внутриопухолевых, а не циркулирующих клеток-мишеней в случае терапевтических модальностей, таких как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC) и доставка полезных нагрузок (конъюгатов антитело-лекарственное вещество).

Краткое описание чертежей

Цветная версия нескольких чертежей представлена в приоритетной предварительной заявке на патент США № 62/636746, поданной 28 февраля 2018 г. Если файл этой приоритетной заявки станет доступным после публикации настоящей заявки, полагаем, что копии цветных чертежей будут предоставлены ведомством по патентам и товарным знакам США в случае направления запроса и оплаты необходимой пошлины.

На фиг. 1A-C показано, что содержание остатков гистидина во внеклеточном домене VISTA является исключительно высоким, и что многие из этих остатков гистидина являются консервативными, и, по меньшей мере, некоторые из этих остатков гистидина могут участвовать в связывании рецептор-лиганд. На фиг. 1A показан график для белков, содержащих иммуноглобулиновый домен, с количеством аминокислотных остатков во внеклеточном домене для каждого белка, показанным на оси x, и частотой остатков гистидина во внеклеточном домене для каждого белка, показанной на оси y. Размер каждой точки данных соответствует общему количеству остатков гистидина во внеклеточном домене каждого белка. На фиг. 1B показаны выровненные аминокислотные последовательности внеклеточных доменов VISTA яванского макака, человека и мыши. Отмечены места расположения последовательностей сигнального

пептида (Sig) и трансмембранного домена (TMD). Остатки гистидина, сохранившиеся у всех трех видов, показаны жирным шрифтом и подчеркнуты; остатки гистидина, сохранившиеся у человека и яванского макака, показаны только жирным шрифтом. На фиг. 1С показана модель трехмерной структуры иммуноглобулинового домена человеческого VISTA. Остатки гистидина изображены в виде шаров со стержнями.

На фиг. 2А, В показана модель, в которой остатки гистидина во внеклеточном домене VISTA обеспечивают контррецепторную селективность при кислом pH, а не при физиологическом pH. На фиг. 2А показано равновесие между отсутствием и наличием протонирования аммониевой группы (NH) пиррола в остатке гистидина. Значение pKa гистидина в растворе составляет 6,5, что указывает на то, что остатки гистидина вероятнее всего являются протонированными при pH 6,5 и менее и, таким образом, заряжены положительно, по сравнению с более высокими значениями pH. На фиг. 2В показана модель избирательного связывания VISTA с гликопротеиновым лигандом Р-селектина 1 (PSGL-1) или контррецепторами и лигандами ("VISTA-R") при кислых значениях pH. Соответственно, связывание антитела с внеклеточным доменом VISTA при кислом, а не при физиологическом pH может иметь решающее значение для ингибирования или модуляции активности VISTA.

На фиг. 3 показан уровень поверхностной экспрессии VISTA (средняя интенсивность флуоресценции (MFI) при окрашивании анти-VISTA антител) на инфильтрирующих опухоль макрофагах, дендритных клетках, нейтрофилах, CD4⁺ эффекторных Т-клетках, CD4⁺ регуляторных Т-клетках, CD8⁺ Т-клетках, натуральных киллерных (НК) клетках и В-клетках. VISTA экспрессируется на многих инфильтрирующих опухоль лейкоцитах, особенно на миелоидных клетках. Микроокружение опухоли часто является кислым, что позволяет VISTA взаимодействовать с контррецепторами и лигандами.

На фиг. 4А-Е показано, что VISTA избирательно связывается с лейкоцитами и PSGL-1 при кислых значениях pH, практически не обнаруживая связывания при нейтральном pH, и что это связывание можно блокировать анти-VISTA антителом. На фиг. 4А слева показаны типичные гистограммы флуоресцентно-конъюгированного рекомбинантного мультимера VISTA с активированными человеческими CD4⁺ Т-клетками. Гистограммы, окрашенные цветами от темно-серого до светло-серого, демонстрируют связывание при pH 7,0, 6,5, 6,4, 6,3, 6,1 и 6,0. Некоторые гистограммы обозначены соответствующими значениями pH. Связывание не-VISTA контрольного мультимера при pH 6,0 показано в виде неокрашенной гистограммы. Справа изображено среднее значение MFI для связывания VISTA (кружки) и контрольного (треугольники) мультимеров с активированными CD4⁺ Т-клетками человека, полученными от двух доноров, при разных значениях pH. На фиг. 4В показаны репрезентативные гистограммы связывания рекомбинантного мультимера VISTA с мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) при pH 6,0 и pH 7,4. Гистограммы, окрашенные цветами от темно-серого до светло-серого, демонстрируют связывание при pH 6,0 с CD19⁺ В-клетками, CD4⁺ Т-клетками, CD8⁺ Т-клетками, CD56⁺ НК-клетками и CD14⁺ моноцитами. Неокрашенные гистограммы, изображенные сплошной и пунктирной линиями, демонстрируют связывание при pH 7,4 с общим пулом лимфоцитов и моноцитов PBMC, соответственно. На фиг. 4С показано репрезентативное связывание рекомбинантного мультимера VISTA с активированными человеческими CD4⁺ Т-клетками в присутствии блокирующего анти-VISTA антитела (квадраты) или не специфического к VISTA контрольного антитела соответствующего изотипа (кружки). Концентрации антител представлены в логарифмическом масштабе. Также показаны нелинейные регрессии. Треугольник изображает фоновый сигнал, поступающий от активированных человеческих CD4⁺ Т-клеток, которые не окрашены рекомбинантными мультимерами VISTA. На фиг. 4Д показаны полученные методом проточной цитометрии репрезентативные двумерные графики связывания рекомбинантного мультимера VISTA при pH 6,0 с клетками яичника китайского хомячка с дефицитом гепарана (CHO) (линия pGSD-677, Американская коллекция типовых культур), которые были трансфицированы для экспрессии человеческого PSGL-1. Связывание мультимера выполняли в присутствии и в отсутствие блокирующего анти-VISTA антитела, показанного на фиг. 4С. Клетки, оставшиеся неокрашенными рекомбинантными мультимерами VISTA, показаны в качестве контроля. Окрашивание PSGL-1 антителом представлено по оси Y, а окрашивание мультимером VISTA представлено по оси X. На фиг. 4Е показаны репрезентативные гистограммы связывания рекомбинантного мышинового белка VISTA-Fc с мышинными спленоцитами при pH 6,0 и pH 7,4. Гистограммы, окрашенные цветами от темно-серого до светло-серого, демонстрируют связывание при pH 6,0 с CD8⁺ Т-клетками, CD11b⁺ миелоидными клетками и CD4⁺ Т-клетками. Неокрашенная гистограмма демонстрирует связывание при pH 7,4 с общим пулом спленоцитов.

На фиг. 5А-Д показано, что VISTA опосредует подавление Т-клеток и межклеточную адгезию преимущественно при кислом pH, и что оба эти эффекта можно изменить с помощью блокирующего анти-VISTA антитела. На фиг. 5А показано репрезентативное образование клеточного конъюгата при pH 6,0 и 7,0 между клетками 293Т, экспрессирующими hVISTA, или контрольным вектором, (по оси y) и клетками CHO, эндогенно экспрессирующими гепарансульфат клеточной поверхности, показанными на оси x. На фиг. 5В показан график частоты образования клеточных конъюгатов при pH 6,0 между теми же клетками в присутствии блокирующего анти-VISTA антитела, не блокирующего анти-VISTA антитела или не специфических к VISTA контрольных антител соответствующего изотипа. На фиг. 5С показаны репре-

зентативные графики активности люциферазы, генерируемой клетками Jurkat (линия Т-клеток человека), экспрессирующими репортер люциферазы NFkB, после совместного культивирования при различных значениях pH с клетками 293T, экспрессирующими hVISTA, и одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела-агониста человеческого Т-клеточного рецептора OKT3 ("искусственные антиген-презентирующие клетки"). К совместно культивируемым клеткам добавляли блокирующее анти-VISTA антитело (квадраты) или не специфическое к VISTA контрольное антитело соответствующего изотипа (кружки). На фиг. 5D данные, показанные на фиг. 5A, представлены в виде кратного увеличения сигнала люциферазы при обработке анти-VISTA антителом по сравнению с контролем ("величина эффекта").

На фиг. 6A-G показано, что VISTA может быть обнаружен во внутриклеточных эндосомах, в частности Rab11⁺-рециркулирующих эндосомах, и может рециркулировать на поверхность и с поверхности клетки посредством эндосомного переноса. На фиг. 6A показана совместная локализация VISTA, Rab5 (маркер ранней эндосомы), Rab7 (маркер поздней эндосомы) и Rab11 (маркер рециркулирующей эндосомы) в клетках 293T, экспрессирующих человеческий VISTA. На фиг. 6B показана совместная локализация VISTA и Rab11 в человеческих моноцитах. Внутриклеточный VISTA локализован совместно с Rab11⁺-рециркулирующими эндосомами. Не связывающее VISTA контрольное антитело того же изотипа, что и анти-VISTA антитело ("cAb"), не обнаруживает детектируемого связывания моноцитов. На фиг. 6C показано связывание трех анти-VISTA антител с рекомбинантным VISTA при pH 7,4 (черный), 6,7 (темно-серый) и 6 (светло-серый). На фиг. 6D показана восприимчивость клеточной линии острого миелоидного лейкоза (AML), экспрессирующей VISTA, к уничтожению одними и теми же анти-VISTA антителами 1 (перевернутые треугольники), 2 (кружки), 3 (квадраты) или не специфическими к VISTA контрольными антителами (треугольники), несущими чувствительные к катепсину В линкеры и цитотоксические полезные нагрузки. Жизнеспособность клеток (CellTiter-Glo LU) показана на оси Y, а концентрации антител показаны на оси X. На фиг. 6E показано сравнение связывания hVISTA с анти-VISTA антителом 3 и сконструированным вариантом ("VISTA mAb 3c"), который не имеет нарушения связывания при кислом pH. На фиг. 6F показан анализ сравнения активности анти-VISTA антител 3 (квадраты) и 3c (ромбы) в конъюгатах антитело-лекарственное вещество. На фиг. 6G показана схема миграции эндосом с рециркуляцией VISTA на поверхность и с поверхности клетки посредством ранних эндосом и рециркулирующих эндосом.

На фиг. 7A-F показано, каким образом были построены и скринированы библиотеки вариантов анти-VISTA антител для получения антител, селективных при кислом pH. На фиг. 7A показаны аминокислотные замены, сделанные в VH-CDR3 клона P1-061029 человеческого анти-VISTA антитела (сокращено '029) для создания библиотеки '029 для скрининга. Для потенциального улучшения связывания с богатой гистидином областью VISTA при кислом pH в библиотеках допускались замены отрицательно заряженных аминокислот аспартата и глутамата, а также чувствительного к значению pH гистидина. X=H, D или E. Заключенные в скобки последовательности были исключены из синтеза, чтобы избежать введения каких-либо негативных признаков (liabilities). Всего было синтезировано 647 уникальных последовательностей HCDR3 P1-061029 с 1-2 мутациями. На фиг. 7B показана процедура итеративного скрининга библиотеки '029 в отношении вариантов антител, селективных при кислых pH. R обозначает цикл отбора. На фиг. 7C показаны полученные проточной цитометрией репрезентативные данные в виде двумерных графиков, показывающие пул вариантов после 9-го цикла отбора. Связывание VISTA показано на оси Y, а экспрессия варианта антитела показана на оси X. Данные по связыванию показаны для различных концентраций антител и значений pH. На фиг. 7D показана диаграмма связывания P1-061029 и его клонов-потомков с человеческим VISTA при pH 6,0 и 7,4. На фиг. 7E показана диаграмма скоростей диссоциации P1-061029 и его клонов-потомков из комплекса с человеческим VISTA при pH 6,0. На фиг. 7F показаны данные связывания антител P1-068761, P1-068767 и P1-061029 с человеческим VISTA при pH 6,0 и pH 7,4, определенные методом ППР.

На фиг. 8A-F показаны селективные при кислых pH связывание, блокирование и эффекторная активность анти-VISTA антител P1-068761 и P1-068767. На фиг. 8A и 8B показана средняя интенсивность флуоресценции селективных при кислых pH антител P1-068761 (фиг. 8A) и P1-068767 (фиг. 8B), связывающихся с клетками Raji, эктопически экспрессирующими человеческий VISTA. Клетки окрашивали примерно при pH 6,0 (кружки; самая высокая кривая на фиг. 8A), 6,1 (квадраты; третья самая высокая кривая), 6,2 (треугольники; вторая самая высокая кривая), 6,4 (перевернутые треугольники; четвертая самая высокая кривая, кривая при pH, близком к 6,1), 6,6 (ромбы; четвертая кривая снизу), 7,0 (кружки; третья кривая снизу), 7,2 (квадраты; вторая кривая снизу) и 8,1 (неокрашенные треугольники; нижняя кривая на фиг. 8A). Связывание детектировали с помощью флуоресцентно конъюгированного вторичного антитела к человеческому IgG. На фиг. 8C показаны P1-068767 (кружки) и неспецифическое контрольное антитело соответствующего изотипа (треугольники), связывающиеся с клетками Raji, эктопически экспрессирующими человеческий VISTA при 3125 нг/мл при различных значениях pH. "pH₅₀", pH, при котором теряется 50% связывания P1-068767, составляет примерно 6,6. На фиг. 8D показаны средние интенсивности флуоресценции (MFI) неспецифического контрольного антитела соответствующего изотипа (окрашенные и неокрашенные кружки для pH 7,0 и 6,0, соответственно), анти-VISTA mAb 2 ("контроль", см. фиг. 6C, окрашенные и неокрашенные квадраты для pH 7,0 и 6,0, соответственно), P1-068761

(окрашенные и неокрашенные треугольники для pH 7,0 и 6,0, соответственно) и P1-068767 (окрашенные и неокрашенные перевернутые треугольники для pH 7,0 и 6,0, соответственно), связывающиеся с человеческими моноцитами. Связывание детектировали с помощью флуоресцентно конъюгированного вторичного антитела к человеческому IgG. На фиг. 8Е показано сопоставимое блокирование связывания рекомбинантного мультимера VISTA с активированными человеческими CD4⁺ Т-клетками при pH 6,0 антителами P1-061029 (квадраты), P1-068761 (треугольники) и P1-068767 (перевернутые треугольники), тогда как не специфическое к VISTA контрольное антитело (кружки) не блокировало связывание VISTA. На фиг. 8F показана сниженная эффективность P1-068761 (треугольники) и P1-068767 (перевернутые треугольники) при антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) при физиологическом pH. Также показаны P1-061029 (квадраты), не специфическое к VISTA контрольное антитело (кружки) и не специфическое к VISTA антитело-отрицательный контроль (ромбы). Опосредованный NK-клетками специфический лизис клеток-мишеней показан на графике на оси y в виде процента общих клеток-мишеней, а концентрации антител показаны на оси x. Также показаны нелинейные регрессии.

На фиг. 9 показана улучшенная фармакокинетика (ПК) селективных при кислых pH анти-VISTA антител у яванского макака. На чертеже показана временная зависимость концентрации антител в сыворотке яванского макака, получившего анти-VISTA антитело 2 ("контроль", кружки, см. фиг. 6С), анти-VISTA антитело 3 ("чувствительное к кислому pH", квадраты, см. фиг. 6С) или P1-068767 (треугольники).

На фиг. 10А и 10В показано влияние на связывание мутаций в селективных при кислых pH анти-VISTA-антител '761 и '767. На фиг. 10А показаны данные кинетики связывания реверсионных мутантов относительно P1-068761 при pH 7,4, pH 6,7 и pH 6,0 и положение реверсивных мутаций относительно P1-068761. На фиг. 10В показаны данные кинетики связывания реверсионных мутантов относительно P1-068767 при pH 7,4, pH 6,7 и pH 6,0 и положение реверсивных мутаций относительно P1-068767.

На фиг. 11А-С показаны эпитоп связывания и картирование различных анти-VISTA антител. На фиг. 11А показана конкуренция P1-068761 и P1-068767 за связывание с эпитопом VISTA по сравнению с контрольными антителами P1-061029 и VISTA. На фиг. 11В и 11С показаны эпитопы всех остатков блокирующего hVISTA антитела (фиг. 11В), перечисленных в табл. 14, по сравнению с неблокирующим hVISTA антителом (mAb1; фиг. 11С). Аминокислотные остатки 66(Н) и 162(А) указаны для обозначения ориентации молекулы. Остатки гистидина выделены серым, а остатки эпитопа - черным.

На фиг. 12А-С приведены данные изoeлектрической фокусировки в капиллярах (icIEF) для следующих антител: фиг. 12А: P1-061029, фиг. 12В: P1-068761 и фиг. 12С: P1-068767. Указана изoeлектрическая точка основного вида (pI основная), а также маркеры pI.

На фиг. 13А и В показаны выравнивания переменных областей клонов-потомков '029 и '015. На фиг. 13А показано выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей '029 и его клонов-потомков. На фиг. 13В показано выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей '015 и его клонов-потомков.

Подробное описание изобретения

Определения.

В настоящей заявке союз "или" означает "и/или", если не указано иное. В контексте нескольких зависимых утверждений использование "или" относится к более чем одному предшествующему независимому или зависимому утверждению только в качестве альтернативы. Термины "содержащий", "включающий" и "имеющий" могут использоваться в настоящем описании взаимозаменяемо. Согласно настоящему изобретению "выделенная" молекула представляет собой молекулу, которая была удалена из ее естественной среды. Как таковой, термин "выделенный" не обязательно отражает степень, до которой была очищена молекула.

Термин "полипептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, и не ограничен минимальной длиной. "Белок" может содержать один или более полипептидов. Такие полимеры аминокислотных остатков могут содержать природные или неприродные аминокислотные остатки и включают, без ограничения, пептиды, олигопептиды, димеры, тримеры и мультимеры аминокислотных остатков. Это определение включает как полноразмерные белки, так и их фрагменты. Эти термины также включают модификации полипептида после экспрессии, например, гликозилирование, сиаилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Кроме того, для целей настоящего изобретения "полипептид" или "белок" относится к полипептиду или белку, соответственно, который включает модификации, такие как делеции, добавления и замены (обычно консервативные по природе), в нативной последовательности, при условии, что белок сохраняет требуемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, например результатом сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например результатом мутаций хозяев, которые продуцируют белки, или ошибок вследствие амплификации ПЦР. Белок может содержать два или более полипептидов.

"VISTA" - это аббревиатура названия белка "содержащий иммуноглобулин-V-домен супрессор Т-клеточной активации" (V-domain immunoglobulin-containing suppressor), который является членом семейства B7 регуляторов иммунных контрольных точек. VISTA также известен как гомолог PD-1 (PD1H), B7-H5, C10orf54, вариант ESC-1 (Dies-1), предшественник тромбоцитарного рецептора Gi24 и домен

смерти 1 α (DD1 α). Термин "hVISTA" или "huVISTA" в настоящем описании относится к человеческому белку VISTA. Аминокислотная последовательность hVISTA, включая сигнальный пептид, представлена в SEQ ID NO:1, тогда как последовательность без сигнального пептида представлена в SEQ ID NO:2 (см. таблицу последовательности ниже). Внеклеточный домен или "ECD" VISTA или "VISTA-ECD" относится к той части белка VISTA, которая находится во внеклеточном пространстве и которая, в случае hVISTA, включает аминокислоты 1-162 SEQ ID NO:2 (см. также фиг. 1B). Часть "домена IgV" hVISTA содержит остатки 5-135 SEQ ID NO:2.

Термин "лидерный пептид" или "лидерная последовательность" относится к последовательности аминокислотных остатков, расположенных на N-конце полипептида, которая облегчает секрецию полипептида из клетки млекопитающего. Лидерная последовательность может отщепляться при экспорте полипептида из клетки млекопитающего с образованием зрелого белка. Лидерные последовательности могут быть природными или синтетическими и могут быть гетерологичными или гомологичными по отношению к белку, к которому они присоединены.

Термин "антитело" или "Ab" в настоящем описании используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, без ограничения, моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, если они проявляют требуемую антигенсвязывающую активность. Используемый в настоящем описании термин относится к молекуле, содержащей, по меньшей мере, определяющую комплементарность область (CDR) 1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и по меньшей мере CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, при этом молекула способна к связыванию с антигеном. Термин антитело включает, без ограничения, фрагменты, которые способны связывать антиген, такие как Fv, одноцепочечный Fv (scFv), Fab, Fab' и (Fab')₂. Термин антитело также включает, без ограничения, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела и антитела различных видов, таких как мышь, яванский макак и т.д.

Термин "тяжелая цепь" или "HC" относится к полипептиду, содержащему, по меньшей мере, вариабельную область тяжелой цепи с лидерной последовательностью или без нее. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь включает по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи. Термин "полноразмерная тяжелая цепь" относится к полипептиду, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи с или без лидерной последовательностью и с или без C-концевого лизина (K).

Термин "вариабельная область тяжелой цепи" или "VH" относится к области, содержащей определяющую комплементарность область (CDR) 1 тяжелой цепи, каркасный участок (FR) 2, CDR2, FR3 и CDR3 тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи также содержит по меньшей мере часть FR1 и/или по меньшей мере часть FR4. Как указано ниже, в некоторых вариантах осуществления CDR1 тяжелой цепи содержит остатки 26-35 VH SEQ ID NO, как определено в настоящем описании; CDR2 тяжелой цепи содержит остатки 50-66 VH SEQ ID NO, как определено в настоящем описании, а CDR3 тяжелой цепи содержит остатки 99-110 VH SEQ ID NO, как определено в настоящем описании. В других вариантах осуществления, если указано, CDR1 тяжелой цепи соответствует 31-35 остаткам по Kabat; CDR2 тяжелой цепи соответствует 50-65 остаткам по Kabat; и CDR3 тяжелой цепи соответствует 95-102 остаткам по Kabat; см., например, последовательности по Kabat белков, представляющих интерес с точки зрения иммунологии (1987 и 1991, NIH, Bethesda, MD). В некоторых вариантах осуществления CDR тяжелой цепи являются такими, как определено в настоящем описании, например ниже в таблице последовательностей или в табл. 2.

Термин "легкая цепь" или "LC" относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере вариабельную область легкой цепи, с лидерной последовательностью или без нее. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит по меньшей мере часть константной области легкой цепи. Термин "полноразмерная легкая цепь" относится к полипептиду, содержащему вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи с лидерной последовательностью или без нее.

Термин "вариабельная область легкой цепи" или "VL" относится к области, содержащей CDR1, FR2, HVR2, FR3 и HVR3 легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи также содержит FR1 и/или FR4. Как указано ниже, в некоторых вариантах осуществления CDR1 легкой цепи содержит остатки 24-35 VL SEQ ID NO, как определено в настоящем описании; CDR2 легкой цепи содержит остатки 51-57 VL SEQ ID NO, как определено в настоящем описании, а CDR3 легкой цепи содержит остатки 90-98 VL SEQ ID NO, как определено в настоящем описании. В других вариантах осуществления, если указано, CDR1 легкой цепи соответствует 24-34 остаткам по Kabat; CDR2 легкой цепи соответствует 50-56 остаткам по Kabat; и CDR3 легкой цепи соответствует 89-97 остаткам по Kabat; см., например, последовательности по Kabat белков, представляющих интерес с точки зрения иммунологии (1987 и 1991, NIH, Bethesda, MD). В некоторых вариантах осуществления CDR легкой цепи являются такими, как определено в настоящем описании, например, в таблице последовательностей.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из определенного источника или вида, тогда как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или вида. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело относится к антителу, содержащему по меньшей мере одну вариабельную область от первого вида (такого как мышь,

крыса, яванский макак и т.д.) и по меньшей мере одну константную область от второго вида (такого как человек, яванский макак и т.п.). В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит по меньшей мере одну мышиную переменную область и по меньшей мере одну человеческую константную область. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит по меньшей мере одну переменную область яванского макака и по меньшей мере одну человеческую константную область. В некоторых вариантах осуществления все переменные области химерного антитела относятся к первому виду, а все константные области химерного антитела относятся ко второму виду.

"Гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором по меньшей мере одна аминокислота в каркасном участке нечеловеческой переменной области заменена соответствующей аминокислотой из человеческой переменной области. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит по меньшей мере одну человеческую константную область или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело представляет собой Fab, scFv, и (Fab')₂ и т.д.

"Человеческое антитело" в контексте настоящего описания относится к антителам, продуцируемым у людей, антителам, продуцируемым у животных, отличных от человека, которые содержат гены человеческого иммуноглобулина, такие как XenoMouse®, и антителам, выбранным методами *in vitro*, такими как фоговый дисплей, в которых репертуар антител основан на последовательности человеческого иммуноглобулина.

Используемое в настоящем документе "антитело к VISTA" или "анти-VISTA антитело" относится к антителу, которое специфически связывается с VISTA по меньшей мере при некоторых условиях, таких как кислый pH. В некоторых вариантах осуществления антитело может представлять собой "антитело к huVISTA" или "антитело к huVISTA", указывающее на то, что оно специфически связывается с человеческим белком VISTA в по меньшей мере некоторых условиях, таких как кислый pH. Например, антитело к VISTA, которое специфически связывается с внеклеточным доменом (ECD) VISTA, может упоминаться как "анти-VISTA-ECD антитело".

В некоторых вариантах осуществления антитело может связываться с более высоким сродством с VISTA при кислых значениях pH, чем при нейтральном и/или физиологическом pH. В некоторых вариантах осуществления антитело может связываться с более высоким сродством с VISTA при кислых значениях pH, а при нейтральном и/или физиологическом pH может связываться только незначительно или неспецифично.

"K_D" или "константа диссоциации" для связывания антитела с белком, например с белком VISTA-ECD, является мерой сродства или специфического связывания антитела с белком, например с белком VISTA-ECD. Более низкое значение K_D указывает на улучшенное связывание или сродство по сравнению с более высоким значением K_D. K_D представляет собой отношение между "скоростью диссоциации" или k_{off} или K_D и "скоростью ассоциации" или k_{on} или k_a между антителом и полипептидом. Скорости диссоциации и ассоциации - это скорости, с которыми два партнера по связыванию ассоциируют и диссоциируют в системе. Таким образом, более медленная скорость диссоциации, в случае, когда скорость ассоциации остается примерно постоянной, приводит к более высокому общему сродству и, следовательно, к более низкому значению K_D. Как используется в настоящем описании, конкретное значение k_{off} "или меньше" указывает, что k_{off} или "скорость диссоциации" является такой, как указано, или происходит медленнее, чем указанная скорость.

Термины "специфическое связывание" или "специфически связывается" или аналогичные термины означают, что значение K_D для связывания двух полипептидов, таких как антитело и его полипептид-мишень, меньше, чем в случае связывания двух случайных полипептидов в таких же условиях. Другими словами, значение K_D меньше, чем в случае неспецифической агрегации полипептидов в системе.

В некоторых вариантах осуществления антитела специфически связываются с белком VISTA-ECD при определенном pH или диапазоне pH. "Кислый" pH в настоящем описании обычно относится к pH ниже 7,0, "основной" pH обычно относится к pH выше 7,0, а "нейтральный" pH обычно относится к pH, равному примерно 7,0. Термин "физиологический pH" в настоящем описании относится к pH в нормальных (т.е., не раковых) физиологических условиях, например, от 7,35 до 7,45 или от 7,3 до 7,4, например, примерно 7,4. Фразы, такие как "связывание в кислых условиях" или "связывание в физиологических условиях" и т.п. в настоящем описании, используемые в контексте связывания двух молекул, таких как VISTA и партнер по связыванию VISTA или VISTA и Т-клетки, относятся к связыванию при кислых значениях pH и связыванию при физиологическом pH, соответственно.

При упоминании антитела, которое "блокирует связывание" или "ингибирует связывание" лиганда (или рецептора) или конкурирующего антитела с рецептором (или лигандом) отдельно или на клетке, связывание блокируется, если наблюдается общее снижение, которое является статистически значимым по сравнению с контролем, например, общее снижение на 50% или более, например, общее снижение на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. "Блокирующее анти-VISTA антитело", например, представляет собой антитело, которое может блокировать связывание VISTA с PSGL-1 или другим лигандом или рецептором VISTA, или гепарансульфатными протеогликанами, по меньшей мере, в некоторых условиях, таких как при кислых значениях pH.

Используемая в настоящем описании "модель опухоли" относится к доклиническому анализу *in vi-*

во, который может использоваться для изучения биологической активности антитела к VISTA-ECD, и включает системы анализа опухолей ксенотрансплантата или нативной мыши. В некоторых случаях модель опухоли позволяет отслеживать размер или рост опухоли при лечении антителом и/или отслеживать наличие иммунных клеток в опухоли, таких как специфические типы Т-клеток или NK-клеток, для определения, вызвало ли антитело иммунный ответ или усилило его.

Используемый в настоящем описании термин "иммуностимулятор" относится к молекуле, которая стимулирует иммунную систему, действуя либо в качестве агониста иммуностимулирующей молекулы, включая костимулирующую молекулу, либо в качестве антагониста иммуностимулирующей молекулы, включая коингибирующую молекулу. Иммуностимулирующая молекула или иммуноингибирующая молекула может быть регулятором иммунной контрольной точки, таким как VISTA или другой член семейства B7 или другой молекулой, как описано далее. Иммуностимулирующий агент может быть биологическим, таким как антитело или фрагмент антитела, другим белком или вакциной, или может представлять собой низкомолекулярное лекарственное вещество. "Иммуностимулирующая молекула" включает рецептор или лиганд, который действует путем усиления, стимуляции, индукции или иного типа "запуска" иммунного ответа. Иммуностимулирующие молекулы, как определено в настоящем описании, включают костимулирующие молекулы. "Иммуноингибирующая молекула" включает рецептор или лиганд, который действует путем уменьшения, ингибирования, подавления или иного типа "выключения" иммунного ответа. Иммуноингибирующие молекулы, как определено в настоящем описании, включают коингибирующие молекулы. Такими иммуностимулирующими и иммуноингибирующими молекулами могут быть, например, рецепторы или лиганды, обнаруженные на иммунных клетках, таких как Т-клетки, или найденные на клетках, участвующих во врожденном иммунитете, таких как NK-клетки.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" и "гомология" по отношению к последовательности пептида, полипептида или антитела определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения, при необходимости, гэпов (зазоров) для достижения максимального процента идентичности последовательности и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалисту в данной области, например, с помощью общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Термины "запуск" или "усиление" относятся к инициированию или усилению любого события (такого как связывание белкового лиганда) или к инициированию или усилению любой биологической активности (такой как иммунный ответ) или фенотипической характеристики, или к инициированию или увеличению частоты, степени или вероятности такой активности или характеристики. "Запускать" или "усиливать" означает начинать или усиливать активность, функцию и/или количество по сравнению с эталоном. Нет необходимости в том, чтобы запуск или усиление были завершены. Например, в определенных вариантах осуществления "усиление" означает способность вызывать общее увеличение на 20% или более. В другом варианте осуществления "усиление" означает способность вызывать общее увеличение на 50% или более. В другом варианте осуществления "усиление" означает способность вызывать общее увеличение на 75%, 85%, 90%, 95% или более.

Термины "ингибирование" или "ингибировать" в более общем смысле относятся к уменьшению или прекращению любого события (такого как связывание белкового лиганда) или к уменьшению или блокированию любого фенотипического признака или к снижению или исчезновению частоты, степени или вероятности появления этой характеристики. "Уменьшить" или "ингибировать" означает уменьшить, снизить или заблокировать активность, функцию и/или количество по сравнению с эталоном. Нет необходимости в том, чтобы ингибирование или уменьшение было полным. Например, в некоторых вариантах осуществления "уменьшать" или "ингибировать" означает способность вызывать общее уменьшение на 20% или более. В другом варианте осуществления "уменьшить" или "ингибировать" означает способность вызывать общее уменьшение на 50% или более. В другом варианте осуществления "уменьшить" или "ингибировать" означает способность вызывать общее уменьшение на 75%, 85%, 90%, 95% или более.

"Лечение", как используется в настоящем описании, охватывает любое введение или применение терапевтического средства для лечения заболевания у человека и включает ингибирование развития заболевания или прогрессирования заболевания или одного или более симптомов заболевания, ингибирование или замедление заболевания или его прогрессирования, или одного или более симптомов, купирование его развития, частичное или полное облегчение заболевания или одного или более его симптомов, или предотвращение рецидива одного или более симптомов заболевания.

Термины "индивид" и "пациент" используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения человека.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к ко-

личеству лекарственного вещества, эффективному для лечения заболевания или расстройства у индивида, например, частичного или полного облегчения одного или более симптомов. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата.

Термин "злокачественное новообразование" используется в настоящем описании для обозначения группы клеток, которые демонстрируют аномально высокие уровни пролиферации и роста. Новообразование может быть доброкачественным (также называемым доброкачественной опухолью), предзлокачественным или злокачественным. Злокачественные клетки могут представлять собой солидные (твердые) раковые клетки или лейкозные злокачественные клетки. Термин "рост опухоли" используется в настоящем описании для обозначения пролиферации или роста клетки или клеток, которые составляют рак, что приводит к соответствующему увеличению размера или степени рака.

Примеры злокачественных заболеваний, к которым применимы способы лечения, описанные в настоящем описании, включают, без ограничения, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные неограничивающие примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, рак гипофиза, рак пищевода, астроцитому, саркому мягких тканей, немелкоклеточный рак легкого (включая плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого), аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия или матки, рак слюнной железы, рак почки, почечно-клеточный рак, рак печени, рак простаты, рак влагалища, рак щитовидной железы, карциному печени, рак головного мозга, рак эндометрия, рак яичка, холангиокарциному, рак желчного пузыря, рак желудка, меланому и другие виды рака головы и шеи (включая плоскоклеточный рак головы и шеи).

Введение "в комбинации с" одним или более дополнительными терапевтическими агентами включает одновременное (параллельное) и последовательное введение в любом порядке.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу, вспомогательному составу или носителю, общепринятому в данной области техники для применения с терапевтическим агентом, которые вместе составляют "фармацевтическую композицию" для введения индивиду. Фармацевтически приемлемый носитель является нетоксичным для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и совместим с другими ингредиентами состава. Фармацевтически приемлемый носитель подходит для используемого состава. Например, если терапевтический агент вводят перорально, носитель может представлять собой гелевую капсулу. Если терапевтический агент вводят подкожно, носитель в идеале не должен раздражать кожу и вызывать реакцию в месте инъекции.

"Химиотерапевтический агент" представляет собой химическое соединение, подходящее для лечения злокачественного новообразования. Примеры химиотерапевтических агентов, которые можно ввести в описанных в настоящем описании способах, включают, без ограничения, алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид Cytoxan®; алкилсульфонаты, такие как бусульфид, импротульфид и пипосульфид; азиридины, такие как бензодопа, карбоксон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиотфосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно булатацин и булатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элейтеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистый иприт, такой как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлорэтаммина, мелфалан, новембицин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урацилиприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединные антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма-1 и калихеамицин-омега-1 (см., например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамидин; а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые хромофоры энединных антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, Adriamycin® доксорубин (включая морфолино-доксорубин, цианоморфолино-доксорубин, 2-пирролино-доксорубин и дезоксидоксорубин), эпирубин, эзорубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофенольную кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин,

6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепитиостан, тестолактон; угнетающие функцию надпочечников средства, такие как аминоклутетимид, митоган, трилостан; пополнитель фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминоревулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; мейтансиноиды, такие как мейтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK® полисахаридный комплекс (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, риидин А и ангиудин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин арабинозид; циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел Taxol® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси), Абрахане®, не содержащий кремофоров, состав сконструированных альбуминовых наночастиц паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinore) и доксетаксел Taxotere® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; гемцитабин Gemzar®; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; платиновые аналоги, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); изофосфамид; митоксантрон, винкристин, винорелбин Navelbine®; новантрон, тенипозид, эдатрексат, дауномицин, аминоптерин, кселола, ибандронат, иринотекан (Campptosar, CPT-11) (включая схему лечения иринотеканом с 5-FU и лейковорином); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (ДМФО); ретиноиды, такие как ретиноидная кислота; капецитабин; комбретастатин; лейковорин (LV); оксалиплатин, включая схему лечения оксалиплатином (FOLFOX); ингибиторы PKC-альфа, Raf, H-Ras, EGFR (например, эрлотиниб (Tarceva®)) и VEGF-A, которые уменьшают пролиферацию клеток и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного.

Другие неограничивающие примеры химиотерапевтических агентов, которые можно вводить в раскрытых в настоящем описании способах, включают антигормональные агенты, которые действуют для регуляции или ингибирования действия гормонов на злокачественное новообразование, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), включая, например, тамоксифен (в том числе тамоксифен Nolvadex®), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен Fareston®; ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулируемую выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, мегестрол ацетат Megase®, эксеместан Aromasin®, форместание, фадрозол, ворозол Rivor®, летрозол Femara® и анастрозол Arimidex®; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (цитозинового аналог 1,3-диоксоланового нуклеозида); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, участвующих в пролиферации аберрантных клеток, такие как, например, PKC-альфа, Ralf и H-Ras; рибозимы, такие как ингибитор экспрессии VEGF (например, рибозим Angiozyme®) и ингибитор экспрессии HER2; вакцины, такие как вакцины для генной терапии, например, вакцина Allovectin®, вакцина Leuvectin® и вакцина Vaxid®; Proleukin® rIL-2; ингибитор топоизомеразы 1 Lurtotecan®; Abarelix® gmRH; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного.

"Антиангиогенный агент" или "ингибитор ангиогенеза" относится к веществу с низкой молекулярной массой, полинуклеотиду (включая, например, ингибирующую РНК (RNAi или siRNA)), полипептиду, выделенному белку, рекомбинантному белку, антителу или их конъюгатам или слитым белкам, которые прямо или косвенно ингибируют ангиогенез, васкулогенез или нежелательную проницаемость сосудов. Следует понимать, что антиангиогенный агент включает агенты, которые связывают и блокируют ангиогенную активность ангиогенного фактора или его рецептора. Например, антиангиогенный агент, который можно вводить в раскрытых в настоящем описании способах, может включать антитело или другой антагонист к ангиогенному агенту, например антитело к VEGF-A (например, бевацизумаб (Avastin®)) или к рецептору VEGF-A (например, рецептору KDR или рецептору Flt-1), анти-PDGFR ингибиторы, такие как Gleevec® (мезилат иматиниба), малые молекулы, которые блокируют передачу сигналов рецептора VEGF (например, PTK787/ZK2284, SU6668, Sutent®/SU11248 (сунитиниба малат), AMG706, или те, которые описаны, например, в международной заявке на патент WO 2004/113304). Антиангиогенные агенты также включают нативные ингибиторы ангиогенеза, например ангиостатин, эндостатин и т.д.; см., например, Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Phys. 53:217-39; Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179 (например, в табл. 3 перечислены антиангиогенные препараты, используемые при злокачественной меланоме); Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5 (12): 1359-1364; Tonini et al., (2003) Oncogene 22:6549-6556 (например, в табл. 2 перечислены известные антиангиогенные факторы); и Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206 (например, в табл. 1 перечислены антиангиогенные агенты, ис-

пользованные в клинических испытаниях).

Используемый в настоящем описании термин "ингибирующий рост агент" относится к соединению или композиции, которая ингибирует рост клетки (такой как клетка, экспрессирующая VEGF) либо *in vitro*, либо *in vivo*. Таким образом, ингибирующий рост агент, который можно вводить способами, раскрытыми в настоящем описании, может быть агентом, который существенно уменьшает процент клеток (таких как клетки, экспрессирующие VEGF) в S-фазе. Примеры ингибирующих рост агентов включают, без ограничения, агенты, которые блокируют прогрессирование клеточного цикла (в месте, отличном от S-фазы), такие как агенты, которые вызывают остановку G1 и остановку M-фазы. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Агенты, которые блокируют G1, также блокируют S-фазу, например, ДНК-алкилирующие агенты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлоретамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ага-С. Дополнительную информацию можно найти в Mendelsohn and Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Chapter I, озаглавленная "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), например, p. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) являются противоопухолевыми препаратами, которые получают из тисового дерева. Доцетаксел (Taxotere®, Rhone-Poulenc Rorer), полученный из европейского тиса, является полусинтетическим аналогом паклитаксела (Taxol®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел способствуют сборке микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки, предотвращая деполимеризацию, которая приводит к ингибированию митоза в клетках.

Термин "противоопухолевая композиция" относится к композиции, используемой для лечения злокачественного новообразования, содержащей по меньшей мере один активный терапевтический агент. Примеры терапевтических агентов включают, без ограничения, например, химиотерапевтические агенты, ингибирующие рост агенты, цитотоксические агенты, агенты, используемые в лучевой терапии, антиангиогенные агенты, антираковые иммунотерапевтические средства, апоптотические агенты, антитубулиновые агенты и другие средства для лечения рака, такие как антитела к HER-2, антитела к CD20, антагонист рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, ингибитор тирозинкиназы), ингибитор HER1/EGFR (например, эрлотиниб (Tarceva®), ингибиторы факторов роста тромбоцитов (например, Gleevec® (Imatinib Mesylate)), ингибитор COX-2 (например, целекоксиб), интерфероны, ингибиторы CTLA4 (например, анти-CTLA-антитело ипилимумаб (YERVOY®)), ингибиторы PD-1 или PD-L1 (например, OPDIVO®, KEYTRUDA®, TECENTRIQ®, BAVENCIO®, IMFINZI®), ингибиторы TIM3 (например, антитела к TIM3), цитокины, антагонисты (например, нейтрализующие антитела), которые связываются с одной или более из следующих мишеней: ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-бета, BlyS, APRIL, BCMA, CTLA4, TIM3 или VEGF рецептора(ов), TRAIL/Apo2, и другие биоактивные и органические химические агенты и т.д. Их комбинации также включены в настоящее описание.

Антитела, специфически связывающиеся с VISTA-ECD при кислом pH.

Поскольку VISTA содержит большое количество остатков гистидина в своем ECD, его укладка и общая структура, а также поверхность, доступная для связывания лигандов, таких как антитела, могут отличаться при кислом pH по сравнению с нейтральным pH, в частности, равным примерно pH 6,5, который является pK_a гистидина. Поскольку микроокружение опухоли обычно является кислым, для связывания с VISTA в этих микроокружениях может потребоваться специфическое связывание антитела с VISTA при кислом pH, при котором по меньшей мере некоторые из остатков поверхностного гистидина вероятнее всего являются протонированными.

В приведенной ниже таблице последовательностей представлена аминокислотная последовательность VISTA человека (hVISTA) с сигнальным пептидом или без него (SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2 (зрелый hVISTA)), соответственно. Сигнальный пептид состоит из аминокислотных остатков 1-32 SEQ ID NO:1. Внеклеточный домен (ECD) состоит из аминокислотных остатков 1-162 SEQ ID NO:2). Домен IgV состоит из аминокислотных остатков 37-167 SEQ ID NO:1 и аминокислотных остатков 5-135 из SEQ ID NO:2. Стеблевая область находится в пределах аминокислотных остатков 172-194 SEQ ID NO:1 и аминокислотных остатков 136-162 SEQ ID NO:2; трансмембранный домен находится в пределах аминокислотных остатков 195-216 SEQ ID NO:1 и аминокислотных остатков 163-184 SEQ ID NO:2. Аминокислотные остатки 187 SEQ ID NO:1 и 155 SEQ ID NO:2 (отмечены жирным шрифтом и подчеркнуты) могут представлять собой либо D, либо E, что указывает на полиморфизм в hVISTA. Этот остаток выделен жирным шрифтом и подчеркнут. Соответственно, SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2 охватывают оба полиморфизма у человека в этом остатке. Остатки гистидина в ECD VISTA окрашены серым цветом.

Анти-VISTA антитела (Ab) могут специфически связываться при кислом pH с VISTA-ECD или его фрагментами, например, содержащими домен IgV VISTA или область из hVISTA, содержащую, например, аминокислоты 20-95, 20-70 35-70, 35-95, 35-127 или 37-125 SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD при pH менее 7,0. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD при pH ниже 6,8. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD при pH ниже 6,5. В

37°C. В некоторых вариантах осуществления Ab может связываться с белком VISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с K_D 10^{-9} М или менее, а также с k_{off} 10^{-5} с⁻¹ или менее, 10^{-4} с⁻¹ или менее, 10^{-3} с⁻¹ или менее, 10^{-2} с⁻¹ или менее, измеренной, например, при 25°C или 37°C, и k_{on} 10^4 М⁻¹ с⁻¹ или выше, 10^5 М⁻¹ с⁻¹ или выше, 10^6 М⁻¹ с⁻¹ или выше, 10^7 М⁻¹ с⁻¹ или выше, измеренной, например, при 25°C или 37°C. В некоторых таких вариантах осуществления Ab может связываться с белком VISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с K_D 10^{-10} М или менее, а также с k_{off} 10^{-5} с⁻¹ или менее, 10^{-4} с⁻¹ или менее, 10^{-3} с⁻¹ или менее, 10^{-2} с⁻¹ или менее, измеренной, например, при 25°C или 37°C, и k_{on} 10^4 М⁻¹ с⁻¹ или выше, 10^5 М⁻¹ с⁻¹ или выше, 10^6 М⁻¹ с⁻¹ или выше, 10^7 М⁻¹ с⁻¹ или выше, измеренной, например, при 25°C или 37°C.

Как отмечалось выше, в некоторых из приведенных выше вариантов осуществления белок VISTA-ECD представляет собой hVISTA-ECD или представляет собой часть hVISTA-ECD, такую как, например, домен IgV. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления Ab может специфически связываться с эпитопом, содержащим аминокислоты 20-95 SEQ ID NO:2. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления Ab может специфически связываться с эпитопом, содержащим аминокислоты 20-70 SEQ ID NO:2. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления Ab может специфически связываться с эпитопом, содержащим аминокислоты 35-95 SEQ ID NO:2. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления Ab может специфически связываться с эпитопом, содержащим аминокислоты 35-70 SEQ ID NO:2. В некоторых из приведенных выше вариантов осуществления эпитоп представляет собой трехмерный эпитоп, который содержит не только одну из указанных выше частей SEQ ID NO:2, состоящих из остатков 20-95, 20-70, 35-95 или 35-70, но также другую часть SEQ ID NO:2, такую как остатки 95-105 SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления Ab связывается с эпитопом hVISTA, с которым связывается Ab, описанный в WO 2015/097536. Например, Ab может конкурировать или перекрестно конкурировать за связывание с hVISTA с Ab, описанным в WO 2015/097536. В некоторых вариантах осуществления Ab связывается с конформационным эпитопом человеческого VISTA. В некоторых вариантах осуществления Ab связывается с конформационным эпитопом, который содержит или присутствует в остатках 103-111 SEQ ID NO:2 и 136-146 SEQ ID NO:2 человеческого VISTA. В некоторых вариантах осуществления Ab связывается с конформационным эпитопом, который содержит или присутствует в остатках 24-36, 54-65 и 100-102 SEQ ID NO:2 человеческого VISTA. В некоторых вариантах осуществления Ab связывается с конформационным эпитопом, который содержит аминокислотные остатки в петле FG человеческого VISTA. В некоторых вариантах осуществления Ab связывается с полипептидом, содержащим аминокислотные остатки 35-127 и/или 37-125 SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления Ab связывается с полипептидом VISTA ECD или его частью, содержащей аминокислотные остатки 350-127 SEQ ID NO:2, при этом антитело не связывается или связывается с пониженным сродством с полипептидом VISTA ECD или его частью, содержащей аминокислотную замену, где замена (1) представляет собой замену одного из следующих аминокислотных остатков: T35, Y37, K38, T39, Y41, R54, T61, F62, Q63, L65, H66, L67, H68, H69, F97, L115, V117, I119, H121, H122, S124, E125, R127 и SEQ ID NO:2 или (2) представляет собой замену одного из следующих аминокислотных остатков: Y37, T39, R54, F62, Q63, H66, L115, V117, I119, S124 или E125. В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело имеет такие же характеристики связывания (или по существу такие же характеристики связывания), что и антитело, описанное в настоящей заявке, например, как изложено в примерах.

Некоторые из вышеуказанных антител могут проявлять разное сродство связывания с белками VISTA-ECD в зависимости от pH. Некоторые Ab, специфически связывающиеся с белком VISTA-ECD в кислых условиях, например, при pH 6,5 или ниже, также специфически связываются с белком VISTA-ECD при нейтральном и/или щелочном pH с аналогичным сродством (т.е. они являются "пан-связывающими веществами"). Например, некоторые такие Ab могут связываться с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-7} М или менее как при pH 6,5, так и при pH 7,0 (при постоянной температуре, например, 25°C или 37°C), так что K_D при pH 6,5 находится в пределах 1,5-кратного значения K_D при pH 7,0. Некоторые такие Ab могут связываться с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-8} М или менее как при pH 6,5, так и при pH 7,0 (при постоянной температуре, например, 25°C или 37°C), так что K_D при pH 6,5 находится в пределах 1,5-кратного значения K_D при pH 7,0. Некоторые такие Ab могут связываться с hVISTA-ECD с K_D 10^{-8} М или менее как при pH 6,5, так и при pH 7,0 (при постоянной температуре, например, 25°C или 37°C), так что K_D при pH 6,5 находится в пределах 1,5-кратного значения K_D при pH 7,0.

Некоторые Ab, специфически связывающиеся с белком VISTA-ECD в кислых условиях, например, при pH 6,5 или ниже, могут связывать белок VISTA-ECD в нейтральных, физиологических и/или щелочных условиях с более низким сродством ("pH-чувствительные связывающие вещества" или "pH-чувствительные Ab"). Некоторые Ab, специфически связывающиеся с белком VISTA-ECD в кислых условиях, например, при pH 6,5 или ниже, могут иметь незначительное, например, практически недетектируемое, связывание с белком VISTA-ECD в нейтральных, физиологических и/или щелочных условиях. Например, в некоторых вариантах осуществления Ab могут связываться с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-8} М или менее при pH 6,5 и с K_D более 10^{-8} М при pH 7,0 и/или pH 7,4. В некоторых таких вариантах осу-

ществления Ab могут связываться с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-8} М или менее при pH 6,5, а при pH 7,0 и/или pH 7,4 с K_D , более чем в 1,5 раза превышающей значение при pH 6,5. В некоторых вариантах осуществления предоставляется pH-чувствительное Ab, которое специфически связывается с белком VISTA-ECD с K_D , значение которой при pH 6,5 по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 300 раз, 500 раз, 1000 раз или 5000 раз ниже значения при pH 7,0 (при постоянной температуре, например, 25°C или 37°C).

Например, в некоторых случаях Ab связывается с белком VISTA-ECD с K_D , значение которой при pH 6,0 по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 300 раз, 500 раз, 1000 раз или 5000 раз меньше значения при pH 7,0 и/или pH 7,4 или выше (при постоянной температуре, например, 25°C или 37°C).

В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD с k_{off} , которая в кислых условиях ниже, чем в нейтральных, физиологических или щелочных условиях. В некоторых вариантах осуществления предоставляется Ab, которое связывается с белком VISTA-ECD в кислых условиях с k_{off} , которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз или 1000 раз ниже при pH 6,5, чем k_{off} при pH 7,0 и/или pH 7,4, измеренная, например, при 25°C или 37°C. Другими словами, при кислом pH скорость диссоциации ниже, чем при нейтральном pH. Например, в некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD со скоростью k_{off} , которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз или 1000 раз ниже при pH 6,0, чем k_{off} при pH 7,0 и/или pH 7,4, измеренная, например, при 25°C или 37°C. В некоторых вариантах осуществления предоставляется Ab, которое связывается с белком VISTA-ECD с k_{off} , которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз или 1000 раз ниже при pH 6,5, чем k_{off} при pH 7,4, измеренная, например, при 25°C или 37°C. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD со скоростью k_{off} , которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз или 1000 раз ниже при pH 6,0, чем k_{off} при pH 7,4, измеренная, например, при 25°C или 37°C. В некоторых вариантах осуществления предоставляется Ab, которое связывается с белком VISTA-ECD с k_{off} , которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз или 1000 раз ниже при pH 6,0-6,5, чем k_{off} при pH 7,0-7,4, измеренная, например, при 25°C или 37°C.

В некоторых вариантах осуществления предоставляется Ab, которое специфически связывается с белком VISTA-ECD с k_{on} , которая выше в кислых условиях по сравнению с k_{on} в нейтральных, физиологических или щелочных условиях. В некоторых вариантах осуществления предоставляется Ab, которое связывается с белком VISTA-ECD в кислых условиях с k_{on} , которая по меньшей мере в 2 раза, 5, 10, 20, 50, 100 или 1000 раз выше при pH 6,5, чем k_{on} при pH 7,0 и/или pH 7,4, измеренная, например, при 25°C или 37°C. Например, в некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком aVISTA-ECD с k_{on} , которая по меньшей мере в 2 раза, 5, 10, 20, 50, 100 или 1000 раз выше при pH 6,0, чем k_{on} при pH 7,0 и/или pH 7,4, измеренная, например, при 25°C или 37°C.

В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD при pH, при котором происходит протонирование по меньшей мере одного остатка гистидина, например His98 в SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD при pH, при котором происходит протонирование большинства остатков гистидина в ECD, которое, как ожидается, представляет собой pH, равный 6,5 или ниже, например, при pH в пределах от 6,0 до 6,5.

В объем настоящего изобретения также включены Ab, которые специфически связываются с белком VISTA-ECD со сродством, которое выше при нейтральном, физиологическом или щелочном pH по сравнению с кислым pH, при условии, что сродство связывания при кислом pH остается высоким. Например, Ab могут связываться с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-8} М или менее как при pH 6,5, так и при pH 7,0, даже если Ab связываются с K_D , которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 300 раз, 500 раз, 1000 раз ниже при pH 7,0 чем при pH 6,5.

В объем настоящего изобретения также включены Ab, которые имеют одно или более из свойств, указанных выше в этом разделе. Вышеуказанные свойства, такие как эпитопы с конкретными K_D , k_{off} , k_{on} , не должны рассматриваться изолированно. Таким образом, Ab может связываться с эпитопом, содержащим одну из областей SEQ ID NO:2, описанной выше, а также может иметь свойства пан-связывания или pH-чувствительного или pH-селективного связывания, как описано выше, как показано на примере одного или более вариантов поведения его K_D , k_{off} или k_{on} при различных pH.

В любом из приведенных выше вариантов осуществления Ab может представлять собой, например, полноразмерное антитело (т.е. содержащее полноразмерную тяжелую цепь (с С-концевым лизином или без него) и полноразмерную легкую цепь) или антигенсвязывающий фрагмент такой как фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент (Fab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, или Ab может представлять собой химерное, гуманизованное или человеческое антитело, или Ab может представлять собой биспецифическое или мультиспецифическое антитело.

Определение того, насколько хорошо Ab связывается с белком VISTA-ECD при данном pH, может быть проведено несколькими различными методами, например, методом поверхностного плазмонного

резонанса (ППР, SPR), такого как анализы на BIACORE®. Пример анализа ППР включает иммобилизацию одного или более антител на сенсорном чипе CM4 с иммобилизованным реагентом захвата (например, с использованием набора Biacore® для иммобилизации анти-человеческого Fc, GE Healthcare кат. № BR-1008-39; или набор Biacore® для иммобилизации антимышиного Fc, GE Healthcare кат. № BR-1008-39), а затем антигена VISTA в качестве аналита в нескольких концентрациях для определения кинетики и сродства связывания в рабочем буфере с требуемым pH. В одном из вариантов осуществления VISTA вводят при двух-пяти концентрациях в диапазоне от 0,1 нМ до 500 нМ (например, 0,1 нМ, 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 500 нМ) со скоростью потока 30 мкл/мин, со временем ассоциации до 4 мин и временем диссоциации до 10 мин. Между циклами связывания поверхность захвата восстанавливают в соответствии с инструкциями производителя для соответствующего набора иммобилизации. Все данные соответствуют двум повторам с использованием эталонной проточной кюветы и пустой инъекции. Данные с простой 1:1 кинетикой подгоняют к модели связывания Ленгмюра с переносом вещества с помощью оценочного программного обеспечения Biacore® T200. Также могут быть использованы методы ППР, описанные в примерах.

Сродство Ab к полипептиду VISTA ECD может быть определено с использованием клеток, экспрессирующих полипептид VISTA ECD, PSGL-1 или гепарансульфат на своей поверхности, причем этот метод включает проточную цитометрию, и при этом связывание Ab с VISTA-ECD, связанным с клеткой, определяют при заданном pH, например pH 6,5 или ниже. Пример анализа методом проточной цитометрии включает следующее: клетки 293T или другие клетки, эктопически экспрессирующие ECD hVISTA, ресуспендируют в буфере, состоящем из HBSS+1% BSA с pH, доведенным до требуемого значения, например, pH 6,0 с помощью MES или pH 7,4 с помощью HEPES. Ab (например, человеческий IgG) к hVISTA серийно разводят, начиная примерно с 20 мкг/мл, и инкубируют с ресуспендированными клетками в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки дважды промывают одними и теми же буферами, поддерживая требуемый pH, например pH 6,0 или 7,4, и инкубируют с конъюгированным с флуорофором вторичным антителом, которое распознает первичное антитело (например, человеческий IgG) и является стабильным при пониженном pH. Затем клетки промывают, как и раньше, и сразу, без фиксации, анализируют на BD Fortessa или другом проточном цитометре. Сродство Ab к полипептиду VISTA ECD может быть определено, как описано в примерах.

В некоторых вариантах осуществления Ab, которые связываются с ECD hVISTA, блокируют связывание hVISTA с его партнером по связыванию (например, рецептором VISTA), например, на клетках. Ингибирование или блокирование может составлять 100% или по меньшей мере 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% или 50%. В некоторых вариантах осуществления Ab связывается с белком VISTA-ECD при кислом pH, например pH 6,5 или менее, и ингибирует связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50%, например, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD и ингибирует связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH ниже 7,0. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD и ингибирует связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH ниже 6,8. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD и ингибирует связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH ниже 6,5. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD и ингибирует связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH ниже 6,3. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD и ингибирует связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH ниже 6,0. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD и ингибирует связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH ниже 5,8. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD и ингибирует связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH ниже 5,5. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD и ингибирует связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH ниже 5,3. В некоторых вариантах осуществления Ab специфически связывается с белком VISTA-ECD и ингибирует связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH ниже 5,0.

Некоторые Ab специфически связываются с белком VISTA-ECD и ингибируют связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH в диапазоне от 5,0 до 7,0. Некоторые Ab специфически связываются с белком VISTA-ECD и ингибируют связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH в диапазоне от 5,0 до 6,5. Некоторые Ab специфически связываются с белком VISTA-ECD и ингибируют связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH в диапазоне от 5,0 до 6,0. Некоторые Ab специфически связываются с белком VISTA-ECD и ингибируют связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH в диапазоне от 5,5 до 7,0. Некоторые Ab специфически связываются с белком VISTA-ECD и ингибируют связывание VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH в диапазоне от 5,5 до 6,5. Некоторые Ab специфически связываются с белком VISTA-ECD и ингибируют связывание

VISTA с партнером по связыванию по меньшей мере на 50% при pH в диапазоне от 6,0 до 6,5. Ингибирование связывания можно определить, как описано в примерах.

Партнером VISTA по связыванию может быть PSGL-1, такой как человеческий PSGL-1. Последовательности изоформ PSGL-1 человека представлены в настоящем описании в виде SEQ ID NO:3-10. Это также могут быть гепарансульфатные протеоглики, например, присутствующие в определенных клетках.

Ингибирование связывания с партнером VISTA по связыванию, может быть определено путем измерения ингибирования связывания VISTA (или VISTA ECD, или домена IgV VISTA, или VISTA-позитивных клеток) с клетками, с которыми связывается VISTA, например, Т-клетками (например, CD4⁺ Т-клетками, CD8⁺ Т-клетками, активированными или неактивированными), NK-клетками или другими клетками, с которыми связывается VISTA, в присутствии и в отсутствие антитела. Пример эксперимента, который можно использовать для определения, ингибирует ли антитело связывание VISTA с его партнером по связыванию или с Т-клетками, экспрессирующими партнера по связыванию, представляет собой анализ методом проточной цитометрии, например анализ, который включает следующее: мононуклеарные клетки периферической крови человека, полученные из крови донора, лейкоцитарную пленку или лейкопак ресуспендируют в буфере, состоящем из HBSS+1% BSA с pH, доведенным до требуемого значения, например, pH 6,0 с помощью MES или pH 7,4 с помощью HEPES. Затем клетки инкубируют в течение 30 мин при 4°C с 20 мкг/мл рекомбинантного химерного белка, состоящего из ECD hVISTA, слитого с Fc человеческого IgG1 (VISTA-Fc), и с различными концентрациями кандидатов антител, блокирующих VISTA, или контрольных антител. Затем клетки дважды промывают в тех же самых буферах, поддерживая требуемый pH, например pH 6,0 или 7,4, и инкубируют в течение еще 30 мин при 4°C с конъюгированным с флуорофором вторичным антителом, которое распознает VISTA-Fc, но не является кандидатом блокирующего антитела или контрольным антителом и которое является стабильным при пониженном pH. Затем клетки промывают, как и раньше, и сразу, без фиксации, анализируют на BD Fortessa или другом проточном цитометре. Ингибирование связывания может быть определено, например, как описано в примерах.

В конкретных вариантах осуществления раскрытые в настоящем описании Ab могут запускать или усиливать иммунный ответ, такой как антиген-специфический иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления Ab стимулируют активность Т-клеток, особенно при кислом pH, таком как в микроокружении опухоли. Стимуляцию активности Т-клеток можно измерить, например, в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) или в анализе *in vitro* с антигенпрезентирующей клеткой (природной или искусственной) и Т-клетками. Стимуляция активности Т-клеток также может быть измерена с помощью, например, анализа Jurkat, описанного в примерах.

В конкретных вариантах осуществления Ab, описанные в настоящем описании, ингибируют межклеточную адгезию, что может быть измерено, как описано в примерах.

Активность анти-VISTA Ab также может быть показана в анализах моноцитов, анализах ADCC и анализах ADCP, в частности при кислом pH, таком как в микроокружении опухоли.

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA Ab ингибируют рост опухоли на модели опухоли, например, на модели опухоли с нокином (добавлением) человеческого VISTA.

Как показано в приведенных ниже примерах, для рециркуляции анти-VISTA Ab в эндосоме, например, для усиления фармакокинетических (ПК) свойств, т.е. периода полувыведения антитела, требуется, чтобы анти-VISTA антитело связывалось с VISTA в кислых условиях. Таким образом, ожидается, что анти-VISTA Ab, которые связываются при низком pH с VISTA, например pH 6,5 или ниже, как далее описано в настоящем описании, также будут иметь более длительный приемлемый период полувыведения по сравнению с периодом полувыведения анти-VISTA антитела, которое не связывается с VISTA при кислом pH.

Примеры hVISTA-ECD-связывающих Ab.

В настоящей заявке представлены Ab, которые предпочтительно связываются с hVISTA (ECD) при кислом pH (например, в кислых условиях) относительно физиологического pH или нейтрального pH.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит переменную область тяжелой цепи ("VH"), содержащую VH CDR1, CDR2 и/или CDR3 любого из анти-hVISTA антител, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VH любого из представленных в настоящем описании анти-hVISTA антител. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH P1-061029 или P1-061015 или их клонов-потомков, таких как

P1-061029,
P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752
P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F. CDR1, CDR2 и CDR3 VH

каждого из этих видов содержат положения аминокислот 26-35 (VH CDR1), 50-66 (VH CDR2) и 99-110 (VH CDR3) последовательностей VH каждого из указанных выше видов антител, представленных ниже в таблице последовательностей. CDR также подчеркнуты и выделены жирным шрифтом в каждой из последовательностей VH указанных выше видов антител, представленных ниже в таблице последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VH любого из анти-hVISTA антител, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VH одного из

P1-061029, P1-068757, P1-068759,
P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752 P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F. CDR1, CDR2 и CDR3 VL

каждого из этих видов содержат положения аминокислот 24-35 (VL CDR1), 51-57 (VL CDR2) и 90-98 (VL CDR3) последовательностей VL каждого из указанных выше видов антител, представленных ниже в таблице последовательностей. CDR также подчеркнуты и выделены жирным шрифтом в каждой из этих последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH любого из анти-hVISTA Ab, представленных в настоящем описании, и VL, содержащую CDR1, CDR2 и/или CDR3 любого из анти-hVISTA Ab предоставленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VH любого из анти-hVISTA Ab, представленных в настоящем описании, и VL, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из анти-hVISTA Ab, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH P1-061029 или P1-061015 или их клонов-потомков, таких как

P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765,
P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752 P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F, и VL, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VL P1-061029 или P1-061015 или их клонов-потомков, таких как P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752 P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-

[illegible]

068767_E30D_D102V, и VL, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VL P1-068767_E30D_D102V;

(iii) VH, содержащую аминокислотную последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 VH P1-068767_E30D, и VL, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VL P1-068767_E30D;

(jjj) VH, содержащую аминокислотную последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 VH P1-068767_E30D_E55A, и VL, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VL P1-068767_E30D_E55A;

(kkk) VH, содержащую аминокислотную последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 VH P1-068767_E100fF_D102V, и VL, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VL P1-068767_E100fF_D102V;

(lll) VH, содержащую аминокислотную последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 VH P1-068767_E55A_E100fF, и VL, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VL P1-068767_E55A_E100fF;

(mmm) VH, содержащую аминокислотную последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 VH P1-068767_D52N_E100fF, и VL, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VL P1-068767_D52N_E100fF;

(nnn) VH, содержащую аминокислотную последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 VH P1-068767_E100fF, и VL, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VL P1-068767_E100fF;

(ooo) VH, содержащую аминокислотную последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 VH P1-068767_E30D_E100fF, и VL, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 VL P1-068767_E30D_E100fF.

В этом случае, в приведенной ниже таблице последовательностей представлены последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи и последовательности полноразмерных тяжелой и легкой цепей перечисленных выше антител с константной областью тяжелой цепи IgG1.3 (если в таблице не указана другая константная область HC), а также указаны расположения их CDR1, CDR2 и CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 VL по аминокислотному остатку путем выделения жирным шрифтом и подчеркивания CDR в каждой из последовательностей VH и VL. Так, например, CDR1 VH P1-061029 содержит аминокислоты 26-35 SEQ ID NO:67, тогда как CDR2 VH содержит аминокислоты 50-66 SEQ ID NO:67, а CDR3 VH содержит аминокислоты 99-110 SEQ ID NO:67 и т.д., аминокислоты которых в SEQ ID NO:67, представленной в таблице последовательностей, отмечены жирным шрифтом и подчеркнуты.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность VH любого из представленных в настоящем описании анти-hVISTA антител. Отдельные последовательности VH у конкретных видов антител, представленных в настоящем описании, перечислены в таблице последовательностей. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность

VH P1-061029 или P1-061015 или их клонов-потомков, таких как P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752 P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100fF, P1-068761_E55A_E100fF, P1-068761_H100G_E100fF, P1-068761_E30D_E100fF, P1-068761_E56N_E100fF, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100fF, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100fF_D102V, P1-068767_E55A_E100fF, P1-068767_D52N_E100fF, P1-068767_E100fF или P1-068767_E30D_E100fF.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит CDR1, CDR2 и CDR3 VH, содержащие аминокислотные последовательности CDR VH любого из анти-hVISTA Ab, представленных в настоящем описании, и содержит VH, которая является на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной VH любого из анти-hVISTA Ab, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной аминокислотной последовательности

VH P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752 P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100fF, P1-068761_E55A_E100fF, P1-068761_H100G_E100fF, P1-068761_E30D_E100fF, P1-068761_E56N_E100fF, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100fF, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100fF_D102V, P1-068767_E55A_E100fF, P1-068767_D52N_E100fF, P1-068767_E100fF или P1-068767_E30D_E100fF.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность VH любого из представленных в настоящем описании анти-hVISTA антител. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-061029 или P1-061015 или их клонов-потомков, таких как

P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752, P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность VL любого из представленных в настоящем описании анти-hVISTA антител. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность

VL P1-061029 или P1-061015 или их клонов-потомков, таких как P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752, P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит CDR1, CDR2 и CDR3 VL, содержащие аминокислотные последовательности CDR VL любого из анти-hVISTA антител, представленных в настоящем описании, и содержит VL, которая является на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной VL любого из анти-hVISTA Ab, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной аминокислотной последовательности

VL P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752, P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность VL любого из представленных в настоящем описании анти-hVISTA антител. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-061029 или P1-061015 или их клонов-потомков, таких как

P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752, P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность VH любого из анти-hVISTA Ab, представленных в настоящем описании, и содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность VL любого из анти-hVISTA Ab, представленных в настоящем описании. В некоторых из этих вариантов осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-061029 или P1-061015 или их клонов-потомков, таких как

P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752, P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F; и VL,

содержащую аминокислотную последовательность VL P1-061029 или P1-061015. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности

VH и VL P1-061029 или P1-061015, или их клонов-потомков, таких как P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752, P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит CDR1, CDR2 и CDR3 VH, содержащие аминокислотные последовательности CDR VH любого из представленных в настоящем описании анти-hVISTA Ab, а также CDR1, CDR2 и CDR3 VL, содержащие аминокислотные последовательности CDR VL любого из представленных в настоящем описании анти-hVISTA антител, а также содержат VH и VL, каждая из которых является на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной соответствующим VH и VL любого из анти-hVISTA Ab, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит все 6 CDR анти-hVISTA Ab, представленных в настоящем описании, а также содержит аминокислотные последовательности VH и VL, каждая из которых является на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной соответствующим VH

и VL анти-hVISTA Ab, таким как VH и VL P1-061029 или P1-061015 или их клонов-потомков, такие как P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752, P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности VH и VL любого из представленных в настоящем описании анти-hVISTA антитела. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит VH и VL, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность

VH и VL P1-061029 или P1-061015 или их клонов-потомков, таких как P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752, P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F.

анти-hVISTA Ab может содержать:

- (a) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-061029, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-061029;
- (b) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-061015, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-061015;
- (c) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-068757, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-068757;
- (d) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-068759, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-068759;
- (e) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-068761, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-068761;
- (f) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-068763, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-068763;
- (g) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-068765, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-068765;
- (h) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-068767, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-068767;
- (i) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-068769, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-068769;
- (j) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-068771, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-068771;
- (k) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-068773, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-068773;
- (l) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-068775, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-068775;
- (m) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-069059, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-069059;
- (n) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-069061, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-069061;
- (o) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-069063, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-069063;
- (p) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-069065, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-069065;
- (q) VH, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-069067, и VL, содержащую аминокислотную последовательность VL P1-069067;

- [illegible]

[illegible]

Анти-hVISTA Ab может содержать:

(a) VH, содержащую CDR VH P1-061029, и VL, содержащую CDR VL P1-061029, и аминокислотные последовательности VH и VL, которые являются на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичными VH и VL P1-061029;

(b) VH, содержащую CDR VH P1-061015, и VL, содержащую CDR VL P1-061015, и аминокислотные последовательности VH и VL, которые являются на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичными VH и VL P1-061015:

(с) VH, содержащую CDR VH P1-068757, и VL, содержащую CDR VL P1-068757, и аминокислотные последовательности VH и VL, которые являются на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичными VH и VL P1-068757:

(d) VH, содержащую CDR VH P1-068759, и VL, содержащую CDR VL P1-068759, и аминокислотные последовательности VH и VL, которые являются на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичными VH и VL P1-068759:

(e) VH, содержащую CDR VH P1-068761, и VL, содержащую CDR VL P1-068761, и аминокислотные последовательности VH и VL, которые являются на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей

94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичными VH и VL P1-068767 E30D E100fF.

Анти-hVISTA Ab может содержать:

(a) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-061029, и VL, состоящую из VL P1-061029;

(b) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-061015, и VL, состоящую из VL P1-061015;

(с) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068757, и VL, состоящую из VL P1-068757;

(d) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068759, и VL, состоящую из VL P1-068759;

(e) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068761, и VL, состоящую из VL P1-068761;

(f) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068763, и VL, состоящую из VL P1-068763;

(g) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068765, и VL, состоящую из VL P1-068765:

(h) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068767, и VL, состоящую из VL P1-068767;

(i) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068769, и VL, состоящую из VL P1-068769;

(j) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068771, и VL, состоящую из VL P1-068771;

(k) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068773, и VL, состоящую из VL P1-068773;

(1) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068775, и VL, состоящую из VL P1-068775;

(m) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-069059, и VL, состоящую из VL P1-069059;

(n) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-069061, и VL, состоящую из VL P1-069061;

(o) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-069063, и VL, состоящую из VL P1-069063;

(p) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-069065, и VL, состоящую из VL P1-069065;

(q) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-069067, и VL, состоящую из VL P1-069067:

(r) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-069069, и VL, состоящую из VL P1-069069;

(s) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-069071, и VL, состоящую из VL P1-069071;

(t) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-069073, и VL, состоящую из VL P1-069073;

(u) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-069075, и VL, состоящую из VL P1-069075:

(v) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-069077, и VL, состоящую из VL P1-069077;

(w) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068736, и VL, состоящую из VL P1-068736;

(х) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068738, и VL, состоящую из VL P1-068738:

(y) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068740, и VL, состоящую из VL P1-068740;

(z) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068742, и VL, состоящую из VL P1-068742:

(aa) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068744, и VL, состоящую из VL P1-068744:

(bb) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH f PI-068746, и VL, состоящей из VL P1-068746;

(с) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068748, и VL, состоящую из VL P1-068748;

(dd) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068750, и VL, состоящую из

из аминокислотной последовательности VL P1-068767_E30D;

(jjj) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30DE55A, и VL, состоящей из аминокислотной последовательности VL P1-068767_E30D_E55A;

(kkk) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068767_E100fF_D102V, и VL, состоящей из аминокислотной последовательности VL P1-068767_E100fF_D102V;

(lll) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068767_E55A_E100fF, и VL, состоящей из аминокислотной последовательности VL P1-068767_E55A_E100fF;

(mmm) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068767_D52N_E100fF, и VL, состоящей из аминокислотной последовательности VL P1-068767_D52N_E100fF;

(nnn) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068767_E100fF, и VL, состоящую из аминокислотной последовательности VL P1-068767_E100fF; или

(ooo) VH, состоящую из аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30D_E100fF, и VL, состоящую из аминокислотной последовательности VL P1-068767_E30D_E100fF.

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA Ab содержит любую из переменных областей и/или CDR 1-3 переменных областей антител, описанных выше и в других местах в настоящем описании, такие как:

- (1) одна или более CDR1, CDR2 и CDR3 VH;
- (2) CDR1, CDR2 и CDR3 VH;
- (3) VH;
- (4) одна или более CDR1, CDR2 и CDR3 VH и одна или более CDR1, CDR2 и CDR3 VL;
- (5) CDR1, CDR2 и CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 VL или
- (6) VH и VL:

P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752, P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100fF, P1-068761_E55A_E100fF, P1-068761_H100G_E100fF, P1-068761_E30D_E100fF, P1-068761_E56N_E100fF, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100fF, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100fF_D102V, P1-068767_E55A_E100fF, P1-068767_D52N_E100fF, P1-068767_E100fF или P1-068767_E30D_E100fF; и

анти-VISTA Ab также является антителом IgG, таким как антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или его модифицированной формой, как описано в разделе ниже. В некоторых вариантах осуществления константная область имеет эффекторную функцию, и в некоторых вариантах осуществления константная область не обладает эффекторной функцией. В некоторых вариантах осуществления константная область представляет собой область IgG1.3.

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA Ab содержит любую из переменных областей и/или CDR 1-3 переменных областей антител, описанных выше и в других местах в настоящем описании, такие как:

- (1) одна или более из VH CDR1, CDR2 и CDR3;
- (2) CDR1, CDR2 и CDR3 VH;
- (3) VH;
- (4) одна или более из CDR1, CDR2 и CDR3 VH и одна или более из CDR1, CDR2 и CDR3 VL;
- (5) CDR1, CDR2 и CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 VL или
- (6) VH и VL:

P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752, P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100fF, P1-068761_E55A_E100fF, P1-068761_H100G_E100fF, P1-068761_E30D_E100fF, P1-068761_E56N_E100fF, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100fF, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100fF_D102V, P1-068767_E55A_E100fF, P1-068767_D52N_E100fF, P1-068767_E100fF или P1-068767_E30D_E100fF, и дополнительно

содержит одну или более из следующих характеристик:

специфическое связывание с hVISTA, например богатой гистидином областью ECD или полипептидом, содержащим аминокислотные остатки 35-127 SEQ ID NO:2, при кислом pH, например pH 6,0 или pH 6,5;

отсутствие значимого связывания с hVISTA, например богатой гистидином областью ECD или полипептидом, содержащим аминокислотные остатки 35-127 SEQ ID NO:2, при физиологическом pH или нейтральном pH, например, pH 7,4 или pH 7,0;

специфическое связывание с супоVISTA (VISTA яванского макака), например богатой гистидином областью ECD, при кислом pH, например, 6,0 или 6,5;

отсутствие значимого связывания с супоVISTA, например богатой гистидином областью ECD, при физиологическом pH или нейтральном pH, например, 7,4 или 7,0;

сниженное связыванием с hVISTA-ECD, содержащим замену одной или более из следующих аминокислот: T35, Y37, K38, T39, Y41, R54, T61, F62, Q63, L65, H66, L67, H68, H69, F97, L115, V117, I119, H121, H122, S124, E125, R127, относительно ECD hVISTA с SEQ ID NO:2;

перекрестная конкуренция за связывание с hVISTA с P1-061029, P1-068761, P1-068767 и/или P1-061015;

ингибирование связывания hVISTA с Т-клетками человека при кислом pH, например 6,0 или 6,5;

ингибирование связывания hVISTA с PSGL-1 при кислом pH, например 6,0 или 6,5;

среднее время пребывания в организме яванского макака не менее 350 ч;

стимулирование активации Т-клеток;

ингибирование VISTA-опосредованной межклеточной адгезии и

специфическое связывание с hVISTA в образцах опухолевых клеток человека или в образцах воспаленной ткани человека.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи любого из анти-hVISTA антител, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-061029 или P1-061015 или их клонов-потомков, как показано ниже в таблице последовательностей, содержащих константную область тяжелой цепи IgG1.3, таких как

P1-061029.IgG1.3 (SEQ ID NO:69), P1-068757.IgG1.3, P1-068759.IgG1.3, P1-068761.IgG1.3, P1-068763.IgG1.3, P1-068765.IgG1.3, P1-068767.IgG1.3, P1-068769.IgG1.3, P1-068771.IgG1.3, P1-068773.IgG1.3, P1-068775.IgG1.3, P1-069059.IgG1.3, P1-069061.IgG1.3, P1-069063.IgG1.3, P1-069065.IgG1.3, P1-069067.IgG1.3, P1-069069.IgG1.3, P1-069071.IgG1.3, P1-069073.IgG1.3, P1-069075.IgG1.3, P1-069077.IgG1.3, P1-061015.IgG1.3, P1-068736.IgG1.3, P1-068738.IgG1.3, P1-068740.IgG1.3, P1-068742.IgG1.3, P1-068744.IgG1.3, P1-068766.IgG1.3, P1-068748.IgG1.3, P1-068750.IgG1.3, P1-068752.IgG1.3, P1-068754.IgG1.3, P1-068761_E55A.IgG1.3, P1-068761_H100G.IgG1.3, P1-068761_E56N.IgG1.3, P1-068761_E55A_E56N.IgG1.3, P1-068761_E30D.IgG1.3, P1-068761_E30D_E55A.IgG1.3, P1-068761_E56N_H100G.IgG1.3, P1-068761_E30D_H100G.IgG1.3, P1-068761_E30D_E56N.IgG1.3, P1-068761_E100F.IgG1.3, P1-068761_E55A_E100F.IgG1.3, P1-068761_H100G_E100F.IgG1.3, P1-068761_E30D_E100F.IgG1.3, P1-068761_E56N_E100F.IgG1.3, P1-068761_E32Y.IgG1.3, P1-068761_E32Y_E55A.IgG1.3, P1-068761_E32Y_E56N.IgG1.3, P1-068761_E30D_E32Y.IgG1.3, P1-068761_E32Y_H100G.IgG1.3, P1-068761_E32Y_E100F.IgG1.3, P1-068767_D52N_D102V.IgG1.3, P1-068767_D52N.IgG1.3, P1-068767_D52N_E55A.IgG1.3, P1-068767_E55A_D102V.IgG1.3, P1-068767_D102V.IgG1.3, P1-068767_E55A.IgG1.3, P1-068767_E30D_D52N.IgG1.3, P1-068767_E30D_D102V.IgG1.3, P1-068767_E30D.IgG1.3, P1-068767_E30D_E55A.IgG1.3, P1-068767_E100F_D102V.IgG1.3, P1-068767_E55A_E100F.IgG1.3, P1-068767_D52N_E100F.IgG1.3, P1-068767_E100F.IgG1.3 или P1-068767_E30D_E100F.IgG1.3.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи любого из анти-hVISTA антител, представленных в настоящем описании, которые содержат константную область тяжелой цепи IgG1.3, и аминокислотную последовательность легкой цепи любого из анти-hVISTA Ab, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность VH P1-061029 или P1-061015, или их клонов-потомков, которые содержат константную область

HC IgG1.3, таких как P1-061029.IgG1.3 (SEQ ID NO:69),
P1-068757.IgG1.3, P1-068759.IgG1.3, P1-068761.IgG1.3, P1-068763.IgG1.3, P1-
068765.IgG1.3, P1-068767.IgG1.3, P1-068769.IgG1.3, P1-068771.IgG1.3, P1-068773.IgG1.3,
P1-068775.IgG1.3, P1-069059.IgG1.3, P1-069061.IgG1.3, P1-069063.IgG1.3, P1-
069065.IgG1.3, P1-069067.IgG1.3, P1-069069.IgG1.3, P1-069071.IgG1.3, P1-069073.IgG1.3,
P1-069075.IgG1.3, P1-069077.IgG1.3, P1-061015.IgG1.3, P1-068736.IgG1.3, P1-
068738.IgG1.3, P1-068740.IgG1.3, P1-068742.IgG1.3, P1-068744.IgG1.3, P1-068766.IgG1.3,
P1-068748.IgG1.3, P1-068750.IgG1.3, P1-068752.IgG1.3, P1-068754.IgG1.3, P1-
068761_E55A.IgG1.3, P1-068761_H100G.IgG1.3, P1-068761_E56N.IgG1.3, P1-
068761_E55A_E56N.IgG1.3, P1-068761_E30D.IgG1.3, P1-068761_E30D_E55A.IgG1.3, P1-
068761_E56N_H100G.IgG1.3, P1-068761_E30D_H100G.IgG1.3, P1-
068761_E30D_E56N.IgG1.3, P1-068761_E100F.IgG1.3, P1-068761_E55A_E100F.IgG1.3,
P1-068761_H100G_E100F.IgG1.3, P1-068761_E30D_E100F.IgG1.3, P1-
068761_E56N_E100F.IgG1.3, P1-068761_E32Y.IgG1.3, P1-068761_E32Y_E55A.IgG1.3,
P1-068761_E32Y_E56N.IgG1.3, P1-068761_E30D_E32Y.IgG1.3, P1-
068761_E32Y_H100G.IgG1.3, P1-068761_E32Y_E100F.IgG1.3, P1-
068767_D52N_D102V.IgG1.3, P1-068767_D52N.IgG1.3, P1-068767_D52N_E55A.IgG1.3,
P1-068767_E55A_D102V.IgG1.3, P1-068767_D102V.IgG1.3, P1-068767_E55A.IgG1.3, P1-
068767_E30D_D52N.IgG1.3, P1-068767_E30D_D102V.IgG1.3, P1-068767_E30D.IgG1.3,
P1-068767_E30D_E55A.IgG1.3, P1-068767_E100F_D102V.IgG1.3, P1-
068767_E55A_E100F.IgG1.3, P1-068767_D52N_E100F.IgG1.3, P1-068767_E100F.IgG1.3
или P1-068767_E30D_E100F.IgG1.3;

и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-061029 или P1-061015.

Анти-hVISTA Ab может содержать:

(a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-061029.IgG1.3 (SEQ ID NO:69), и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-061029 (SEQ ID NO:70);

(b) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-061015.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-061015;

(c) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-068757.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068757;

(d) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-068759.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068759;

(e) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-068761.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068761;

(f) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-068763.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068763;

(g) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-068765.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068765;

(h) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-068767.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068767;

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-068769.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068769;

(j) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-068771.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068771;

(k) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-068773.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068773;

(l) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-068775.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068775;

(m) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-069059.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-069059;

(n) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-069061.IgG1.3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-069061;

(o) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи P1-

- [illegible]

(kkk) тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности тяжелой цепи P1-068767_E100fF_D102V.IgG1.3, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E100fF_D102V;

(lll) тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности тяжелой цепи P1-068767_E55A_E100fF.IgG1.3, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E55A_E100fF;

(mmm) тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности тяжелой цепи P1-068767_D52N_E100fF.IgG1.3, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_D52N_E100fF;

(nnn) тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности тяжелой цепи P1-068767_E100fF.IgG1.3, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E100fF; или

(ooo) тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности тяжелой цепи P1-068767_E30D_E100fF.IgG1.3, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E30D_E100fF.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к анти-VISTA mAb, содержащим:

тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности тяжелой цепи из указанных выше (a)-(ooo), за которой следует остаток Lys; и

легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи из указанных выше (a)-(ooo);

причем аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи выбраны из одного и того же вида антитела из перечисленных выше (a)-(ooo).

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab может содержать аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность VH раскрытых в настоящем описании видов антител, но не константную область тяжелой цепи IgG1.3, как предусмотрено в последовательностях HC в приведенной в настоящем описании таблице последовательностей (и см. SEQ ID NO:163), при этом антитело может содержать другую последовательность константной области тяжелой цепи, такую как константная область человеческого IgG1 дикого типа, такая как аллотип f человеческого IgG1 (IgG1f) (SEQ ID NO:182), или модифицированную константную область человеческого IgG1, такую как IgG1.If (SEQ ID NO:183), или модифицированную константную область человеческого IgG1, такую как IgG1.P238K (SEQ ID NO:184). Соответственно, варианты осуществления настоящего изобретения включают анти-VISTA Ab, содержащие:

(a) тяжелую цепь, содержащую: (i) аминокислотную последовательность VH P1-061029 (SEQ ID NO:67) и (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-061029 (SEQ ID NO:70);

(b) тяжелую цепь, содержащую: (i) аминокислотную последовательность VH P1-061015 и (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-061015;

(c) тяжелую цепь, содержащую: (i) аминокислотную последовательность VH P1-068757 и (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068757;

(d) тяжелую цепь, содержащую: (i) аминокислотную последовательность VH P1-068759 и (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068759;

(e) тяжелую цепь, содержащую: (i) аминокислотную последовательность VH P1-068761 и (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068761;

(f) тяжелую цепь, содержащую: (i) аминокислотную последовательность VH P1-068763 и (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068763;

(g) тяжелую цепь, содержащую: (i) аминокислотную последовательность VH P1-068765 и (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068765;

(h) тяжелую цепь, содержащую: (i) аминокислотную последовательность VH P1-068767 и (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068767;

(i) тяжелую цепь, содержащую: (i) аминокислотную последовательность VH P1-068769 и (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068769;

(j) тяжелую цепь, содержащую: (i) аминокислотную последовательность VH P1-068771 и (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-068771;

стоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068761_E32Y_E100fF;

(aaa) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_D52N_D102V и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_D52N_D102V;

(bbb) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_D52N и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_D52N;

(ccc) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_D52N_E55A и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_D52N_E55A;

(ddd) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VHP1-068767_E55A_D102V и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E55A_D102V;

(eee) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_D102V и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_D102V;

(fff) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E55A и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E55A;

(ggg) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30D_D52N и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E30D_D52N;

(hhh) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30D_D102V и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E30D_D102V;

(iii) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30D и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E30D;

(jjj) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30D_E55A и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E30D_E55A;

(kkk) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E100fF_D102V и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E100fF_D102V;

(lll) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E55A_E100fF и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E55A_E100fF;

(mmm) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_D52N_E100fF и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_D52N_E100fF;

(nnn) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E100fF и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E100fF; или

(ooo) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30D_E100fF и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:183, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E30D_E100fF, причем С-концевая аминокислота VH и N-концевая аминокислота SEQ ID NO:183 образуют пептидную связь.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к анти-VISTA mAb, содержащим:

тяжелую цепь, состоящую из аминокислотных последовательностей (i) VH из перечисленных выше (a)-(ooo), (ii) SEQ ID NO:183 и (iii) остатка Lys, причем С-концевая аминокислота VH и N-концевая аминокислота SEQ ID NO:183 образуют пептидную связь, при этом С-концевая аминокислота SEQ ID NO:183 присоединена к N-концевому Lys; и

легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи из перечисленных выше (a)-(ooo);

причем аминокислотные последовательности VH и легкой цепи выбирают из одного и того же вида антитела из перечисленных выше (a)-(ooo).

Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения включают анти-VISTA Ab, содержащие:

(a) тяжелую цепь, содержащую: (i) аминокислотную последовательность VH P1-061029 (SEQ ID NO:67) и (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:184, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи P1-061029 (SEQ ID NO:70);

последовательности легкой цепи P1-068767_E55A;

(ggg) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30D_D52N и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:184, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E30D_D52N;

(hhh) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30D_D102V и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:184, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E30D_D102V;

(iii) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30D и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:184, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E30D;

(jjj) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30D_E55A и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:184, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E30D_E55A;

(kkk) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E100fF_D102V и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:184, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E100fF_D102V;

(lll) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E55A_E100fF и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:184, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E55A_E100fF;

(mmm) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_D52N_E100fF и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:184, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_D52N_E100fF;

(nnn) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E100fF и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:184, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E100fF; или

(ooo) тяжелую цепь, состоящую из: (i) аминокислотной последовательности VH P1-068767_E30D_E100fF и (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:184, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи P1-068767_E30D_E100fF, причем С-концевая аминокислота VH и N-концевая аминокислота SEQ ID NO:184 образуют пептидную связь.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к анти-VISTA mAb, содержащим:

тяжелую цепь, состоящую из аминокислотных последовательностей (i) VH из перечисленных выше (a)-(ooo), (ii) SEQ ID NO:184 и (m) остатка Lys, причем С-концевая аминокислота VH и N-концевая аминокислота SEQ ID NO:184 образуют пептидную связь, при этом С-концевая аминокислота SEQ ID NO:184 присоединена к N-концевому Lys; и

легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности легкой цепи из перечисленных выше (a)-(ooo);

причем аминокислотные последовательности VH и легкой цепи выбирают из одного и того же вида антитела из перечисленных выше (a)-(ooo).

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab может содержать аминокислотную последовательность VH, которая является на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной аминокислотной последовательности P1-061029, причем антитело содержит CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH P1-061029, в которой по меньшей мере один остаток замещен D, E или H. В некоторых вариантах осуществления каждая из CDR1, CDR2 и CDR3 VH P1-061029 содержит один, два или три остатка, замещенных D, E или H. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab может содержать аминокислотную последовательность VH, которая является на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной аминокислотной последовательности P1-061029, причем антитело содержит CDR1 VH, содержащую один или два остатка D или E в положениях аминокислот 4, 5 или 7 CDR1, и/или содержит CDR2 VH с одним, двумя или тремя остатками D, E или H в положениях 3, 5, 6 или 7 CDR2, и/или CDR3 VH с одним, двумя или тремя остатками D, E или H в положениях 6, 12 или 14 CDR 3 (см. табл. 5 ниже в отношении примеров антител, попадающих в эти варианты). В таких случаях вариативная область легкой цепи может содержать CDR1, CDR2 и/или CDR3 P1-061029 или P1-061015 или их клон-потомка, такого как

P1-
061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769,
P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-
069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736,
P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-
068752 P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-
068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G,
P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-
068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-
068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N,
P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-
068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-
068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-
068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-
068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-
068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F,

и/или вариабельная область легкой цепи может быть на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной таковой у P1-061029 или P1-061015 или их клона-потомка, такого как

P1-061029, P1-
068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771,
P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-
069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738,
P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752 P1-
068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N,
P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-
068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-
068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-
068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N,
P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-
068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-
068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-
068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-
068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-
068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F.

В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab может содержать аминокислотную последовательность VH, которая является на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной аминокислотной последовательности P1-061015, причем антитело содержит CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH P1-061015, в которой по меньшей мере один остаток замещен D, E или H. В некоторых вариантах осуществления каждая из CDR1, CDR2 и CDR3 VH P1-061015 содержит один, два или три остатка, замещенных D, E или H. В некоторых вариантах осуществления анти-hVISTA Ab может содержать аминокислотную последовательность VH, которая на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной аминокислотной последовательности P1-061015, причем антитело содержит CDR1 VH, содержащую один или два остатка D, E или H в положениях аминокислот 6, 7, 8 и 9 CDR1, и/или содержит VH CDR2 с одним, двумя или тремя D, E или H остатками в положениях 1, 2, 4 или 8-11 CDR2, и/или CDR3 VH с одним, двумя или тремя остатками D, E или H в положениях 2, 3, 6, 7 или 12 CDR3 (см. табл. 6 ниже в отношении примеров антител, попадающих в эти варианты осуществления). В таких случаях вариабельная область легкой цепи может содержать CDR1, CDR2 и/или CDR3 P1-061029 или P1-061015 или их клона-потомка, такого как

P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-
068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065,
P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-
068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-
068752 P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-
068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G,
P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-
068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-
068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N,
P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-
068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-
068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-
068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-
068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-
068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F,

и/или вариабельная область легкой цепи может быть на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичной таковой у P1-061029 или P1-061015 или их клона-потомка, такого как

P1-061029, P1-068757, P1-068759, P1-068761, P1-068763, P1-068765, P1-068767, P1-068769, P1-068771, P1-068773, P1-068775, P1-069059, P1-069061, P1-069063, P1-069065, P1-069067, P1-069069, P1-069071, P1-069073, P1-069075, P1-069077, P1-061015, P1-068736, P1-068738, P1-068740, P1-068742, P1-068744, P1-068766, P1-068748, P1-068750, P1-068752 P1-068754, P1-068761_E55A, P1-068761_H100G, P1-068761_E56N, P1-068761_E55A_E56N, P1-068761_E30D, P1-068761_E30D_E55A, P1-068761_E56N_H100G, P1-068761_E30D_H100G, P1-068761_E30D_E56N, P1-068761_E100F, P1-068761_E55A_E100F, P1-068761_H100G_E100F, P1-068761_E30D_E100F, P1-068761_E56N_E100F, P1-068761_E32Y, P1-068761_E32Y_E55A, P1-068761_E32Y_E56N, P1-068761_E30D_E32Y, P1-068761_E32Y_H100G, P1-068761_E32Y_E100F, P1-068767_D52N_D102V, P1-068767_D52N, P1-068767_D52N_E55A, P1-068767_E55A_D102V, P1-068767_D102V, P1-068767_E55A, P1-068767_E30D_D52N, P1-068767_E30D_D102V, P1-068767_E30D, P1-068767_E30D_E55A, P1-068767_E100F_D102V, P1-068767_E55A_E100F, P1-068767_D52N_E100F, P1-068767_E100F или P1-068767_E30D_E100F.

В некоторых вариантах осуществления такое модифицированное анти-hVISTA клона-потомка P1-061029 или P1-061015 обладает одной или более из следующих характеристик:

специфическое связывание с hVISTA, например богатой гистидином областью ECD или полипептидом, содержащим аминокислотные остатки 35-127 SEQ ID NO:2, при кислом pH, например, pH 6,0 или pH 6,5;

отсутствие значимого связывания с hVISTA, например богатой гистидином областью ECD или полипептидом, содержащим аминокислотные остатки 35-127 SEQ ID NO:2, при физиологическом pH или нейтральном pH, например, pH 7,4 или pH 7,0;

специфическое связывание с сyноVISTA, например богатой гистидином областью ECD, при кислом pH, например, 6,0 или 6,5;

отсутствие значимого связывания с сyноVISTA, например богатой гистидином областью ECD, при физиологическом pH или нейтральном pH, например, 7,4 или 7,0;

сниженное связывание с hVISTA-ECD, имеющим замену одной или более из следующих аминокислот: : T35, Y37, K38, T39, Y41, R54, T61, F62, Q63, L65, H66, L67, H68, H69, F97, L115, V117, I119, H121, H122, S124, E125, R127 относительно ECD hVISTA с SEQ ID NO:2;

перекрестная конкуренция за связывание с hVISTA с P1-061029, P1-068761, P1-068767 и/или P1-061015;

ингибирование связывания hVISTA с Т-клетками человека при кислом pH, например, 6,0 или 6,5;

ингибирование связывания hVISTA с PSGL-1 при кислом pH, например, 6,0 или 6,5;

среднее время пребывания в организме яванского макака не менее 350 ч;

стимулирование активации Т-клеток;

ингибирование VISTA-опосредованной межклеточной адгезии и

специфическое связывание с hVISTA в образцах опухолевых клеток человека или в образцах воспаленной ткани человека.

Примеры константных областей антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в настоящем описании, содержит одну или более человеческих константных областей. В некоторых вариантах осуществления человеческая константная область тяжелой цепи имеет изотип, выбранный из IgA, IgG и IgD. В некоторых вариантах осуществления человеческая константная область легкой цепи имеет изотип, выбранный из κ и λ . В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в настоящем описании, содержит константную область человеческого IgG, такого как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в настоящем описании, содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG4. В некоторых таких вариантах осуществления антитело, раскрытое в настоящем описании, содержит мутацию S241P в константной области человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в настоящем описании, содержит константную область человеческого IgG4 и человеческую легкую к-цепь.

Выбор константной области тяжелой цепи может определить, будет ли антитело иметь эффекторную функцию *in vivo*. Такая эффекторная функция в некоторых вариантах осуществления включает антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) и может приводить к гибели клетки, с которой связывается антитело. В некоторых способах лечения, включая способы лечения некоторых видов рака, может быть желательной гибель клеток, например, когда антитело связывается с клеткой, которая обеспечивает поддержание или рост опухоли. Типичные клетки, которые способны обеспечивать поддержание или рост опухоли, включают, без ограничения, сами опухолевые клетки, клетки, которые содействуют развитию сосудистой сети опухоли, и клетки, которые обеспечивают лиганды, факторы роста или контррецепторы, поддерживающие или способствующие росту опухоли или выживанию опухоли. В некоторых вариантах осуществления, в которых требуется эффекторная функция, выбирают антитело, содержащее тяжелую цепь человеческого IgG1 или тяжелую цепь человеческого IgG3.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящей заявке, модифицировано для увеличения или уменьшения степени гликозилирования. Добавление или удаление участков

гликозилирования в антитело можно с легкостью осуществить путем замены аминокислотной последовательности, таким образом создавая или удаляя один или более участков гликозилирования.

Если антитело содержит Fc-фрагмент, углевод, присоединенный к ней, может быть изменен. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный двухантенный олигосахарид, который обычно присоединен посредством N-связи к Asn297 домена CH2 Fc-фрагмента; см., например, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Олигосахарид может включать различные углеводы, например маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стволе" двухантенной структуры олигосахарида. В некоторых вариантах осуществления олигосахарид в антителе по изобретению может быть модифицирован для создания антител с некоторыми улучшенными свойствами. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело может быть афукозилировано, например, с помощью мутации остатков, таких как Asn297, которые обычно гликозилируют, используя фукозосодержащие соединения, или с помощью других средств. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут содержать афукозилированную константную область человеческого IgG1.

Антитела дополнительно содержат раздвоенные олигосахариды, например, в которых двухантенный олигосахарид, присоединенный к Fc-фрагменту антитела, раздвоен с помощью GlcNAc. Такие антитела могут иметь сниженный уровень фукозилирования и/или улучшенную функцию ADCC. Примеры таких антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патенте США № 6602684 (Umana et al.); и US 2005/0123546 (Umana et al.). Также предоставляются антитела с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-фрагменту. Такие антитела могут иметь улучшенную функцию CDC. Такие антитела описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); и WO 1999/22764 (Raju, S.).

Антитела также имеют удлиненные аминоконцевые лидерные последовательности. Например, на аминоконце любой одной или более тяжелых или легких цепей антитела может присутствовать одна или более аминокислотных остатков находящейся на аминоконце лидерной последовательности. Типичное удлинение аминоконцевой лидерной последовательности содержит или состоит из трех аминокислотных остатков VHS, присутствующих на одной или обеих легких цепях антитела.

Период полувыведения *in vivo* или из сыворотки полипептидов, связывающихся с высоким сродством с человеческим FcRn, можно определить, например, у трансгенных мышей, людей или приматов, не являющихся человеком, которым введены полипептиды с измененным Fc-фрагментом; см. также, например, Petkova et al. *International Immunology* 18(12):1759-1769(2006).

В некоторых вариантах осуществления изобретения афукозилированное антитело опосредует ADCC в присутствии человеческих эффекторных клеток более эффективно, чем родительское антитело, которое содержит фукозу. Как правило, ADCC активность определяют с помощью анализа ADCC *in vitro*, как описано в настоящем описании, но также возможны другие анализы или методы определения активности ADCC, например на модели животного и т.д.

В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторной функции (функций) антитела. Например, одна или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, 330 и/или 331, могут быть заменены другим аминокислотным остатком таким образом, чтобы сродство антитела к эффекторному лиганду изменилось, но сохранилась антигенсвязывающая способность родительского антитела. Эффекторный лиганд, к которому изменяют сродство, может представлять собой, например, рецептор Fc или компонент C1 комплемента. Этот подход более подробно описан в патентах США №№ 5624821 и 5648260, авторами которых являются Winter et al.

В некоторых примерах одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322, можно заменить другим аминокислотным остатком с тем, чтобы изменить связывание C1q антителом и/или уменьшить или удалить комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) антитела. Этот подход более подробно описан Idusogie et al. в патенте США № 6194551.

В некоторых примерах один или более аминокислотных остатков в аминокислотных положениях 231 и 239 заменяют, чтобы тем самым изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход более подробно описан в публикации PCT WO 94/29351, Bodmer et al. В некоторых примерах Fc-фрагмент может быть модифицирован для уменьшения антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или для уменьшения сродства к рецептору Fcγ путем модификации одной или более аминокислот в следующих положениях: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 или 439. Примеры замен включают 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D и 332E. Примеры вариантов включают 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T и 267E/268F/324T. Другие модификации Fc, которые могут быть выполнены в Fcs, представ-

ляют собой модификации, которые уменьшают или устраняют связывание с FcγR и/или комплементарными белками, тем самым уменьшая или устраняя Fc-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC, ADCP и CDC. Примеры модификаций включают, без ограничения, замены, вставки и делеции в положениях 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325, 328, 330 и/или 331 (например, 330 и 331), согласно системе нумерации ЕС. Примеры замен включают, без ограничения, 234A, 235E, 236R, 237A, 267R, 269R, 325L, 328R, 330S и 331S (например, 330S и 331S), согласно системе нумерации ЕС. Вариант Fc может содержать 236R/328R. Другие модификации для уменьшения взаимодействия с FcγR и комплементом включают замены 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P и 234V, а также удаление участка гликозилирования в положении 297 с помощью мутации или ферментов или путем продуцирования в организмах, таких как бактерии, которые не гликозилируют белки. Обзор этих и других модификаций можно найти в Strohl, 2009, *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. Например, константный Fc-фрагмент человеческого IgG1.3 содержит замены L234A, L235E и G237A. IgG1fa.P238K (или IgG1.P238K) содержит замену P238K. IgG1.lf содержит замены L234A, L235E, G237A, A330S и P331S.

Также могут быть использованы варианты Fc, которые усиливают сродство к ингибирующему рецептору FcγRIIb. Такие варианты могут обеспечивать Fc-рекомбинантный белок с иммуномодулирующими активностями, сопоставимыми с таковыми у клеток с FcγRIIb, включая, например, В-клетки и моноциты. В одном из вариантов осуществления варианты Fc обеспечивают селективно повышенное сродство к FcγRIIb относительно одного или более активирующих рецепторов. Модификации для изменения связывания с FcγRIIb включают одну или более модификаций в положении, выбранном из группы, состоящей из 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328, 330, 331 и 332, согласно системе нумерации ЕС. Типичные замены для усиления сродства к FcγRIIb включают, без ограничения, 234A, 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235E, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237A, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267M, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328B, 328Y, 330S, 331S и 332E. Примеры замен включают 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W и 328Y. Другие варианты Fc для усиления связывания с FcγRIIb включают 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E и 267E/328F.

Другие модификации для усиления взаимодействия между FcγR и комплементом включают, без ограничения, замены 298A, 333A, 334A, 326A, 2471, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 3051 и 396L. Эти и другие модификации описаны Strohl, 2009, *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. Модификации Fc, которые усиливают связывание с рецептором Fcγ, включают модификации аминокислот в любом одном или более положениях аминокислот 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 280, 283, 285, 298, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 312, 315, 324, 327, 329, 330, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 379, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439 Fc-фрагмента, где нумерация остатков в Fc-фрагменте приведена согласно системе нумерации ЕС, как указано в публикации заявки на патент WO00/42072.

Необязательно, Fc-фрагмент может содержать не встречающийся в природе аминокислотный остаток в дополнительных и/или альтернативных положениях, известных специалисту в данной области (см., например, патенты США № 5624821; 6277375; 6737056; 6194551; 7317091; 8101720; публикации заявок РСТ на патент WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 и WO 06/020114).

Сродство и свойства связывания Fc-фрагмента с лигандом могут быть определены различными методами анализа *in vitro* (биохимическими или иммунологическими анализами), известными в данной области, включая, без ограничения, равновесные методы (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) или радиоиммуноанализ (RIA)), или кинетические (например, анализ BIACORE) и другие методы, такие как анализы непрямого связывания, анализы конкурентного ингибирования, флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). В этих и других способах можно использовать метку на одном или более исследуемых компонентах и/или использовать различные способы детектирования, включая, без ограничения, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание сродства и кинетики связывания можно найти у Paul, W.E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), в котором основное внимание уделяется взаимодействиям антитело-иммуноген.

В некоторых вариантах осуществления антитело модифицировано для увеличения его биологического периода полувыведения. Возможны разные подходы. Например, это может быть сделано путем увеличения сродства связывания Fc-фрагмента с FcRn. Например, один или более из следующих остатков могут быть мутированы: 252, 254, 256, 433, 435, 436, как описано в патенте США № 6,277,375. Конкретные примеры замен включают одну или более из следующих: T252L, T254S и/или T256F. Альтернативно, для увеличения биологического периода полувыведения антитело может быть изменено в области CH1 или CL таким образом, чтобы оно содержало эпитоп, связывающий рецептор реутилизации, взятый из двух петель домена CH2 Fc-фрагмента IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022,

Presta et al. Другие примеры вариантов, которые увеличивают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают замены в положениях 259, 308, 428 и 434, включая, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434I, 434F, 434Y и 434X1. Другие варианты, которые увеличивают связывание Fc с FcRn, включают: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Shields et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall'Acqua et al. *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al., 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524). Другие модификации для модуляции связывания FcRn описаны в Yeung et al., 2010, *J Immunol*, 182:7663-7671.

В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы гибридные изотипы IgG с конкретными биологическими характеристиками. Например, гибридный вариант IgG1/IgG3 может быть сконструирован путем замены положений в IgG1 в области CH2 и/или CH3 аминокислотами из IgG3 в положениях, в которых эти два изотипа различаются. Таким образом, может быть сконструирован гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или более замен, например, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, гибридный вариант IgG1/IgG2 может быть сконструирован путем замены аминокислот в положениях в IgG2 в области CH2 и/или CH3 аминокислотами из IgG1 в положениях, по которым эти два изотипа различаются. Таким образом, может быть сконструирован гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или более замен, например, одну или более из следующих аминокислотных замен: 233E, 234L, 235L, -236G (относится к вставке глицина в положении 236), и 327A.

Кроме того, были картированы участки связывания FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn в человеческом IgG1, и были описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields, RL et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Было показано, что специфические мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII. Также было показано, что следующие комбинированные мутанты улучшают связывание FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A, которые, как было продемонстрировано, усиливают связывание FcγRIIIa и активность ADCC (Shields et al., 2001). Были идентифицированы другие варианты IgG1 со значительно усиленным связыванием с FcγRIIIa, включая варианты с мутациями S239D/I332E и S239D/I332E/A330L, которые показали наибольшее увеличение сродства к FcγRIIIa, снижение связывания с FcγRIIIb и сильную цитотоксическую активность у яванского макака (Lazar et al., 2006). Введение тройных мутаций в антитела, такие как алемтузумаб (CD52-специфичный), трастузумаб (HER2/неу-специфичный), ритуксимаб (CD20-специфичный) и цетуксимаб (EGFR-специфичный), транслировали в сильно увеличенную активность ADCC *in vitro*, и вариант S239D/I332E показал повышенную способность истощать В-клетки у обезьян (Lazar et al., 2006). Кроме того, были идентифицированы мутанты IgG1, содержащие мутации L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L, которые демонстрировали усиленное связывание с FcγRIIIa и одновременно повышенную активность ADCC у трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий FcγRIIIa, на моделях В-клеточных злокачественных опухолей и рака молочной железы (Stavnhagen et al., 2007; Nordstrom et al., 2011). Другие мутанты Fc, которые можно использовать, включают: S298A/E333A/L334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L и M428L/N434S.

В некоторых вариантах осуществления выбирают Fc, который имеет пониженное связывание с FcγR. Типичный Fc, например Fc IgG1 с пониженным связыванием FcγR, содержит следующие три аминокислотные замены: L234A, L235E и G237A.

В некоторых вариантах осуществления выбирают Fc, который имеет пониженную фиксацию комплемента. Типичный Fc, например Fc IgG1 с пониженной фиксацией комплемента, имеет следующие две аминокислотные замены: A330S и P331S.

В некоторых вариантах осуществления выбирают Fc, который по существу не имеет эффекторную функцию, т.е. имеет пониженное связывание с FcγR и пониженную фиксацию комплемента. Типичный Fc, например Fc IgG1, который не имеет эффекторную функцию, содержит следующие пять мутаций: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S.

В случае использования константного домена IgG4 он может включать замену S228P, которая имитирует последовательность петли в IgG1 и тем самым стабилизирует молекулы IgG4.

Также могут быть использованы модификации Fc, описанные в WO 2017/087678 или WO2016081746.

В некоторых вариантах осуществления гликозилирование антитела является модифицированным. Например, можно получить агликозилированное антитело (т.е. антитело без гликозилирования). Гликозилирование может быть изменено, например, для увеличения сродства антитела к антигену. Такие модификации углеводов могут быть выполнены, например, путем изменения одного или более участков гликозилирования в последовательности антитела. Например, может быть введена одна или более аминокислотных замен, которые приводят к удалению одного или более участков гликозилирования в карбонильном участке вариабельной области, тем самым исключая гликозилирование в этом участке. Такое аг-

ликозилирование может увеличивать сродство антитела к антигену. Такой подход более подробно описан в патентах США №№ 5714350 и 6350861, Co et al.

Гликозилирование константной области в N297 можно предотвратить путем мутирования остатка N297 в другой остаток, например N297A, и/или путем мутирования соседней аминокислоты, например 298, тем самым снижая гликозилирование в N297.

Дополнительно или в качестве альтернативы, может быть получено антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенное количество фукозильных остатков, или антитело, имеющее увеличенные раздвоенные структуры GlcNac. Было показано, что такие измененные паттерны гликозилирования увеличивают способность антител индуцировать ADCC. Такие модификации углеводов могут быть выполнены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования описаны в данной области техники и могут использоваться в качестве клеток-хозяев, экспрессирующих рекомбинантные антитела, описанные в настоящем документе, тем самым продуцируя антитело с измененным гликозилированием. Например, EP 1176195, Hanai et al. описывает клеточную линию с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, так что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, являются гипофукозилированными. В публикации PCT WO 03/035835 Presta описан вариант клеточной линии CHO, клетки Led 3, с пониженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В публикации PCT WO 99/54342, Umana et al., описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), в результате чего антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, имеют повышенное количество раздвоенных структур GlcNac, что приводит к повышенной активности ADCC антитела (см. также Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

Другой модификацией антител, описанных в настоящем описании, является пегилирование. Антитело может быть пегилировано, например, для увеличения биологического (например, в сыворотке) периода полураспада антитела. Для пегилирования антитело или его фрагмент обычно подвергают взаимодействию с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособное эфирное или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, в которых одна или более групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. В некоторых вариантах осуществления пегилирование выполняют с помощью реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Используемый в настоящем описании термин "полиэтиленгликоль" включает любой из форм ПЭГ, которые используются для дериватизации других белков, например моно(Cl-CIO)алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В некоторых вариантах осуществления антитело, подлежащее пегилированию, представляет собой агликозилированное антитело. Способы пегилирования белков известны в данной области и могут применяться к антителам, описанным в настоящей заявке; см., например, EP 0154316, Nishimura et al., и EP 0401384, Ishikawa et al.

Нуклеиновые кислоты и клетки-хозяева.

Также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело или его тяжелую или легкую цепь или ее часть. Типичные нуклеиновые кислоты представлены в таблице последовательностей. Любая нуклеиновая кислота, которая составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% нуклеиновой кислоты, приведенной в таблице последовательностей, включена в настоящее описание. Также включены композиции, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, представленные в настоящем описании, а также клетки, содержащие их, и способы получения антител, включающие культивирование клетки, трансформированной нуклеиновой кислотой, кодирующей анти-VISTA антитело, и выделение антитела из среды или клетки.

Способы лечения с помощью VISTA-ECD-связывающих Ab и соответствующих фармацевтических композиций.

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело, которое связывается с VISTA при низком pH и, например, не демонстрирует значимого связывания при нейтральном или физиологическом pH, может быть антагонистическим антителом к VISTA, т.е. антителом, которое ингибирует действие VISTA настолько, что происходит стимуляция иммунного ответа. Такие антитела можно использовать для лечения заболеваний, при которых требуется стимуляция иммунной системы или иммунного ответа, таких как пролиферативные заболевания (доброкачественные или злокачественные), рак и инфекционные заболевания (например, вирусные инфекции).

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело, которое связывается с VISTA при низком pH и, например, не демонстрирует значимого связывания при нейтральном или физиологическом pH, может представлять собой агонистическое антитело к VISTA, т.е. антитело, которое усиливает действие VISTA настолько, что происходит подавление иммунного ответа. Такие антитела можно использовать для лечения заболеваний, при которых желательно подавить иммунную систему или иммунный от-

вет, таких как аутоиммунные заболевания и воспалительные состояния, такие как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, целиакия, синдром Шегрена, болезнь Грейвса, воспалительное заболевание кишечника, псориаз, анкилозирующий спондилит, болезнь "трансплантат-против-хозяина", аллергия и астма.

Раскрытые в настоящем описании антитела могут быть использованы, например, для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы лечения рака, включающие введение пациенту эффективного количества описанного в настоящем описании антитела. В некоторых вариантах осуществления Ab могут запускать или усиливать иммунный ответ у пациента, такой как антигенспецифический иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления Ab могут стимулировать активность Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления Ab могут ингибировать рост по меньшей мере одной опухоли у пациента.

В настоящем документе предлагаются способы лечения индивида, страдающего раком, включающие введение индивиду терапевтически эффективного количества описанного в настоящем описании анти-VISTA антитела такого, что происходит лечение индивида. Анти-VISTA антитело можно использовать отдельно. Альтернативно, анти-VISTA антитело можно использовать в комбинации с другим агентом, что более подробно описано ниже.

Примеры раковых заболеваний, которые можно лечить с помощью Ab, специфически связывающегося с белком VISTA-ECD в кислых условиях, как описано в настоящем описании, включают, без ограничения, рак, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Раковые заболевания, которые можно лечить с помощью описанного в настоящем описании Ab также включают раковые заболевания, обычно реагирующие на иммунотерапию, и те, которые обычно не реагируют на иммунотерапию. Раковые заболевания, которые можно лечить, также включают VISTA-положительные раковые заболевания, например, раковые заболевания, имеющие VISTA-положительные инфильтрирующие опухоль клетки, например лимфоциты, миелоидные или моноцитарные клетки. Раковые заболевания могут представлять собой раковые заболевания с солидными опухолями или злокачественными новообразованиями крови (опухолями жидких тканей).

Неограничивающие примеры злокачественных заболеваний для лечения включают плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), неквадратный NSCLC, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, почечный рак (например, светлоклеточную карциному), рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки (например, почечно-клеточный рак (RCC)), рак простаты (например, гормонорефрактерную аденокарциному простаты), рак щитовидной железы, нейробластому, рак поджелудочной железы, глиобластому (мультиформную глиобластому), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки и рак головы и шеи (или карциному), опухоли желудка, опухоли из зародышевых клеток, детскую саркому, синоназальные новообразования из натуральных киллеров, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как кожная или внутриглазная злокачественная меланому), рак костей, рак кожи, рак матки, рак анальной области, рак яичка, карциному маточных труб, рак эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, карциному пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, солидные опухоли у детей, рак мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоли вдоль оси позвоночника, рак головного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, раковые заболевания, индуцированные окружающей средой, включая раковые заболевания, вызванные асбестом, вирусные раковые заболевания или раковые заболевания, инициированные вирусом (например, вирусом папилломы человека (HPV-связанные или -инициированные опухоли)), и гематологические злокачественные новообразования, происходящие из любой из двух основных линий клеток крови, т.е. линии миелоидных клеток (которая продуцирует гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и мастоциты) или линии лимфоидных клеток (которая продуцирует В, Т, NK и плазматические клетки), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например, острые, хронические, лимфоцитарные и/или миелогенные лейкозы, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелогенный лейкоз (CML), недифференцированный AML (МО), миелобластный лейкоз (ML), миелобластный лейкоз (M2; с созревaniem клеток), промиелоцитарный лейкоз (вариант M3 или вариант M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз, изолированная гранулоцитарная саркома и хлорома; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточное гематологическое новообразование, например, В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазматическая лимфома, моноцитотидная В-клеточная лимфома, лимфома лимфоидных тканей, ассоциированных со слизистыми оболочками (MALT), анапластическая (например, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкемия взрослых, лимфома мантийных клеток, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, кишечная Т-клеточная

лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома из предшественников Т-клеток, Т-лимфобластная; и лимфома/лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическую Т-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, истинную гистиоцитарную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную диффузионную лимфому, В-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому (LBL), гематопозитические опухоли лимфоидного происхождения, острый лимфобластный лейкоз, диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную гистиоцитарную лимфому (DHL), крупноклеточную иммунобластную лимфому, В-клеточную лимфобластную лимфому, кожную Т-клеточную лимфому (CTLC) (также называемую грибовидным микозом или синдромом Сезари) и лимфоплазматическую лимфому (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как миелома IgG, миелома легких цепей, несекреторная миелома, тлеющая миелома (также называемая индолентной миеломой), солитарная плазматическая и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфома волосковых клеток; гематопозитические опухоли миелоидного происхождения, опухоли мезенхимного происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; саркомы, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, саркомы, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному, гематопозитические опухоли лимфоидной линии, например Т-клеточные и В-клеточные опухоли, включая, без ограничения, Т-клеточные нарушения, такие как Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), включая мелкоклеточный и церебриформный тип клеток; лейкоз из крупных гранулярных лимфоцитов (LGL) Т-клеточного типа; а/д Т-NHL гепатоспленальную лимфому; периферическую/пост-тимусную Т-клеточную лимфому (плеоморфный и иммунобластный подтипы); ангиоцентрическую (назальную) Т-клеточную лимфому; рак головы или шеи, рак почки, рак прямой кишки, рак щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных раковых заболеваний. Способы, раскрытые в настоящем описании, также можно использовать для лечения метастатического рака, неоперабельных, резистентных раковых заболеваний (например, раковых заболеваний, невосприимчивых к предыдущей иммунотерапии, например, с помощью антитела блокирующего рецептор CTLA-4 или PD-1) и/или рецидивирующих раковых заболеваний.

В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения злокачественного новообразования, включающие введение индивиду, страдающему онкологическим заболеванием, выделенного антитела, которое специфически связывается с huVISTA в кислых условиях, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления представлено применение антитела, описанного в настоящем описании, для лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящем описании антитело вводят пациентам, страдающим злокачественным заболеванием, который проявляет неадекватный ответ на предшествующее лечение, или прогрессирует после предшествующего лечения, например предшествующего лечения иммуноонкологическим или иммунотерапевтическим препаратом. В некоторых вариантах осуществления рак является резистентным или устойчивым к предшествующему лечению, либо резистентным или устойчивым по своей природе (например, устойчивым к антагонисту пути PD-1), либо становится устойчивым или резистентным. Например, антитело, описанное в настоящем описании, можно вводить индивиду, которые не реагируют или демонстрируют недостаточный ответ на первое терапевтическое лечение или у которых наблюдается прогрессирование заболевания после лечения, например, лечения антагонистом сигнального пути PD-1, отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом (например, терапии антагонистом сигнального пути PD-1). В других вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем описании, вводят пациентам, которые ранее не получали (т.е. не подвергались лечению) иммуноонкологический агент, например антагонист пути PD-1.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения злокачественного новообразования у индивида включает сначала определение мутационного бремени опухоли (ТМВ) у индивида и введение анти-VISTA антитела на основании результатов, например индивиду, которые определены, как имеющие опухоль с высоким ТМВ.

Комбинации с иммуностимулирующими агентами.

В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в настоящем описании, например антагонистическое антитело к VISTA, раскрытое в настоящем описании, вводят в комбинации с и по меньшей мере одним иммуностимулирующим агентом. Например, терапевтические агенты могут вводиться вместе или примерно в одно и то же время. В некоторых вариантах осуществления антитело и по меньшей мере один иммуностимулирующий агент вводят последовательно. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело вводят последовательно до или после введения по меньшей мере одного иммуностимулирующего агента таким образом, что два введения терапевтических агентов происходит с разницей по времени в 30 мин, 60 мин, 90 мин, 120 мин, 3 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч, 3 дня, 5 дней, 7 дней или две недели.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей

мере три дозы, по меньшей мере пять доз или по меньшей мере десять доз антитела вводят до введения по меньшей мере одного иммуностимулирующего агента. В некоторых вариантах осуществления перед введением антитела вводят по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три дозы, по меньшей мере пять доз или по меньшей мере десять доз по меньшей мере одного иммуностимулирующего агента. В некоторых вариантах осуществления последнюю дозу иммуностимулирующего агента вводят по меньшей мере за один, два, три, пять или десять дней или одну, две, три, пять, двенадцать или двадцать четыре недели до введения первой дозы антитела. В некоторых вариантах осуществления последнюю дозу антитела вводят по меньшей мере за один, два, три, пять или десять дней или одну, две, три, пять, двенадцать или двадцать четыре недели до введения первой дозы по меньшей мере одного иммуностимулирующего агента. В некоторых вариантах осуществления индивид получал или получает терапию по меньшей мере одним иммуностимулирующим агентом, и VISTA-ECD-связывающее антитело добавляют к терапевтическому режиму.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один иммуностимулирующий агент содержит антагонист ингибитора активации Т-клеток, при этом в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один иммуностимулирующий агент содержит агонист стимулятора активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один иммуностимулирующий агент содержит антагонист CTLA4, LAG-3, PD-1, PD-L1, галектина 1, галектина 9, CEACAM-1, BTLA, CD25, CD69, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM1, TIM3, TIM4, ILT4, IL-6, IL-10, TGF β , VEGF, KIR, LAG-3, аденозинового рецептора A2A, PI3Kdelta или IDO. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один иммуностимулирующий агент содержит агонист B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD27, CD40, CD40L, DR3, CD28H, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, IFN α , STING или агонист Toll-подобного рецептора, такой как агонист TLR2/4. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один иммуностимулирующий агент содержит агент, который связывается с другим членом семейства мембраносвязанных белков B7, таким как B7-1, B7-2, B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4 и B7-H6. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один иммуностимулирующий агент содержит агент, который связывается с членом семейства рецепторов TNF, или костимулирующую или коингибирующую молекулу, связывающуюся с членом семейства рецепторов TNF, таким как CD40, CD40L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137 (4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, EDA1, EDA2, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DeR3, HVEM, VEGF/TL1A, TRAMP/DR3, TNFR1, TNF β , TNFR2, TNF α , 1 β 2, FFA FASL, RELT, DR6, TROY или NGF β . В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один иммуностимулирующий агент содержит агент, который противодействует или ингибирует активность цитокина, ингибирующего активацию Т-клеток, такого как IL-6, IL-10, TGF β , VEGF. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один иммуностимулирующий агент содержит агонист цитокина, стимулирующего активацию Т-клеток, такого как IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 и IFN α . В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один иммуностимулирующий агент содержит антагонист хемокина, такой как CXCR2, CXCR4, CCR2 или CCR4. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один иммуностимулирующий агент содержит антитело. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один иммуностимулирующий агент может содержать вакцину, такую как вакцина, направленная на мезотелин, или противораковую вакцину аттенуированной листерии, такую как CRS-207.

Например, анти-VISTA антитело, раскрытое в настоящем описании, можно вводить с одним или более из следующих агентов:

(1) антагонистом (ингибитором или блокирующим агентом) белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибитором иммунной контрольной точки), таким как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 и LAG-3, галектин 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-3 и TIM-4; и/или (2) агонистом белка, который стимулирует активацию Т-клеток, таким как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

Типичные агенты, которые можно комбинировать с анти-VISTA антителами, раскрытыми в настоящем описании, для лечения рака, включают: YERVOY® (ипилимумаб) или тремелиумаб (для CTLA-4), галиксимаб (для B7.1), BMS-936558 (для PD-1), MK-3475 (для PD-1), атезолизумаб (TECEN-TRIQ®), авелумаб, дурвалумаб, AMP224 (для B7DC), BMS-936559 (для B7-H1), MPDL3280A (для B7-H1), MEDI-570 (для ICOS), AMG557 (для B7H2), MGA271 (для B7H3), IMP321 (для LAG-3), BMS-663513 (для CD137), PF-05082566 (для CD137), CDX-1127 (для CD27), анти-OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (для OX40L), атацицепт (для TACI), CP-870893 (для CD40), лукатумумаб (для CD40), дацетумаб (для CD40), муромонаб-CD3 (для CD3); анти-GITR антитела MK4166, TRX518, Medi1873, INBRX-110, LK2-145, GWN-323, GITRL-Fc или любую их комбинацию.

Другие молекулы, которые можно комбинировать с анти-VISTA антителами для лечения рака, включают антагонисты ингибирующих рецепторов на NK-клетках или агонисты активирующих рецеп-

торов на NK-клетках, например, антагонисты KIR (например, лирилумаб).

Активацию Т-клеток также можно регулировать с помощью растворимых цитокинов. В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитела можно вводить в комбинации с антагонистами цитокинов, которые предназначены для ингибирования активации Т-клеток, или агонистами цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток. Например, анти-VISTA антитела можно использовать в комбинации с (i) антагонистами (или ингибиторами или блокирующими агентами) белков семейства IgSF или семейства B7 или семейства TNF, которые ингибируют активацию Т-клеток, или антагонистов цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF; "иммуносупрессивных цитокинов"), и/или (ii) агонистами стимулирующих рецепторов семейства IgSF, семейства B7 или семейства TNF или цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток.

Другие агенты для комбинированной терапии включают агенты, которые ингибируют или истощают макрофаги или моноциты, включая, без ограничения, антагонисты CSF-1R, такие как антитела-антагонисты CSF-1R, включая RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) или FPA-008 (WO11/140249; WO13169264; WO14/036357).

Анти-VISTA антитела также можно вводить с агентами, которые ингибируют передачу сигналов TGF- β .

Дополнительные агенты, которые можно комбинировать с анти-VISTA антителом, включают агенты, которые усиливают презентацию опухолевого антигена, например, вакцины на основе дендритных клеток, вакцины на основе клеток, секретирующих GM-CSF, олигонуклеотиды CpG и имиквимод, или терапевтические агенты, которые усиливают иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины).

Другие терапевтические агенты, которые можно комбинировать с анти-VISTA антителом, включают терапевтические агенты, которые истощают или блокируют клетки Treg-клетки, например, агент, которое специфически связывается с CD25.

Другой терапевтический агент, который можно комбинировать с анти-VISTA антителом, является терапевтическим агентом, который ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназу (IDO), диоксигеназу, аргиназу или синтетазу оксида азота.

Другой класс агентов, которые можно использовать с анти-VISTA антителом, включает агенты, которые ингибируют образование аденозина, например ингибиторы CD73, или ингибируют рецептор аденозина A2A.

Другие терапевтические агенты, которые можно комбинировать с анти-VISTA антителом для лечения рака, включают терапевтические агенты, которые устраняют/предотвращают анемию или истощение Т-клеток, и терапевтические агенты, которые запускают активацию врожденной иммунной системы и/или воспаление в месте опухоли.

Другие терапевтические агенты, которые можно комбинировать с анти-VISTA антителом для лечения рака, включают терапевтические агенты, блокирующие IL-8, например HuMax®-IL8.

Анти-VISTA антитело может быть объединено с более чем одним иммуноонкологическим агентом и может быть объединено, например, с комбинаторным подходом, предназначенным для нацеливания на несколько элементов иммунного пути, таким как один или более из следующих: терапевтический агент, который усиливает презентацию опухолевого антигена (например, вакцина из дендритных клеток, вакцины на основе клеток, секретирующих GM-CSF, олигонуклеотиды CpG, имиквимод); терапевтический агент, который ингибирует негативную иммунную регуляцию, например, путем ингибирования пути CTLA-4 и/или PD1/PD-L1/PD-L2 и/или истощения или блокирования Treg-клеток или других иммуносупрессивных клеток; терапевтический агент, который стимулирует положительную иммунную регуляцию, например, агонисты, которые стимулируют пути CD-137, OX-40 и/или CD40 или GITR и/или стимулируют эффекторную функцию Т-клеток; терапевтический агент, который системно увеличивает частоту противоопухолевых Т-клеток; терапевтический агент, который истощает или ингибирует Treg-клетки, такие как Treg-клетки в опухоли, например, с помощью антагониста CD25 (например, даклизумаба) или путем истощения *ex vivo* с помощью анти-CD25 шариков; терапевтический агент, который влияет на функцию супрессорных миелоидных клеток в опухоли; терапевтический агент, который усиливает иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины); перенос адоптивных Т-клеток или NK-клеток, включая генетически модифицированные клетки, например клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами (терапия CAR-T); терапевтический агент, который ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназу (IDO), диоксигеназу, аргиназу или синтетазу оксида азота; терапевтический агент, который устраняет/предотвращает анемию или истощение Т-клеток; терапевтический агент, который вызывает активацию врожденного иммунитета и/или воспаление в месте опухоли; введение иммуностимулирующих цитокинов; или блокирование иммунорепрессивных цитокинов.

Раскрытые в настоящем описании анти-VISTA антитела можно использовать вместе с одним или более агонистическими агентами, которые лигируют позитивные костимуляторные рецепторы, блокирующими агентами, которые ослабляют передачу сигналов через ингибирующие рецепторы, антаго-

стами и одним или более агентами, которые системно увеличивают частоту противоопухолевых Т-клеток, агентами, которые преодолевают различные иммуносупрессивные пути в микроокружении опухоли (например, блокируют рекрутирование ингибирующего рецептора (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют Treg-клетки (например, с помощью моноклонального антитела к CD25 (например, даклизумаба)) или путем *ex vivo* истощения с помощью анти-CD 25 гранул), ингибируют метаболические ферменты, такие как H₂O, или устраняют/предотвращают анемию или истощение Т-клеток) и агенты, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаление в местах опухоли.

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело вводят индивиду вместе с ингибитором BRAF, если индивид является положительным по мутации BRAF V600.

Антагонисты PD-1, подходящие для применения в раскрытой в настоящем описании комбинированной терапии включают, без ограничения, лиганды, антитела (например, моноклональные антитела и биспецифические антитела) и поливалентные агенты. В одном из вариантов осуществления антагонист PD-1 представляет собой рекомбинантный белок, например Fc-рекомбинантный белок, такой как AMP-244. В одном из вариантов осуществления антагонист PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или к PD-L1.

Типичным антителом к PD-1 является ниволумаб (BMS-936558) или антитело, которое содержит CDR или вариабельные области одного из антител 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 и 4A11, описанных в WO 2006/121168. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой МК-3475 (ламбролизумаб), описанное в WO2012/145493; AMP-514, описанное в WO 2012/145493; или PDR001. Другие известные антитела к PD-1 и другие ингибиторы PD-1 включают агенты, описанные в WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, патентах США № 7635757 и 8217149 и публикации заявки на патент США № 2009/0317368. Также может быть использовано любое из антител к PD-1, раскрытых в WO2013/173223. Антитело к PD-1, которое конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-1, что и одно из этих антител, также можно использовать в комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1, применимое в комбинированной терапии, представляет собой BMS-936559 (обозначенное как 12A4 в WO 2007/005874 и патенте США № 7943743) или антитело, которое содержит CDR или вариабельные области 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, которые описаны в PCT публикации WO 07/005874 и патенте США № 7943743. В определенном варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (также известное как дурвалумаб и анти-B7-H1), MPDL3280A (также известное как атезолизумаб и RG7446), MSB0010718C (также известное как авелумаб; WO2013/79174) или gHigM12B7. Также может быть использовано любое из антител к PD-L1, раскрытых в WO2013/173223, WO2011/066389, WO2012/145493, патентах США №№ 7635757 и 8217149 и публикации заявки на патент США № 2009/145493. Антитела к PD-L1, которые конкурируют и/или связываются с тем же эпитопом, что и любое из этих антител, также можно использовать в комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело по изобретению может быть использовано с антагонистом CTLA-4, например анти-CTLA-4 антителом. В одном из вариантов осуществления анти-CTLA-4 антитело представляет собой антитело, выбранное из группы: YERVOY® (ипилимумаб или антитело 10D1, описанное в PCT публикации WO 01/14424), тремелимумаб (ранее известное как тицилимумаб, CP-675,206), моноклональное или анти-CTLA-4 антитело, описанное в любой из следующих публикаций: WO 98/42752; WO 00/37504; патенте США № 6207156; Hurwitz et al. (1998) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 95(17): 10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Abstract No. 2505 (антитело CP-675206); и Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304. Также может быть использовано любое из анти-CTLA-4 антител, раскрытых в WO2013/173223.

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело по изобретению используется в комбинации с антагонистом LAG3. Примеры анти-LAG3 антител включают антитела, содержащие CDR или вариабельные области антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, которые описаны в публикации заявки на патент США №№ US2011/0150892, WO10/19570 и WO2014/008218. В одном из вариантов осуществления анти-LAG-3 антитело представляет собой BMS-986016. Другие известные в данной области анти-LAG-3 антитела, которые можно использовать, включают IMP731 и IMP-321, описанные в US 2011/007023, WO08/132601 и WO09/44273. Анти-LAG-3 антитела, которые конкурируют и/или связываются с тем же эпитопом, что и любой из этих антител, также можно использовать в комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело по изобретению может быть введено в комбинации с агонистом CD137 (4-1BB), таким как агонистическое антитело к CD137. Подходящие анти-CD137 антитела включают, например, урелумаб или PF-05082566 (WO12/32433).

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело можно вводить в комбинации с агонистом OX40, таким как агонистическое антитело к OX40. Подходящие анти-OX40 антитела включают, например, MEDI-6383, MEDI-6469 или MOXR0916 (RG7888; WO06/029879).

В одном из вариантов осуществления анти-VISTA антитело вводят в комбинации с агонистом

CD40, таким как агонистическое антитело к CD40. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой антагонист CD40, такой как антагонистическое антитело к CD40. Подходящие анти-CD40 антитела включают, например, люкатумумаб (HCD122), дацетузумаб (SGN-40), CP-870,893 или Chi Lob 7/4.

В одном из вариантов осуществления анти-VISTA антитело вводят в комбинации с агонистом CD27, таким как антитело-агонист к CD27. Подходящие анти-CD27 антитела включают, например, варилумаб (CDX-1127).

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело вводят вместе с анти-GITR антителом, например антителом, имеющим последовательности CDR 6C8, например гуманизированным антителом, имеющим CDR 6C8, описанным, например, в WO 2006/105021; антителом, содержащим CDR анти-GITR антитела, описанного в WO 2011/028683; антителом, содержащим CDR анти-GITR антитела, описанного в JP2008278814, антителом, содержащим CDR анти-GITR антитела, описанного в WO2015/031667, WO2015/187835, WO2015/184099, WO2016/054638, WO2016/057841 или WO2016/057846, или другим анти-GITR антителом, описанным или упомянутым в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело вводят в комбинации с MGA271 (к B7H3) (WO11/109400).

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело вводят в комбинации с антагонистом KIR, таким как лирилумаб.

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело вводят в комбинации с антагонистом IDO. Подходящие антагонисты IDO включают, например, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), индоксимод, NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) или F001287.

В некоторых вариантах осуществления анти-VISTA антитело вводят в комбинации с агонистом Toll-подобного рецептора, например, агонистом TLR2/4 (например, Bacillus Calmette-Guerin); агонистом TLR7 (например, хилтонолом или имиквимодом); агонистом TLR7/8 (например, резиквимодом); или агонистом TLR9 (например, CpG7909).

В одном из вариантов осуществления анти-VISTA вводят в комбинации с ингибитором TGF- β , например, GC1008, LY2157299, TEW7197 или IMC-TR1.

Дополнительная комбинированная терапия.

Раскрытые в настоящем описании Ab также могут быть введены до, по существу одновременно или после применения других режимов лечения, например, хирургического вмешательства, химиотерапии, лучевой терапии или введения биологического средства, такого как другое терапевтическое антитело. В некоторых вариантах осуществления рак рецидивировал или прогрессировал после терапии, выбранной из хирургического вмешательства, химиотерапии и лучевой терапии или их комбинации. Например, раскрытое в настоящем описании анти-VISTA антитело можно вводить в качестве дополнительной терапии, когда существует риск наличия микрометастазов и/или для снижения риска рецидива.

Для лечения рака можно вводить комбинации в сочетании с одним или более дополнительными противораковыми агентами, такими как химиотерапевтический агент, агент, ингибирующий рост, противораковая вакцина, такая как вакцина для генной терапии, анти-ангиогенный агент и/или противоопухолевая композиция. Неограничивающие примеры химиотерапевтического агента, агента, ингибирующего рост, противораковой вакцины, анти-ангиогенного агента и противоопухолевой композиции, которые можно использовать в комбинации с антителами по настоящему изобретению, представлены в настоящем описании в разделе "Определения".

В некоторых вариантах осуществления можно вводить комбинацию с противовоспалительным лекарственным веществом, таким как стероидное или нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (NSAID). В случаях, когда желательно перевести aberrантно пролиферативные клетки в покойное состояние пациенту можно также вводить в комбинации или до лечения раскрытыми в настоящем описании анти-VISTA антителами гормоны и стероиды (включая синтетические аналоги), такие как 17 α -этинилэстрадиол, диэтилstilбестрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, дромостанолон пропионат, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метил-тестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортиазинен, гидроксипрогестерон, аминоклутетимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, леупролид, флутамид, торемифен, ZOLADEx®. При использовании способов или композиций, раскрытых в настоящем описании, в клинических условиях при необходимости также можно вводить другие агенты, используемые для модуляции роста опухоли или метастазирования, такие как антимиметики.

Раскрытые в настоящем описании антитела также можно комбинировать с иммуногенным агентом, таким как злокачественные клетки, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al., (2004) J. Immunol. 173:4919-28). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно использовать, включают пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназу, или опухолевые клетки, трансфи-

цированные для экспрессии цитокина GM-CSF (обсуждается ниже).

Было показано, что у людей некоторые опухоли являются иммуногенными, такие как меланомы. При снижении порога активации Т-клеток путем ингибирования VISTA можно активировать опухолевые реакции у хозяина, что позволяет лечить неиммуногенные опухоли или опухоли с ограниченной иммуногенностью.

Раскрытое в настоящем описании анти-VISTA антитело также можно комбинировать с протоколом вакцинации. Было разработано много экспериментальных стратегий вакцинации против опухолей (см. Rosenberg S., 2000 г., "Development of Cancer Vaccines", ASCO Education Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000 г., учебная книга ASCO Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Education Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; см. также Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043, DeVita et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition). В соответствии с одной из этих стратегий, вакцину готовят с использованием аутологических или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что эти клеточные вакцины наиболее эффективны, когда опухолевые клетки трансдуцированы для экспрессии GM-CSF. Было показано, что GM-CSF является сильным активатором презентации антигена для противоопухолевой вакцинации (Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 90:3539-43).

Изучение экспрессии генов и крупномасштабных паттернов экспрессии генов в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифических антигенов (Rosenberg, S.A. (1999) Immunity 10:281-7). Во многих случаях эти опухолеспецифические антигены являются антигенами дифференцировки, экспрессируемыми в опухолях и в клетке, из которой возникла опухоль, например, антигенами меланоцитов gp100, антигенами MAGE и Trp-2. Более важной является возможность демонстрации того, что многие из этих антигенов являются мишенями опухолеспецифических Т-клеток, обнаруженных у хозяина. Ингибирование VISTA можно использовать в сочетании с коллекцией рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессируемых в опухоли, для создания иммунного ответа на эти белки. Эти белки обычно рассматриваются иммунной системой как собственные антигены и, следовательно, она является толерантной по отношению к ним. Опухолевый антиген может включать белок теломеразу, который необходим для синтеза теломер хромосом и который экспрессируется более чем в 85% случаев рака человека и только в ограниченном количестве соматическими тканями (Kim et al. (1994) Science 266:2011-2013). Опухолевый антиген также может быть "неоантигеном", экспрессируемым в раковых клетках из-за соматических мутаций, которые изменяют белковую последовательность или создают слитые белки между двумя неродственными последовательностями (т.е. bcr-abl в хромосоме Филадельфии), или идиотипом из В-клеточных опухолей.

Другие противоопухолевые вакцины могут включать белки вирусов, вовлеченных в злокачественных заболевания человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус саркомы Капоши (KHSV). Другой формой опухолеспецифического антигена, которую можно использовать в сочетании с ингибированием VISTA, являются очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и эти HSP являются очень эффективными при доставке в антигенпрезентирующие клетки для индуцирования противоопухолевого иммунитета (Suot & Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) Science 278:117-120).

Дендритные клетки (DC) являются мощными антигенпрезентирующими клетками, которые можно использовать для инициации антигенспецифических ответов. DC могут быть получены ex vivo и нагружены различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4:328-332). DC также могут быть трансдуцированы генетическими способами для экспрессии этих опухолевых антигенов. Также осуществляли слияние DC непосредственно с опухолевыми клетками для целей иммунизации (Kugler et al. (2000) Nature Medicine 6:332-336). В качестве метода вакцинации, иммунизацию DC можно эффективно комбинировать с ингибированием VISTA для активации более сильных противоопухолевых ответов.

Лечение инфекционных заболеваний.

Описанные в настоящей заявке способы также могут быть использованы для лечения пациентов, которые подверглись воздействию конкретных токсинов или патогенов. Соответственно, настоящее изобретение также относится к способам лечения инфекционного заболевания у индивида, включающим введение индивиду раскрытого в настоящем описании антитела, например, антагонистического антитела к VISTA, для лечения инфекционного заболевания у индивида. Подобно его применению к опухолям, как обсуждалось выше, опосредуемое антителами ингибирование VISTA можно использовать отдельно или в качестве адъюванта в сочетании с вакцинами для стимуляции иммунного ответа на патогены, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, в отношении которых этот терапевтический подход может быть особенно полезен, включают патогены, для которых в настоящее время отсутствуют эффективные вакцины, или патогены, для которых обычные вакцины не являются эффективными. К ним относятся, помимо прочего, ВИЧ-инфекция, гепатит (A, B и C), грипп, герпес, Giardia, малярия, лейшмания, золотистый стафилококк, Pseudomonas aeruginosa. Ингибирование VISTA может оказаться полезным для лечения агентами установленных инфекций, таких как ВИЧ, которые презентуют измененные антигены в ходе инфекций.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, которые можно лечить описанными в настоящем описании способами, включают ВИЧ, гепатит (А, В или С), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, Вирус Эпштейна-Барра), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, вирус HTLV, вирус денге, вирус папилломы, вирус molluscum, полиовирус, вирус бешенства, вирус JC и вирус арбовирусного энцефалита.

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, которые можно лечить раскрытыми в настоящем описании способами, включают хламидиоз, риккетсиозную бактерию, микобактерию, стафилококк, стрептококк, пневмококк, менингококк и гонококк, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Legionella*, дифтерию, сальмонеллы, микобактерию, холеру, столбняк, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспироз и бактерии болезни Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, которые можно лечить раскрытыми в настоящем описании способами, включают *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т.д.), род *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, которые можно лечить раскрытыми в настоящем описании способами, включают *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Tripanosoma brucei*, *Tripanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* и *Nippostrongylus brasiliensis*.

Во всех вышеописанных способах ингибирование VISTA можно сочетать с другими формами иммунотерапии, например, описанными в настоящем описании, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2) или терапией биспецифическими антителами, что может обеспечить улучшенную презентацию опухолевых антигенов (см., например, Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123).

Способы введения и носители.

В различных вариантах осуществления антитела могут вводиться *in vivo* различными путями, включая, без ограничения, перорально, внутриартериально, парентерально, интраназально, внутримышечно, внутрисердечно, интравентрикулярно, интратрахеально, буккально, ректально, интраперитонеально, внутрикожно, местно, трансдермально и интратекально, или иным способом путем имплантации или ингаляции. Композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде лекарственных форм в твердом, полутвердом, жидком или газообразном виде; включая, без ограничения, таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, клизмы, инъекции, формы для ингаляции и аэрозоли. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело, может быть нанесена на золотые микрочастицы и доставлена внутрикожно с помощью устройства для бомбардировки частицами или "генной пушки", как описано в литературе (см., например, Tang et al., Nature 356:152-154 (1992)). Соответствующий состав и способ введения могут быть выбраны в соответствии с предполагаемым применением.

В различных вариантах осуществления композиции, содержащие антитела, предоставляют в составах с широким разнообразием фармацевтически приемлемых носителей (см., например, Gennaro, Remington: Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)). Доступны различные фармацевтически приемлемые носители, которые включают несущую среду, адъюванты и разбавители. Кроме того, также доступны различные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как регуляторы pH и буферные агенты, регуляторы тоничности, стабилизаторы, смачивающие агенты и т.п. Неограничивающие примеры носителей включают физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации.

В различных вариантах осуществления композиции, содержащие антитела, могут быть приготовлены для инъекции, включая подкожное введение, путем растворения, суспендирования или эмульгирования их в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот, или пропиленгликоль; и, необязательно, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы, регуляторы тоничности, суспендирующие агенты, эмульгирующие агенты, стабилизаторы и консерванты. В различных вариантах осуществления композиции могут быть приготовлены для ингаляции, например, с использованием приемлемых пропеллентов под давлением, таких как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п. В различных вариантах осуществления композиции также могут быть приготовлены в виде микрокапсул с замедленным высвобождением, таких как биоразлагаемые или небiorазлагаемые полимеры. Неограничивающий пример биоразлагаемого состава включает полимер поли(молочная-со-глицолевая кислота). Неограничивающий пример небiorазлагаемого состава включает сложный эфир полиглицерина и жирной кислоты. Некоторые способы приготовления таких составов описаны, например, в EP 1155584 A1.

Также предоставляются фармацевтические упаковки и наборы, содержащие один или более контейнеров, каждый из которых содержит одну или более доз антитела или комбинаций антител. В некоторых вариантах осуществления предоставляется единичная дозировка, содержащая заданное количество композиции, содержащей антитело или комбинацию антител с одним или более дополнительными агентами или без них. В некоторых вариантах осуществления такая единичная дозировка поставляется в заполненном шприце для инъекций одноразового использования. В различных вариантах осуществления композиция, содержащаяся в единичной дозировке, может содержать физиологический раствор, сахарозу или т.п.; буфер, такой как фосфатный или т.п.; и/или может быть приготовлена в стабильном и эффективном диапазоне pH. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления композиция может быть представлена в виде лиофилизированного порошка, который может быть восстановлен путем добавления подходящей жидкости, например, стерильной воды. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит одно или более веществ, которые подавляют агрегацию белка, включая, без ограничения, сахарозу и аргинин. В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению содержит гепарин и/или протеогликан.

Фармацевтические композиции вводят в количестве, эффективном для лечения или профилактики конкретного показания. Терапевтически эффективное количество обычно зависит от веса индивида, получающего лечение, его или ее физического состояния или состояния здоровья, степени тяжести состояния, подлежащего лечению, или возраста индивида, получающего лечение. Обычно антитела можно вводить в количестве от примерно 10 мкг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 50 мкг/кг массы тела до примерно 5 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 100 мкг/кг массы тела до примерно 10 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 100 мкг/кг массы тела до примерно 20 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в количестве от примерно 0,5 мг/кг массы тела до примерно 20 мг/кг массы тела на дозу.

Композиции антител можно вводить индивидам при необходимости. Специалисты в данной области, например лечащий врач, могут определить частоту введения, исходя из информации о состоянии, подлежащего лечению, возрасте индивида, получающего лечение, тяжести состояния, подлежащего лечению, общего состояния здоровья пациента, получающего лечение, и т.п. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу антитела вводят индивиду один или более раз. В различных вариантах осуществления эффективную дозу антитела вводят индивиду один раз в месяц, реже одного раза в месяц, например, каждые два месяца или каждые три месяца. В других вариантах осуществления эффективную дозу антитела вводят более одного раза в месяц, например, каждые три недели, каждые две недели или каждую неделю. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу антитела вводят один раз в 1, 2, 3, 4 или 5 недель. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу антитела вводят два или три раза в неделю. Эффективную дозу антитела вводят индивиду по меньшей мере один раз. В некоторых вариантах осуществления эффективная доза антитела может вводиться несколько раз, включая в течение периода, например, по меньшей мере одного месяца, по меньшей мере шести месяцев или по меньшей мере года.

В некоторых вариантах осуществления комбинация анти-VISTA антитела и второго агента, обсуждаемого в настоящем описании, может вводиться одновременно в виде одной композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций анти-VISTA антитела и второго агента в фармацевтически приемлемом носителе. В одном из вариантов осуществления комбинацию анти-VISTA антитела и второго агента можно вводить последовательно. Введение двух агентов можно начинать с разницей во времени, например, в 30 мин, 60 мин, 90 мин, 120 мин, 3 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч, 3 дня, 5 дней, 7 дней или одну или более недель, или прием второго агента можно начинать, например, через 30 мин, 60 мин, 90 мин, 120 мин, 3 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч, 3 дней, 5 дней, 7 дней или одной или более недель после введения первого агента.

Методы идентификации связывания hVISTA-ECD Ab при низком pH.

В настоящем описании также представлены способы идентификации Ab, которые специфически связываются с белком VISTA-ECD в кислых (или при низком pH) условиях. В некоторых вариантах осуществления способ идентификации Ab, который специфически связывается с белком VISTA-ECD при pH 6,5 или менее, включает контактирование тестируемого Ab или множества тестируемых Ab с белком VISTA-ECD при pH 6,5 или менее и выбор тестируемого Ab, если оно связывается с ECD белка VISTA с K_D 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или менее. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют при pH 6,5, в то время как в других вариантах осуществления его осуществляют при pH 6,0, или при pH 5,5, или при pH 5,0. В некоторых вариантах осуществления белок VISTA-ECD представляет собой белок hVISTA-ECD или содержит домен IgV hVISTA, или представляет собой полипептид, содержащий аминокислоты 20-95 SEQ ID NO:2 или аминокислоты 20-70, 35-95 или 35-70 SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления полипептид также содержит аминокислоты 95-105 SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислоты 35-127 или 37-125 SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает тестирование связывания

тестируемого Ab или множества тестируемых Ab при нейтральном, физиологическом или щелочном pH, например, при pH 7,0 или pH 7,4. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выбор антитела, если оно не только связывается с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или менее при pH 6,5 или ниже, но также если оно специфически связывается с полипептидом при pH 7,0 или pH 7,4. В некоторых вариантах осуществления тестируемые Ab выбирают, если они специфически связываются с белком VISTA-ECD в кислых условиях, например, при pH 6,5 или ниже, и также специфически связываются с белком VISTA-ECD при нейтральном и/или щелочном pH с аналогичным сродством (т.е. являются "пан-связывающими веществами"). Например, некоторые такие Ab могут связываться с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или менее как при pH 6,5, так и при pH 7,0 или pH 7,4 (при постоянной температуре например, при 25°C или при 37°C), причем значение K_D при pH 6,5 находится в пределах 1,5-кратного значения K_D при pH 7,0.

Некоторые Ab могут быть выбраны, если они специфически связываются с белком VISTA-ECD в кислых условиях, например, при pH 6,5 или ниже с более высоким сродством, чем при нейтральном или щелочном pH ("pH-чувствительные связывающие вещества" или "pH-чувствительные Ab"). Например, в некоторых вариантах осуществления Ab могут связываться с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-8} М или менее при pH 6,5 и с K_D более 10^{-8} М при pH 7,0 или pH 7,4. В некоторых таких вариантах осуществления Ab могут связываться с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-8} М или менее при pH 6,5 и с K_D при pH 7,0 или pH 7,4, которая более чем в 1,5 раза превышает K_D при pH 6,5. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительное Ab выбирают, если оно специфически связывается с белком VISTA-ECD с K_D , которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 300 раз, 500 раз, 1000 раз или 5000 раз ниже при pH 6,5, чем при pH 7,0 или pH 7,4 (при постоянной температуре, например, 25°C или при 37°C). Например, в некоторых случаях Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD с K_D , которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 300 раз, 500 раз, 1000 раз или 5000 раз ниже или выше при pH 6,0, чем при pH 7,0 или pH 7,4 (при постоянной температуре, например, 25°C или при 37°C).

В некоторых вариантах осуществления Ab выбирают, если оно специфически связывается с белком VISTA-ECD со значением k_{off} , которое в кислых условиях ниже, чем в нейтральных, физиологических или щелочных условиях. В некоторых вариантах осуществления Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD в кислых условиях с k_{off} , измеренной, например, при 25°C или при 37°C, которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз или 100 раз ниже при pH 6,5, чем при pH 7,0 или pH 7,4. Например, в некоторых вариантах осуществления Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD со скоростью k_{off} , измеренной, например, при 25°C или при 37°C, которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз или 100 раз ниже при pH 6,0, чем при pH 7,0 или pH 7,4.

В некоторых вариантах осуществления Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD с k_{on} , которая выше в кислых условиях по сравнению с нейтральными или щелочными условиями. В некоторых вариантах осуществления Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD в кислых условиях с k_{on} , измеренной, например, при 25°C или при 37°C, которая по меньшей мере в 2 раза, 5, 10, 20, 50 или 100 раз выше при pH 6,5, чем при pH 7,0 или pH 7,4. Например, в некоторых вариантах осуществления Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD с k_{on} , измеренной, например, при 25°C или при 37°C, которая по меньшей мере в 2 раза, 5, 10, 20, 50 или 100 раз выше при pH 6,0, чем при pH 7,0 или pH 7,4.

Методы модификации pH-чувствительности VISTA-ECD-связывающих Ab.

Ab, которое связывается с белком VISTA-ECD, но не связывается с ним при pH 6,5 или ниже или не связывается с ним с высоким сродством при pH 6,5 или ниже, может быть использовано для увеличения его сродства связывания при pH 6,5 или ниже. Например, паратоп Ab может быть мутирован, например, путем замены одного или более аминокислотных остатков. Например, в некоторых вариантах осуществления от 1 до 8, например от 1 до 6, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или 1 аминокислотный остаток в тяжелой или легкой цепи Ab, который является остатком, контактирующим с VISTA-ECD (например, остатком в одной или более CDR), может быть заменен другим аминокислотным остатком. Затем мутированный Ab может быть протестирован в отношении связывания с белком VISTA-ECD при pH 6,5 или ниже, и могут быть выбраны варианты Ab, демонстрирующие более высокое сродство связывания по сравнению с родительским антителом. При необходимости описанные выше этапы можно повторять путем осуществления двух или более циклов мутагенеза и селекции Ab и отбора антител с наивысшим сродством связывания при кислом pH. В некоторых вариантах осуществления такие циклы отбора могут улучшить противоопухолевую эффективность полученного антитела по сравнению с родительским антителом.

Вышеупомянутый способ отбора также может быть разработан согласно ранее описанному общему отбору антител, специфически связывающихся с белком VISTA-ECD. А именно, в некоторых вариантах осуществления улучшенное Ab выбирают, если оно связывается с ECD белка VISTA с K_D 10^{-8} М или менее при pH 6,5. В некоторых вариантах осуществления отбор осуществляют при pH 6,0 или при pH 5,5

или при pH 5,0, а не при pH 6,5. В некоторых вариантах осуществления белок VISTA-ECD, используемый для процесса селекции, представляет собой полноразмерный белок hVISTA-ECD или представляет собой полипептид, который включает домен IgV hVISTA, или представляет собой полипептид, содержащий аминокислоты 20-95 SEQ ID NO:2, или аминокислоты 20-70, 35-95 или 35-70 SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления полипептид также содержит аминокислоты 95-105 SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления используется полипептид, содержащий аминокислотные остатки 35-127 SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах осуществления способ улучшения связывания анти-VISTA антитела с ECD VISTA при кислом pH включает увеличение количества остатков глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты и гистидина в одной или более CDR VH, например, CDR1, CDR2 и CDR3 VH.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает тестирование связывания выбранного Ab при нейтральном, щелочном или физиологическом pH, таком как при pH 7,0 или 7,4. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выбор антитела, если оно не только связывается с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-8} М или менее при pH 6,5 или ниже, но также если оно специфически связывается с полипептидом при pH 7,0 или 7,4. В некоторых таких вариантах осуществления Ab выбирают, если они специфически связываются с белком VISTA-ECD в кислых условиях, например, при pH 6,5 или ниже, а также специфически связываются с белком VISTA-ECD при нейтральном и/или щелочном или физиологическом pH с аналогичным сродством (т.е. являются "пан-связывающими веществами"). Например, некоторые такие Ab могут связываться с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-8} М или менее как при pH 6,5, так и при pH 7,0 (при постоянной температуре, например, 25°C или при 37°C), при этом K_D при pH 6,5 находится в пределах 1,5-кратного значения K_D при pH 7,0 или при pH 7,4.

Некоторые Ab могут быть выбраны, если они специфически связываются с белком VISTA-ECD в кислых условиях, например, при pH 6,5 или ниже с более высоким сродством, чем при нейтральном, физиологическом или щелочном pH ("pH-чувствительные связывающие вещества" или "pH-чувствительные Ab"). Например, в некоторых вариантах осуществления Ab могут связываться с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-8} М или менее при pH 6,5 и с K_D более 10^{-8} М при pH 7,0. В некоторых таких вариантах осуществления Ab могут связываться с белком VISTA-ECD с K_D 10^{-8} М или менее при pH 6,5 и с K_D при pH 7,0, которая более чем в 1,5 раза выше, чем при pH 6,5. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительное Ab выбирают, если оно специфически связывается с белком VISTA-ECD с K_D , которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 300 раз, 500 раз, 1000 раз или 5000 раз ниже при pH 6,5, чем при pH 7,0 или pH 7,4 (при постоянной температуре, например, 25°C или при 37°C). Например, в некоторых случаях Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD с K_D , которая по меньшей мере, в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 100 раз, 300 раз, 500 раз, 1000 раз или 5000 раз ниже или выше при pH 6,0, чем при pH 7,0 или pH 7,4 (при постоянной температуре, например, 25°C или при 37°C).

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение k_{off} при двух значениях pH. В некоторых таких вариантах осуществления Ab выбирают, если оно специфически связывается с белком VISTA-ECD с k_{off} , которая ниже в кислых условиях, чем в нейтральных, физиологических или щелочных условиях. В некоторых вариантах осуществления Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD в кислых условиях с k_{off} , измеренной, например, при 25°C или при 37°C, которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз или 100 раз ниже при pH 6,5, чем при pH 7,0 или pH 7,4. Например, в некоторых вариантах осуществления Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD со скоростью k_{off} , измеренной, например, при 25°C или при 37°C, которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз или 100 раз ниже при pH 6,0, чем при pH 7,0.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение k_{on} при двух значениях pH. В некоторых таких вариантах осуществления Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD с k_{on} , которая выше в кислых условиях по сравнению с нейтральными, физиологическими или щелочными условиями. В некоторых вариантах осуществления Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD в кислых условиях с k_{on} , измеренной, например, при 25°C или при 37°C, которая по меньшей мере в 2 раза, 5, 10, 20, 50 или 100 раз выше при pH 6,5, чем при pH 7,0 или pH 7,4. Например, в некоторых вариантах осуществления Ab выбирают, если оно связывается с белком VISTA-ECD с k_{on} , измеренной, например, при 25°C или при 37°C, которая по меньшей мере в 2 раза, 5, 10, 20, 50 или 100 раз выше при pH 6,0 чем при pH 7,0 или pH 7,4.

Антитела, которые связываются с huVISTA преимущественно при кислом pH, по сравнению с нейтральным или физиологическим pH, могут быть идентифицированы путем положительного скрининга библиотеки анти-VISTA антител или Fab или scFv в отношении связывания при кислом pH, например, pH 6,0 или 6,5, и отрицательного скрининга библиотеки для определения отсутствия связывания при нейтральном pH, например, pH 7,0 или физиологическом pH, например, pH 7,4. Библиотека может быть обогащена остатками глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты и гистидина, например, для отбора связывающих доменов, которые заряжены положительно и с большей вероятностью связываются с VISTA при кислом pH. Скрининг может включать положительный отбор при кислом pH и отрицатель-

ный отбор при нейтральном или физиологическом pH. Этапы положительного и отрицательного отбора могут чередоваться.

Альтернативно, антитело, связывающееся с VISTA при нейтральном pH и/или не связывающееся при кислом pH, может быть спроектировано таким образом, чтобы оно не связывалось при нейтральном pH, а связывалось при кислом pH.

Конкретные варианты осуществления

Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения включают следующее.

1. Выделенное антитело (Ab), которое специфически связывается с внеклеточным доменом (ECD) человеческого содержащего иммуноглобулин-V-домен супрессора Т-клеточной активации (hVISTA), где Ab:

- a) связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с константой сродства (K_D) 10^{-7} М или менее;
- b) связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с константой скорости диссоциации (k_{off}) 10^{-3} c^{-1} или менее; или
- c) связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с K_D 10^{-7} М или менее и k_{off} 10^{-3} c^{-1} или менее.

2. Выделенное Ab по варианту осуществления 1, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с K_D 10^{-8} М или менее.

3. Выделенное Ab по варианту осуществления 2, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с K_D 10^{-9} М или менее.

4. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 1-3, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с k_{off} 10^{-4} c^{-1} или менее.

5. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 1-4, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 7,0 или выше с:

- a) K_D 10^{-7} М или менее;
- b) k_{off} 10^{-3} c^{-1} или менее; или
- c) K_D 10^{-7} М или менее и k_{off} 10^{-3} c^{-1} или менее.

6. Выделенное Ab по варианту осуществления 5, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 7,0 или выше с K_D 10^{-8} М или менее.

7. Выделенное Ab по варианту осуществления 6, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 7,0 или выше с K_D 10^{-9} М или менее.

8. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 5-7, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 7,0 или выше с k_{off} 10^{-4} c^{-1} или менее.

9. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 5-8, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 с таким же сродством, как при pH 7,0.

10. Выделенное Ab по варианту осуществления 9, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 с более высоким сродством чем при pH 7,0.

11. Выделенное Ab по варианту осуществления 10, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 с K_D , которая по меньшей мере в 1,5 раза ниже чем при pH 7,0.

12. Выделенное Ab по варианту осуществления 11, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 с K_D , которая по меньшей мере в 2 раза ниже чем при pH 7,0.

13. Выделенное Ab по варианту осуществления 11, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 с K_D , которая по меньшей мере в 5 раз ниже чем при pH 7,0.

14. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 10-13, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 с k_{off} , которая ниже чем при pH 7,0.

15. Выделенное Ab по варианту осуществления 14, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 с k_{off} , которая по меньшей мере в 1,5 раза ниже чем при pH 7,0.

16. Выделенное Ab по варианту осуществления 15, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 с k_{off} , которая по меньшей мере в 2 раза ниже чем при pH 7,0.

17. Выделенное Ab по варианту осуществления 16, где Ab связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 с k_{off} , которая по меньшей мере в 5 раз ниже чем при pH 7,0.

18. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 1-17, где Ab специфически связывается с hVISTA-ECD в условиях, в которых по меньшей мере один остаток гистидина hVISTA-ECD является протонированным.

19. Выделенное Ab по варианту осуществления 18, где Ab связывается с доменом IgV hVISTA-ECD.

20. Выделенное Ab варианта осуществления 19, где Ab связывается с областью, расположенной в пределах аминокислот 20 и 95 SEQ ID NO:2.

21. Выделенное Ab по варианту осуществления 20, где Ab связывается с областью, расположенной в пределах аминокислот 20 и 70 SEQ ID NO:2.

22. Выделенное Ab по варианту осуществления 21, где Ab связывается с областью, расположенной в пределах аминокислот 35 и 70 SEQ ID NO:2.

23. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 20-22, где Ab дополнительно связывается с другой областью ECD hVISTA.

24. Выделенное Ab по варианту осуществления 23, где другая область расположена в пределах аминокислот 95 и 105 SEQ ID NO:2.

25. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 18-24, где связывание определяют методом дейтеро-водородного обмена в сочетании с масс-спектрометрией (HDX-MS).

26. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 1-25, где Ab ингибирует связывание hVISTA с клеткой, с которой hVISTA связался бы в других условиях.

27. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 1-26, где Ab запускает или усиливает иммунный ответ в модели опухоли.

28. Выделенное Ab по варианту осуществления 27, где Ab запускает или усиливает активность Т-клеток в модели опухоли.

29. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 1-28, где Ab ингибирует рост опухоли на модели опухоли.

30. Выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 1-29, где Ab ингибирует связывание hVISTA с Т-клетками.

31. Ab по варианту осуществления 30, где Ab более сильно ингибирует связывание hVISTA с Т-клетками при pH 6,5 или ниже, чем при pH 7,0 или выше, например, когда антитело более сильно ингибирует связывание hVISTA с Т-клетками pH 6,5, чем при pH 7,0.

32. Композиция, содержащая выделенное Ab по любому из вариантов осуществления 1-31 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Способ лечения индивида, страдающего раком, включающий введение индивиду композиции по варианту осуществления 32.

34. Способ идентификации Ab, которое связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с K_D 10^{-7} М или менее, включающий приведение в контакт тестируемого Ab или множества тестируемых Ab с полипептидом, содержащим hVISTA-ECD или его фрагмент, содержащий домен IgV hVISTA-ECD или содержащий аминокислоты 20-95, 20-70 или 35-70 SEQ ID NO:2 при pH 6,5 или ниже, и выбор одного или более тестируемых Ab, которые связываются с полипептидом с K_D 10^{-7} М или менее.

35. Способ идентификации Ab, которое связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с k_{off} 10^{-3} с⁻¹ или менее, включающий приведение в контакт тестируемого Ab или множества тестируемых Ab с полипептидом, содержащим hVISTA-ECD или его фрагмент, содержащий домен IgV hVISTA-ECD или содержащий аминокислоты 20-95, 20-70 или 35-70 SEQ ID NO:2 при pH 6,5 или ниже, и выбор одного или более тестируемых Ab, которые связываются с полипептидом с k_{off} 10^{-3} с⁻¹ или менее.

36. Способ идентификации Ab, которое специфически связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 со сродством, аналогичным таковому при pH 7,0, включающий:

а) приведение в контакт тестируемого Ab или множества тестируемых Ab при pH 6,5 с полипептидом, содержащим hVISTA-ECD или его фрагмент, содержащий домен IgV hVISTA-ECD или содержащий аминокислоты 20-95, 20-70 или 35-70 SEQ ID NO:2;

б) приведение в контакт тестируемого Ab или множества тестируемых Ab при pH 7,0 с полипептидом из (а); и

с) выбор тестируемого Ab, если оно связывается с полипептидом с K_D 10^{-7} М или менее при pH 6,5 и при pH 7,0.

37. Способ идентификации Ab, которое связывается с hVISTA-ECD с более высоким сродством при pH 6,5, чем при pH 7,0, включающий:

а) приведение в контакт тестируемого Ab или множества тестируемых Ab при pH 6,5 с полипептидом, содержащим hVISTA-ECD или его фрагмент, содержащий домен IgV hVISTA-ECD или содержащий аминокислоты 20-95, 20-70 или 35-70 SEQ ID NO:2;

б) приведение в контакт тестируемого Ab или множества тестируемых Ab при pH 7,0 с полипептидом из (а) и

с) выбор тестируемого Ab, если оно связывается с полипептидом с K_D по меньшей мере в 2 раза ниже при pH 6,5, чем при pH 7,0.

38. Способ идентификации Ab, которое специфически связывается с hVISTA-ECD, для применения при лечении рака, включающий:

а) идентификацию Ab, которое специфически связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже, например, в соответствии со способами по вариантам осуществления 32-35; и

б) выбор Ab из (а), которые запускают или усиливают иммунный ответ в модели опухоли или которые ингибируют рост опухоли при pH 6,5 или ниже.

39. Способ по варианту осуществления 38, в котором этап (б) включает измерение активности Т-клеток.

40. Способ по варианту осуществления 38 или 39, дополнительно включающий измерение противоопухолевого эффекта Ab.

41. Способ улучшения противоопухолевой эффективности Ab, которое связывается с hVISTA-ECD, включающий:

а) предоставление Ab, которое связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже со сродством, ко-

торое меньше требуемого значения;

b) замену 1-5 аминокислотных остатков в тяжелой или легкой цепи Ab другим аминокислотным остатком, где 1-5 аминокислотных остатков являются остатками контактирования с hVISTA-ECD;

c) определение, имеет ли Ab, полученное в (b), более высокое сродство к hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже по сравнению с Ab из (a); и

d) повторение этапов (a)-(c) в количестве циклов, достаточных для получения Ab, которое связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с K_D 10^{-7} М или менее.

42. Способ улучшения противоопухолевой эффективности Ab, которое связывается с hVISTA-ECD, включающий:

a) предоставление Ab, которое связывается с hVISTA-ECD при pH 6,5 или менее со сродством, которое меньше требуемого значения;

b) получение библиотеки вариантов Ab из (a), где каждый вариант содержит замену от 1 до 5 аминокислотных остатков в тяжелой или легкой цепи Ab на другой аминокислотный остаток, причем указанные от 1 до 5 аминокислотных остатков являются остатками, контактирующими с hVISTA-ECD;

c) выбор Ab из библиотеки вариантов из (b), которые связываются с hVISTA-ECD при pH 6,5 или ниже с K_D 10^{-7} М или менее; и

d) тестирование противоопухолевой эффективности Ab из (c) на модели опухоли.

43. Способ улучшения фармакокинетического профиля антитела, которое связывается с человеческим ECD VISTA, включающий усиление способности антитела связываться с человеческим VISTA в кислых условиях, например, при pH 6,5 или ниже.

44. Способ выбора антитела, которое связывается с человеческим VISTA и имеет увеличенный период полувыведения (хорошие фармакокинетические свойства), при этом способ включает выбор антитела, которое связывается с человеческим VISTA в кислых условиях, например, при pH 6,5 или ниже.

Примеры

Приведенные ниже примеры предназначены исключительно для иллюстрации изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение каким-либо образом. Примеры не означают, что приведенные ниже эксперименты являются всеми или единственными проведенными экспериментами. Точность используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.) гарантирована, но следует учитывать ошибки эксперимента и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах по Цельсию, а давление равно атмосферному или близкому к нему.

Пример 1. Внеклеточный домен VISTA исключительно богат гистидинами.

В этом примере показано, что внеклеточный домен VISTA исключительно богат остатками гистидина, что эти остатки гистидина являются эволюционно консервативными, и что они могут участвовать во взаимодействиях рецептор-лиганд, в которых задействован VISTA.

Аминокислотные последовательности внеклеточных доменов (ECD) белков, содержащих иммуноглобулиновый домен, выделяли из баз данных uniprot и swiss-prot и анализировали на содержание гистидина. На фиг. 1A показано графическое представление результатов этого анализа. Для каждого белка на оси Y показана частота остатков гистидина в процентах от всех аминокислотных остатков внеклеточного домена, а общее количество аминокислотных остатков во внеклеточном домене показано на оси X. Диаметр каждой точки данных соответствует общему количеству остатков гистидина во внеклеточном домене каждого белка. VISTA (помеченный) содержит исключительно высокую частоту остатков гистидина во внеклеточном домене.

Затем оценивали эволюционную консервативность остатков гистидина в VISTA. На фиг. 1B показаны эталонные аминокислотные последовательности VISTA человека, яванского макака и мыши, за исключением сигнальных пептидов ("Sig"), трансмембранных доменов ("TMD") и внутриклеточных доменов. Остатки гистидина, которые сохранились у всех трех видов, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Остатки гистидина, которые консервативны у VISTA человека и яванского макака, выделены жирным шрифтом без подчеркивания. Многие из остатков гистидина внеклеточного домена VISTA являются эволюционно консервативными, что свидетельствует о важной биологической роли высокого содержания гистидина в VISTA.

На основании результатов анализа гомологии последовательностей для структур, доступных в базе данных PDB, создавали трехмерную модель домена IgV hVISTA.

Модель, приведенная на фиг. 1C, показывает, что многие гистидины в ECD VISTA экспонированы на поверхности молекулы, где они могут играть роль в связывании лиганда, а также в распознавании антител. Остатки гистидина изображены в виде шариков и стержней.

Пример 2. Протонирование гистидина может регулировать VISTA лиганд-рецепторное взаимодействие и иммуносупрессивную активность в опухолях и других кислых микроокружениях.

В этом примере описано протонирование гистидина в ответ на физиологически релевантный кислый pH, а также описана модель, в которой гистидины внеклеточного домена VISTA обеспечивают селективность контррецептора или лиганда в кислом, а не физиологическом, pH.

На фиг. 2A показано равновесие между отсутствием и наличием протонирования аммониевой груп-

пы (NH) пиррола в остатке гистидина. Значение рKa гистидина в растворе составляет 6,5, что указывает на то, что по всей вероятности при pH 6,5 и ниже, в отличие от более высоких значений pH, происходит протонирование остатков гистидина и, таким образом, они становятся положительно заряженными. Увеличение положительного заряда на поверхности ECD VISTA в результате протонирования может влиять на связывание рецептора с лигандом, а также на структуру и/или функцию VISTA. Таким образом, изменение pH также может модифицировать антитело-связывающие эпитопы и/или приводить к изменению сродства антитела.

На фиг. 2B показана модель, в которой VISTA селективно связывается с PSGL-1 или другими контррецепторами и лигандами ("VISTA-R") при кислом pH. Ожидается, что при физиологическом pH, например в крови, остатки гистидина в ECD VISTA являются непротонированными, и, в результате, уровень связывания VISTA с PSGL-1 или другими контррецепторами и лигандами при физиологическом pH будет незначительным. Напротив, в местах с тенденцией к снижению внеклеточного pH до кислого, таких как микроокружение опухоли или места воспаления, кислый pH может частично или полностью управлять протонированием гистидина в ECD VISTA и, таким образом, обеспечивать взаимодействие VISTA с PSGL-1 или другими контррецепторами и лигандами. Соответственно, антитела, которые сильно связываются с белками VISTA-ECD в кислых диапазонах pH, могут оказаться более эффективными в отношении ингибирования активности VISTA в опухолях.

Пример 3. VISTA экспрессируется миеломоноцитарными клетками в опухолях.

В этом примере показано, что VISTA часто экспрессируется миеломоноцитарными клетками в опухолях, включая макрофаги, дендритные клетки и гранулоциты.

Резецированные хирургическим путем немелкоклеточную карциному легкого, почечно-клеточный рак, меланому, колоректальный рак и другие образцы опухолей промывали в ледяном PBS, разрезали на кусочки размером примерно 15 мм³ и суспендировали в охлажденной льдом среде RPMI-1640 (Fisher Scientific кат. № 11875093) с добавлением 2% инактивированной нагреванием FBS и 2 mM ЭДТА (Fisher Scientific 15575020). Каждый образец переносили в гомогенизатор Даунса с большим прозрачным стеклянным окном (Tenbroeck Tissue Grinders) и измельчали до визуальной диссоциации кусочков ткани. Суспензии фильтровали через 70 мкм нейлоновую сетку и центрифугировали. Супернатанты отбрасывали, и клеточные осадки ресуспендировали в среде PBS комнатной температуры, дополненной 0,1% бычьим сывороточным альбумином и 250 мг/мл стерильно-отфильтрованной ДНКазы 1 (степень II, из поджелудочной железы крупного рогатого скота, Roche кат. № 10104159001) в течение 3 мин при комнатной температуре. Затем клетки промывали в охлажденном льдом RPMI и ресуспендировали в охлажденной льдом среде PBS. Добавляли краситель для определения жизнеспособных клеток, и клетки инкубировали на льду в темноте. Через 20 мин окрашивание неспецифических антител блокировали путем добавления 4% нормальной крысиной сыворотки, 4% нормальной мышиной сыворотки, 20% человеческой сыворотки из плазмы АВ и разбавляли Human TruStain FcXTM в отношении 1:125 (Biolegend кат. № 422302). Клетки окрашивали анти-HLA-DR антителами, конъюгированными с флуорофором (BD Biosciences кат. № 564040), CD8 (Fisher Scientific кат. № 46-0087-42), CD14 (Biolegend кат. 325620), CD45 (Biolegend кат. № 304017), CD4 (BD Biosciences кат. № 563875), CD11c (BD Biosciences кат. № 744439), CD15 (BD Biosciences кат. № 563142), PD-1 (BD Biosciences кат. № 565299), CD3 (BD Biosciences кат. № 565515), CD56 (Fisher Scientific кат. № 61-0567-42), CD19 (BD Biosciences кат. № 564977) и VISTA (VISTA антитело 3, конъюгированное с AlexaFluorTM 647, Fisher Scientific кат. № A20186), суспендировали в буфере Brilliant Stain (BD Biosciences кат. № 562794) в течение 30 мин на льду в темноте. Окрашенные клетки промывали в ледяной PBS, фиксировали (Fisher Scientific кат. № 00-5523-00) и собирали на проточном цитометре. Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJoT (BD Biosciences). Как показано на фиг. 3, экспрессия VISTA на клеточной поверхности была самой высокой у макрофагов и гранулоцитов, у дендритных клеток была умеренной, и низкой оказалась у Т-клеток, натуральных киллерных клеток и В-клеток.

Пример 4. Связывание клеток с VISTA демонстрирует селективность при кислом pH.

В этом примере показано, что мультимеризованный ECD человеческого VISTA более эффективно связывается со стимулированными человеческими CD4⁺ Т-клетками и мононуклеарными человеческими клетками периферической крови при кислом pH, чем при нейтральном или физиологическом pH, и что блокирующее человеческий VISTA антитело может блокировать это связывание. Также показано pH-селективное связывание димеризованного мышиного ECD VISTA с мышиными спленоцитами.

Обогащение человеческих CD4⁺ Т-клеток выполняли из здоровой донорской крови, используя RosetteSepTM (Stemcell кат. № 15062), и стимулировали *in vitro* в течение примерно четырех дней с помощью человеческого CD3/CD28 Т-активатора DynabeadsTM (Fisher Scientific кат. № 111.32D) и рекомбинантного человеческого IL-2 (Peprotech кат. № 200-02) в RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной нагреванием FBS, GlutamaxTM (Fisher Scientific кат. № 35050061), незаменимых аминокислот (Fisher Scientific 11140050), пирувата натрия (Fisher Scientific кат. № 11360070) и 2-меркаптоэтанола (Fisher Scientific 21985023). Активированные CD4⁺ Т-клетки окрашивали в течение 30 мин при комнатной температуре монобиотинилированными молекулами ECD hVISTA (Phe 33 - Ala 194 (Accession # AAH20568)-

полигистидин; AcroBiosystems, Inc. B75-H82F3), загруженными в 28:1 молярном отношении к декстрамерам стрептавидина, конъюгированного с фикоэритрином (PE) (кат. № DX01-PE), разведенным в забуференном солевом растворе Хэнка (HBSS, Fisher Scientific кат. № 14025134), подкисленном до различных значений pH с помощью mM MES (Sigma 1317-100ML). В качестве контроля использовали активированные CD4⁺ Т-клетки, окрашенные PE-конъюгированными декстрамерами стрептавидина, которые не были загружены hVISTA. Окрашенные клетки промывали HBSS+MES и собирали на проточном цитометре. Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo™ (BD Biosciences). Результаты, изображенные на фиг. 4А, показывают, что hVISTA не связывается с CD4⁺ Т-клетками лучше, чем контроль при pH > 6,5. Напротив, связывание hVISTA с CD4⁺ Т-клетками значительно усиливалось при pH < 6,5. На чертеже слева, гистограммы, окрашенные цветами от темно-серого до светло-серого, демонстрируют связывание при pH 7,0, 6,5, 6,4, 6,3, 6,1 и 6,0. Некоторые гистограммы обозначены соответствующими значениями pH. Связывание не-VISTA контрольного мультимера при pH 6,0 показано в виде неокрашенной гистограммы. Справа, на графике показана средняя интенсивность флуоресценции (MFI) PE для CD4⁺ Т-клеток, окрашенных hVISTA-загруженными декстрамерами (синие кружки) или незагруженными декстрамерами (треугольники), при различных значениях pH.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) обогащали из крови здорового донора центрифугированием в градиенте фиколла (Ficoll-Paque Plus, GE Life Sciences кат. № 17144003) и окрашивали hVISTA-загруженными декстрамерами (также называемыми мультимерами) и конъюгированными с флуорофором, разведенными в буферах HBSS+MES, как описано выше. Представленные на фиг. 4В гистограммы, окрашенные цветами от темно-серого до светло-серого, показывают связывание с CD19⁺ В-клетками, CD4⁺ Т-клетками, CD8⁺ Т-клетками, CD56⁺ NK-клетками и CD14⁺ моноцитами при pH 6,0. Неокрашенные гистограммы, изображенные сплошной и пунктирной линиями, показывают связывание при pH 7,4 с общим пулом лимфоцитов и моноцитов PBMC, соответственно. Результаты показывают, что hVISTA связывается с большим количеством лейкоцитов при кислом pH и незначительным - при физиологическом pH.

Активированные человеческие CD4⁺ Т-клетки окрашивали hVISTA мультимерами при pH 6 в присутствии оттитрованного человеческого анти-VISTA антитела или не специфического к VISTA антитела соответствующего изотипа. Результаты, представленные на фиг. 4С, показывают MFI мультимерного VISTA относительно концентрации антител. Анти-hVISTA антитело (антитело 3 к VISTA; квадраты), а не неспецифическое к VISTA контрольное антитело (кружки), блокировало связывание hVISTA с активированными CD4⁺ Т-клетками зависимым от концентрации образом. MFI PE, наблюдаемый в CD4⁺ Т-клетках, не окрашенных hVISTA-загруженными мультимерами, включен в качестве контроля (один треугольник).

На фиг. 4D показаны построенные по результатам проточной цитометрии репрезентативные двумерные графики окрашивания мультимером VISTA при pH 6,0 в мутантных в отношении гепарансульфата клетках яичника китайского хомячка (CHO) (линия pGSD-677, Американская коллекция типовых культур), которые были трансфицированы для экспрессии полноразмерного человеческого PSGL-1 (SEQ ID NO:3; нуклеиновая кислота NM_003006.4). Окрашивание выполняли в присутствии или в отсутствие оттитрованного антитела, блокирующего VISTA (mAb 3). Клетки, оставшиеся неокрашенными мультимерами VISTA, приведены в качестве контроля. Окрашивание анти-PSGL-1 антителом (BD Biosciences № 562758) показано на оси Y, а окрашивание мультимером VISTA показано на оси X.

У мышей C57BL/6/J (Jackson Laboratory, кат. № 000664) собирали спленоциты, которые окрашивали рекомбинантными химерными белками ECD mVISTA/IgG человека (фрагмент, кристаллизуемый), а затем конъюгированными с флуорофором вторичными антителами к человеческому Fc IgG (Jackson ImmunoResearch кат. № 109-065-098) при pH 6,0 или 7,4. Результаты, представленные в виде гистограммы на фиг. 4Е, показывают, что mVISTA связывается с мышинными спленоцитами более эффективно при pH 6,0, чем при физиологическом pH (примерно pH 7,4). Гистограммы, окрашенные цветами от темно-серого до светло-серого, демонстрируют связывание с CD8⁺ Т-клетками, CD11b⁺ миелоидными клетками и CD4⁺ Т-клетками при pH 6,0. Неокрашенная гистограмма демонстрирует связывание с общим пулом спленоцитов при pH 7,4.

Пример 5. VISTA селективно опосредует межклеточную адгезию и иммуносупрессию при кислом pH.

В этом примере показано, что VISTA опосредует межклеточную адгезию и подавляет активацию Т-клеток более сильно при кислом pH, чем при нейтральном или физиологическом pH.

Выполняли анализ проточной цитометрии межклеточных конъюгатов в кислом pH. Клетки 293Т (иммortalизованная клеточная линия эмбриональной почки человека, кат. № ATCC CRL-3216), эктопически экспрессирующие полноразмерный человеческий VISTA или Vector, метили CFSE (карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловый эфир; Fisher Scientific кат. № C34554). Клетки CHO метили CellTrace™ Far Red (Fisher Scientific кат. № C34564). Затем экспрессирующие Vector или VISTA клетки 293Т смешивали в соотношении 1:1с клетками CHO в буфере с pH 7,0 или pH 6,0 и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Образование межклеточных конъюгатов между CHO и 293Т оценивали с помощью

проточной цитометрии. Результаты на фиг. 5А, В показывают, что при кислом pH адгезия происходит предпочтительно между экспрессирующими VISTA клетками 293Т и клетками CHO, и что введение антитела, блокирующего VISTA (VISTA mAb 3; красные столбики), ингибирует опосредованную VISTA межклеточную адгезию.

Выполняли анализ супрессии Т-клеток в кислой среде. Клетки Jurkat (иммortalизованная линия человеческих Т-клеток, кат. № ATCC TIB-152), экспрессирующие репортер люциферазы, управляемый промотором NFκB, культивировали в буферах HBSS+MES с разными значениями pH совместно с клетками 293Т (иммortalизованная линия клеток эмбриональной почки человека, ATCC кат. № CRL-3216), эктопически экспрессирующими полноразмерный человеческий VISTA и одноцепочечный вариabельный фрагмент клона ОКТ3 агонистического антитела к рецептору человеческих Т-клеток, при 10:1 соотношении клеток Jurkat:293Т. К совместным культурам добавляли блокирующее VISTA антитело (VISTA mAb 3) или не специфическое к VISTA контрольное антитело соответствующего изотипа в концентрации 10 мкг/мл. После инкубации выполняли количественное определение активации Т-клеток Jurkat путем измерения активности люциферазы (1-секундный интервал, Promega, кат. № G7940). Результаты показаны на фиг. 5С, D. На фиг. 5С показан график единиц люциферазы в клетках Jurkat, обработанных анти-VISTA антителом (красные квадраты) или контрольным антителом (синие кружки) при различных значениях pH. На фиг. 5D показан график сигнала люциферазы в совместных культурах, обработанных анти-VISTA антителом, разделенных в зависимости от сигнала люциферазы в контрольных совместных культурах, обработанных антителом, при каждом протестированном pH. Результаты показывают, что опосредованная VISTA супрессия Т-клеток наиболее эффективна при кислом pH.

Пример 6. Перенос VISTA происходит посредством внутриклеточных рециркулирующих эндосом.

В этом примере показано, что VISTA может быть обнаружен во внутриклеточных эндосомах, в частности Rab11⁺ рециркулирующих эндосомах, и может рециркулировать на клеточную поверхность и с клеточной поверхности посредством эндосомного транспорта. Сила, с которой анти-VISTA антитело связывается с VISTA при кислом pH, влияет на его способность оставаться связанным с VISTA во время эндосомного транспорта.

Моноциты выделяли из PBMC методом магнитно-активированного сортирования клеток. Затем и моноциты, и клетки 293Т фиксировали в 4% параформальдегиде и окрашивали внутриклеточно на Rab5, Rab7 или Rab11 и анти-VISTA антитело или контрольное антитело. Контрольное антитело ("сAb"), которое является не связывающим VISTA антителом того же изотипа, что и анти-VISTA антитело, не обнаруживает связывания с моноцитами или клетками 293Т, экспрессирующими человеческий VISTA. Анти-VISTA и контрольное антитела метили непосредственно Alexa488. Антитела к Rab детектировали с помощью вторичного антитела Alexa594 к кроличьему Ig. Окрашивание Hoechst 33342 выполняли для идентификации клеточных ядер. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа с вращающимся диском. На фиг. 6А показана совместная локализация VISTA, Rab5 (маркер ранней эндосомы), Rab7 (маркер поздней эндосомы) и Rab11 (маркер рециркулирующей эндосомы) в клетках 293Т, экспрессирующих человеческий VISTA. На фиг. 6В показана совместная локализация VISTA и Rab11 в человеческих моноцитах. Внутриклеточный VISTA расположен вместе с Rab11⁺ рециркулирующими эндосомами.

Для оценки способности VISTA рециркулировать посредством эндосом выполняли анализ уничтожения эндолизосомо-зависимого конъюгата лекарственного средства с антителом, используя три антитела к hVISTA (VISTA mAb 1, 2 и 3) с разными свойствами связывания VISTA при физиологическом и кислом pH. Сначала выполняли анализ ППП для сравнения профилей связывания hVISTA всех трех анти-VISTA антител при pH 7,4, 6,7 и 6,0. Анти-VISTA антитела иммобилизовали на биосенсоре Biacore® T100 (GE Healthcare) CM5, содержащим иммобилизованный белок А, затем вводили 100 нМ hVISTA-ECD (аминокислоты 32-193 SEQ ID NO:1 с 7×His хвостом, т.е. AFKVATPYSL YVCPEGQNVT LTCRLLGPVD KGHDVTFYKT WYRSSRGEVQ TCSERRPIRN LTFQDLHLHH GGHQAANTSH DLAQRHGLS SDNHGNFSI TMRNLTLDS GLYCCLVVEI RHHHSEHRVH GAMELQVQTG KDAP-SNCVVY PSSSQESEN TANNHHHHH; SEQ ID NO:325) в подвижном буфере PBST при указанном pH при 37°C. Сенсограммы с вычитенным эталонным значением нормализовали по точке "связывания" и наносили на график. Антитело VISTA 3, "mAb 3" (фиг. 6С, сверху), показало наибольшую степень нарушения связывания с VISTA при кислом pH, за которым следовало антитело VISTA 2, "mAb 2" (фиг. 6С, посередине), связывание которого было нарушено в умеренной степени. Анти-VISTA антитело 1, "mAb 1", сохраняло сильное связывание с VISTA в кислых и физиологических pH (фиг. 6С, снизу).

Анализ уничтожения эндолизосомо-зависимых конъюгатов лекарственного вещества с антителом выполняли следующим образом. Клетки AML3 (иммortalизованная клеточная линия моноцитов человека, ATCC CRL-9589), эндогенно экспрессирующие человеческий VISTA, культивировали с оттитрованными антителами к VISTA или не специфическим к VISTA контрольным антителом и вторичным антителом к человеческому IgG, которое было конъюгировано с чувствительным к катепсину В линкером и цитотоксической полезной нагрузкой, тубулизином. Поскольку катепсин В является активным преимущественно в поздних эндосомах и лизосомах, анти-VISTA антитела, которые рециркулируют с VISTA

через ранние эндосомы и рециркулирующие эндосомы, будут иметь низкие уровни расщепления линкера и, как следствие, низкие уровни высвобождения цитотоксической полезной нагрузки и гибели клеток. Анти-VISTA антитела, которые диссоциируют из комплекса с VISTA в кислых эндосомах и группируются в поздних эндосомах и лизосомах, будут демонстрировать более высокие уровни расщепления линкера. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью Cell Titer Glo® (Promega, кат. № G7573) через пять дней культивирования. На фиг. 6D представлены результаты этого анализа в графическом виде, где на оси Y показана жизнеспособность AML3 (Cell Titer Glo), а концентрация первичных антител показана на оси X. Вычисляли значения EC50 для первичных антител: анти-VISTA антитело 1, перевернутые треугольники, 0,485 мкг/мл; анти-VISTA антитело 2, кружки, 0,092 мкг/мл; анти-VISTA антитело 3, квадраты, 0,006 мкг/мл; контроль, треугольники, 1,085 мкг/мл. При кислом pH наблюдалась обратная корреляция между эффективностью антител и связыванием анти-VISTA антител.

Для подтверждения того, что связывание при кислом pH является причиной различий в эффективности, анти-VISTA антитело 3 оптимизировали по родству с тем, чтобы улучшить его способность связываться с VISTA при кислом pH. На фиг. 6E показан анализ ПНР, в котором выполнено сравнение профилей связывания hVISTA анти-VISTA антитела 3 с этим вариантом, анти-VISTA антителом 3с, в условиях анализа, описанных для фиг. 6C. Анти-VISTA антитело 3 снова демонстрирует нарушение связывания с VISTA при кислом pH, тогда как вариантное анти-VISTA антитело 3с демонстрирует сопоставимое связывание с VISTA при кислом и физиологическом pH. На фиг. 6F показана активность анти-VISTA антитела 3с (ромбы) в анализе уничтожения, описанном для фиг. 6F. Оптимизированный в отношении кислого pH вариант анти-VISTA антитела 3 показал в 31 раз более низкую активность, чем исходное антитело, что указывает на то, что нарушение связывания анти-VISTA антитела при кислом pH приводит к потере связывания с антителом во время рециркуляции VISTA.

Основываясь на этих выводах, была предложена модель рециклинга, согласно которой VISTA рециркулирует на поверхность клетки и с поверхности клетки через ранние эндосомы и рециркулирующие эндосомы. Эта модель изображена на фиг. 6G. Анти-VISTA антитела могут рециркулировать с VISTA через эти эндосомы, сохраняя взаимодействие с мишенью. Однако анти-VISTA антитела с нарушенным связыванием с VISTA при кислом pH, в частности антитела с высокой скоростью диссоциации при кислом pH, могут диссоциировать из комплекса с VISTA во время рециркуляции и оказаться захваченными клеткой или подвергаться расщеплению внутри клетки, что приводит к слабому захвату мишени и непрерывному потреблению циркулирующих антител. Напротив, антитела, которые связываются и остаются связанными с VISTA при кислом pH, могут сохранять более высокие уровни взаимодействия с мишенью, особенно в кислой среде микроокружения, такой как опухоли, и демонстрировать более длительное среднее время пребывания *in vivo*.

Пример 7. Превосходство анти-VISTA антител, не связывающихся при физиологическом pH.

Авторы изобретения показали, что VISTA является иммунорецептором, селективным при кислом pH, что демонстрирует важность и полезность нацеливания на VISTA антител, которые хорошо связываются при кислом pH. Кроме того, антитела, которые не связываются или демонстрируют незначительное связывание с VISTA при физиологическом pH, являются предпочтительными по нескольким причинам. Во-первых, из-за относительно высокой экспрессии VISTA в циркулирующих миеломоноцитарных клетках, в частности, в моноцитах и нейтрофилах, антитела, которые связываются с VISTA при физиологическом pH, подвержены воздействию эффекта высоких уровней мишень-опосредованного распределения препарата (TMDD) в крови. Этот эффект усугубляется склонностью VISTA рециркулировать через внутриклеточные эндосомы, что приводит к интернализации и деградации анти-VISTA антител. Этот вторичный эффект особенно проблематичен для антител с нарушенным связыванием при кислом pH, что можно наблюдать для антител, которые связываются с поверхностью богатого гистидином лиганда VISTA. Оба эффекта приводят к уменьшению количества анти-VISTA антител в кровотоке, уменьшая количество антител, которые попадут в опухоль, и, следовательно, предполагаемую биологическую активность антитела. Во-вторых, антитела, которые связываются с VISTA при физиологическом pH и обладают эффекторными функциями, такими как индукция антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) или доставка иммуномодулирующей полезной нагрузки, будут подвергать циркулирующие миеломоноцитарные клетки воздействию этих эффекторных функций, потенциально приводящих к нежелательным эффектам, таким как истощение или активация циркулирующих нейтрофилов. Таким образом, авторы изобретения обнаружили, что антитела, связывающиеся с huVISTA при кислом pH, и незначительно при физиологическом pH, имеют двойное преимущество: (1) они лучше воздействуют на соответствующие участки, такие как опухоли, и (2) они снижают токсичность при наличии эффекторных функций, таких как ADCC, ADCP или доставка иммуномодулирующей полезной нагрузки. Кроме того, поскольку VISTA сам по себе является иммунорецептором, селективным при кислом pH, то для модуляции VISTA лиганд-рецепторной активности, вероятно, нет необходимости в блокаде поверхности связывания лиганда VISTA при физиологическом pH. Следовательно, антитела, которые связываются с huVISTA при кислом pH, но незначительно при физиологическом pH, были получены, как описано ниже.

Пример 8. Выделение анти-VISTA антител, связывающихся с человеческим VISTA преимущественно при кислом pH по сравнению с физиологическим pH.

В этом примере описано получение антител, которые связываются с человеческим VISTA преимущественно при низком (кислом) pH, а не нейтральном или физиологическом pH.

Конструировали библиотеку анти-VISTA антигенсвязывающих фрагментов антител, которые подвергали скринингу следующим образом. Библиотеки антител создавали с использованием генетического материала, полученного от мышей HuMab, иммунизированных полноразмерным человеческим VISTA (hVISTA). Эти антитела форматировали как scFv и отбирали по связыванию с полноразмерным hVISTA при низком pH (pH 6,0) с помощью мПНК дисплея (Xu L et al. (2002) Chemistry & Biology 9:933; Roberts RW и JW Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297; Kurz et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28 (18):E83). Результаты отбора анализировали путем секвенирования следующего поколения (NGS), и идентифицировали членов библиотеки, демонстрирующих улучшенное связывание VISTA при низком pH, которые затем переформатировали как IgG1.3 (константная область IgG1 без эффектора, состоящая из Fc IgG1, имеющего аминокислотные мутации L234A, L235E и G237A) и выполняли скрининг в отношении связывания с VISTA методом ППР.

Анализ с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР, SPR) выполняли для измерения скоростей ассоциации (определяемых как k_{on} , 1/Мс), скоростей диссоциации (определяемых как K_D или k_{off} , s^{-1}) и констант сродства (определяемых как K_D , М) для анти-VISTA Ab при кислых и физиологических значениях pH на приборе Biacore® T200 (GE Healthcare). Белок A (Fisher Scientific, кат. № 21181) разбавляли до 20 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5, и иммобилизовали на проточных кюветах биосенсора CM5 в соответствии с протоколом производителя для связывания амина (GE Healthcare), с целевой плотностью иммобилизации белка A 6000 RU на проточную кювету. Эксперименты ППР проводились при 37°C с использованием подвижного буфера PBST (137 мМ хлорид натрия, 2,7 мМ хлорид калия, 10 мМ фосфатный буфер, 0,05% твин 20) при pH 7,4 и 6,0. Антитела разводили до 20 нМ в PBST с pH 7,4 и иммобилизовали в активных проточных кюветах биосенсора при 5 мкл/мин в течение 50 с. Готовили серийные разведения в пределах концентраций 50-0,2 нМ моновалентного hVISTA-ECD (SEQ ID NO:325), используя подвижный буфер с pH 7,4 и 6,0, и вводили поверх иммобилизованных антител со скоростью 40 мкл/мин для измерения ассоциации и диссоциации. Для регенерации поверхности захвата белка A между циклами анализа использовали две 15-секундные инъекции 10 мМ глицина с pH 1,5. Константы скоростей k_{on} (k_{on}) и K_D (k_{off}) получали из эталонной проточной кюветы и сенсограмм с вычтенным эталонным сигналом при 0 нМ и подгоняли к модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore® T200 Evaluation v.2.0. Для каждого анти-VISTA антитела рассчитывали отношение k_{off} при pH 6/ k_{off} при pH 7,4 для определения антител, имеющих медленные скорости диссоциации при кислом pH и быстрые скорости диссоциации при физиологическом pH.

Шесть антител, переформатированных как антитела IgG1.3, продемонстрировали почти одинаковое сродство как при pH 6, так и при pH 7,4. В частности, два антитела имели более низкую скорость диссоциации при pH 6,0, чем при pH 7,4 (т.е. более высокую k_{off} при pH 7,4, чем pH 6,0). Вариабельные области этих двух анти-huVISTA антител обозначали как P1-061015 и P1-061029, а антитела, содержащие эти вариабельные области и отформатированные как антитела IgG1.3, обозначали как P1-061015.IgG1.3 и P1-061029.IgG1.3, соответственно. Показатели k_{off} для P1-061015.IgG1.3 и P1-061029.IgG1.3 представлены в табл. 1.

Таблица 1
Значения k_{off} выбранных антител при pH 6,0 и 7,0

Обозначение антитела	pH=6 k_{off} (s^{-1})	pH=7 k_{off} (s^{-1})	pH=6/pH=7 k_{off}
P1-061015.IgG1.3	$1,4 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$	0,6
P1-061029.IgG1.3	$4,8 \times 10^{-3}$	$9,1 \times 10^{-3}$	0,5

Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой и легкой цепей P1-061015 и P1-061029 представлены в табл. 2 ниже, а также приведены в таблице последовательностей в конце раздела "Примеры".

Таблица 2

Аминокислотные последовательности анти-huVISTA антител, связывающихся с huVISTA предпочтительно при pH 6,0, а не pH 7,4

ID P1	VH- ген	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
P1- 061015.IgG1.3	3-33	GFTFSSYAMH (остатки 26-35 SEQ ID NO:95)	IIWYDGSNKYYADS VKG (остатки 50-66 SEQ ID NO:95)	DSGFYSSYYFDY (остатки 99-110 SEQ ID NO:95)
P1- 061029.IgG1.3	3-09	GFTLDDYAMH (остатки 26-35 SEQ ID NO:67)	GINWNSANIGYADS VKG (остатки 50-66 SEQ ID NO:67)	VPGYSGGWIDAF DV (остатки 99-112 SEQ ID NO:67)
	VL- ген	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
P1- 061015.IgG1.3	L6	RASQSVSSSYLA (остатки 24-35 SEQ ID NO:96)	DASNRAT (остатки 51-57 SEQ ID NO:96)	QQYNSYPYT (остатки 90-98 SEQ ID NO:96)
P1- 061029.IgG1.3	A27	RASQSVSSSYLA (остатки 24-35 SEQ ID NO:68)	GASSRAT (остатки 51-57 SEQ ID NO:68)	QQYGSSPFT (остатки 90-98 SEQ ID NO:68)

Пример 9. Дальнейшее конструирование анти-VISTA Ab P1-061015 и P1-061029 для разработки антител, селективных при кислых pH.

В этом примере описано дальнейшее конструирование переменных областей P1-061015 и P1-061029, идентифицированных в примере 2, для получения переменных областей анти-huVISTA антител с более высоким отношением k_{off} между связыванием при pH 6,0 и 7,4.

Конструировали две библиотеки путем введения специфических мутаций в CDR VH P1-061015 и P1-061029, соответственно. В библиотеках допускались только аминокислотные замены, которые с наибольшей вероятностью улучшают связывание при низком pH, т.е. аспартат, глутамат и гистидин. В библиотеке также учитывались одинарные и двойные аминокислотные замены в каждой CDR и рекомбинации между CDR (максимум 6 аминокислотных замен на цепь). На фиг. 7A показаны мутации, введенные в аминокислотные последовательности CDR3 тяжелой цепи P1-061029 для формирования библиотеки P1-061029. На чертеже показано, что определенные последовательности были исключены, чтобы избежать введения каких-либо негативных признаков (liabilities) (например, DG).

Библиотеки '029 и '015 подвергали скринингу в течение нескольких циклов связывания с полноразмерным huVISTA при pH 6,0 путем представления на поверхности дрожжей. Дальнейшие циклы отбора проводили путем чередования циклов положительного (связывание с huVISTA при pH 6,0) и отрицательного (связывание с huVISTA при pH 7,4) (показано на фиг. 7B) отбора, при котором члены библиотеки, которые не связывались с VISTA при pH 7,4, собирали в циклах отрицательного отбора. Результаты отбора анализировали с помощью NGS-секвенирования. Члены библиотеки '029, которые связывались с huVISTA при pH 6,0 после 9-го цикла отбора, анализировали на связывание с человеческим VISTA при pH 6,0 и pH 7,4 методом проточной цитометрии. На фиг. 7C представлены типичные двумерные графики, полученные по результатам проточной цитометрии, показывающие пул вариантов после 9 циклов отбора. Связывание VISTA показано на оси Y, а экспрессия варианта антитела показана на оси X. Показаны результаты связывания при различных концентрациях антител и pH. Согласно приведенным результатам, связывание с человеческим VISTA является в высокой степени селективным при pH 6, в частности при 20 nM.

Из библиотеки '029 были выделены дополнительные клоны-потомки '029 с помощью другого метода. Некоторые клоны были такими же, как те, которые были идентифицированы первым методом, и было выделено девять дополнительных клонов.

19 клонов, выделенных из библиотеки '029, отобранных для дальнейшего анализа, переформатировали как антитела IgG1.3. Аминокислотные различия в CDR тяжелых цепей этих клонов относительно различий в CDR VH '029 показаны в табл. 5.

Таблица 5

Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VH (разделенные знаком подчеркивания) антител, полученных из родительского антитела '029

P1-061029	GFTLDDYAMH_GINWNSANIGYADSVKG_VPGYSGGWIDAFDV	67
P1-068757	—E—E—_—EE—_—_—E—D	71
P1-068759	—E—E—_—D—E—_—_—E—D	87
P1-068761	—E—E—_—EE—_—_—H—E—	51
P1-068763	—E—_—_—D—E—_—_—H—E—	91
P1-068765	—DE—_—_—EE—_—_—E—D	63
P1-068767	—E—_—_—D—E—_—_—E—D	55
P1-068769	—E—E—_—DH—_—_—E—D	83
P1-068771	—E—E—_—HE—_—_—E—D	75
P1-068773	—E—_—_—D—D—_—_—E—D	59
P1-068775	—E—E—_—D—EE—_—_—H—E—D	79
P1-069059	—E—_—_—DH—_—_—E—D	11
P1-069061	—E—_—_—E—_—_—E—D	15
P1-069063	—E—_—_—E—_—_—D—E	19
P1-069065	—E—E—_—DD—_—_—	23
P1-069067	—_—_—_—EE—_—_—D—E	27
P1-069069	—_—_—_—EE—_—_—D—	31
P1-069071	—E—E—_—D—_—_—E—	35
P1-069073	—E—_—_—D—D—_—_—E—D	39
P1-069075	—E—_—_—D—E—_—_—H—E—	43
P1-069077	—E—E—_—DE—_—_—	47

Название CDR1 CDR2 CDR3 SEQ ID NO (положение 26-35) (положение 50-66) (положение 99-110).

Связывание нескольких препаратов каждого из клонов-потомков '029 и родительских антител '029, отформатированных как IgG1.3 антитело, с человеческим VISTA при pH 6,0 и 7,4 измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР, SPR). Анализ ППР выполняли для измерения k_{off} и K_D сродства связывания для VISTA Ab при кислых и нейтральных pH на приборе Biacore® T100 (GE Healthcare). Белок A (ThermoFisher Scientific, кат. № 21181) разбавляли до 20 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5, и иммобилизовали на проточных кюветах биосенсора CM5 в соответствии с инструкциями производителя для связывания амина (GE Healthcare) с целевой плотностью иммобилизации белка A 2000 RU на проточную ячейку. Эксперименты ППР выполняли при 37°C с использованием подвижного буфера PBST (137 мМ хлорид натрия, 2,7 мМ хлорид калия, 10 мМ фосфатный буфер, 0,05% Tween® 20) при pH 7,4 и 6,0. Антитела разводили до 25 нМ в PBST pH 7,4 и иммобилизовали в активных проточных кюветах биосенсора при 5 мкл/мин в течение 60 с. Готовили серийные разведения в пределах концентраций 50-5 нМ моновалентного hVISTA-ECD (SEQ ID NO:325), используя подвижный буфер с pH 7,4 и 6,0, и вводили поверх иммобилизованных антител со скоростью 40 мкл/мин для измерения ассоциации и диссоциации. Для регенерации поверхности захвата белка A между циклами анализа использовали две 15-секундные инъекции 10 мМ глицина pH 1,5. Константы скоростей k_a (k_{on}) и K_D (k_{off}) получали из эталонной проточной кюветы и сенсограмм с вычтенным эталонным сигналом при 0 нМ и подгоняли к модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore® T200 Evaluation v.2.0. Для каждого антитела VISTA рассчитывали константу сродства, K_D , как отношение констант скоростей $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$.

Для каждого антитела определяли максимальный (или величину) ответ связывания с человеческим VISTA как точечный ответ "связывания" с вычтенным эталонным сигналом в конце инъекции 50 нМ VISTA и записывали в единицах ответа (RU). Максимальный ответ связывания человеческого VISTA (RU) для каждого антитела показан на фиг. 7D. Среднее значение ответа связывания (для 2-4 копий антител) наносили на график, где планка погрешностей представляет стандартное отклонение. Результаты показывают, что отобранные клоны потомства '029 связываются с hVISTA при pH 6,0, но не при pH 7,4 (все пустые кружки, представляющие связывание при pH 7,4, расположены в нижней части графика, за исключением родительского клона '029).

Скорости k_{off} при pH 6,0 для '029 и его клонов-потомков определяли методом ППР, как описано выше, которые показаны на фиг. 7E. Пунктирная линия на чертеже означает скорость k_{off} '029; клоны слева от пунктирной линии имеют более низкую скорость k_{off} при pH 6,0 по сравнению с таковой у родительского антитела '029, в то время как клоны, расположенные с правой стороны имеют более высокую скорость k_{off} при pH 6,0 по сравнению с таковой у родительского антитела '029.

Типичные полученные ППР сенсограммы связывания hVISTA с антителами '029, '761 и '767 при нейтральном и кислом pH показаны на фиг. 7F. Сенсограммы hVISTA при 50 нМ и 5 нМ с вычтенным эталонным сигналом представлены в виде графика. При нейтральном pH сигнал связывания VISTA с '761

и '767 был <10 RU, и для возможности адекватного измерения и выполнения сравнения значений k_{off} и K_D у '761 и '767 с соответствующими значениями у '029 потребовался кинетический анализ ППР с использованием мкМ концентраций VISTA при физиологическом pH.

Для этого анализа '029, '761 и '767 переформатировали как изотип hIgG1f и экспрессировали как в стандартном hIgG1f, так и в афукозилированном формате hIgG1f для сравнения с Fc hIgG1.3f. Кинетический анализ НИР проводили для измерения k_{off} и K_D сродства связывания для VISTA Ab при кислом и физиологическом pH на приборе Biacore® T100 (GE Healthcare). Белок А (ThermoFisher Scientific, кат. № 21181) разбавляли до 20 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5, и иммобилизовали на проточных кюветах биосенсора CM5 в соответствии с протоколом производителя для связывания амина (GE Healthcare) с целевой плотностью иммобилизации белка А 2000 RU на проточную кювету. Эксперименты ППР проводили при 37°C с использованием подвижного буфера PBST (137 мМ хлорид натрия, 2,7 мМ хлорид калия, 10 мМ фосфатный буфер, 0,05% твин 20) при pH 7,4 и 6,0. Антитела разбавляли до 25 нМ в PBST, pH 7,4 и иммобилизовали в активных проточных клетках биосенсора при 5 мкл/мин в течение 45 с. Готовили серийные разведения в пределах концентраций 1600-0,78 нМ (pH 7,4) и 100-0,78 нМ (pH 6,0) моновалентного hVISTA-ECD (SEQ ID NO:325), используя подвижный буфер, и вводили поверх иммобилизованных антител со скоростью 40 мкл/мин для измерения ассоциации и диссоциации. Для регенерации поверхности захвата белка А между циклами анализа использовали две 15-секундные инъекции 10 мМ глицина с pH 1,5. Константы скоростей k_a (kon) и K_D (koff) получали из эталонной проточной кюветы и сенсограмм с вычтенным эталонным сигналом при 0 нМ и подгоняли к модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore® T200 Evaluation v.2.0. Константу сродства, K_D , рассчитывали для каждого анти-VISTA антитела в виде отношения скоростей koff/koff. Для сравнения скоростей диссоциации и улучшения сродства при кислом pH относительно физиологического pH рассчитывали соотношения k_{off} и K_D при pH 7,4/pH 6,0. В то время как ранее, в случае использования 50 нМ hVISTA, для '761 и '767 невозможно было определить константы скорости связывания при нейтральном pH (фиг. 7D и 7F), увеличение диапазона концентрации VISTA при нейтральном pH до 1,6 мкМ обеспечило ответное связывание (> 10 RU) этих клонов, которое соответствовало модели связывания 1:1. Кинетические данные для этих анти-VISTA антител, селективных при кислом pH, приведены в табл. 6. Родительское антитело '029 демонстрирует эквивалентный k_{off} при обоих pH, в то время как '761 и '767 демонстрируют селективность, выраженную более чем 10-кратным увеличением значения k_{off} при pH 6 по сравнению с таковым при pH 7,4, и более чем в 2000-кратным увеличением значения K_D при pH 6 по сравнению с таковой при pH 7,4. Константы скорости связывания человеческого VISTA у вариантов изотипа hIgG1.3f, hIgG1f и афукозилированного hIgG1f являются одинаковыми.

Таблица 6
Характеристики связывания анти-VISTA
антител, определенные методом ППР

Антитело	Изотип	pH 7,4			pH 6,0			Отношение kd (7.4/6)	Отношение KD (7.4/6)
		ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)		
P1- 061029	hIgG1.3f	1,6E+05	6,8E-03	4,2E-08	1,1E+06	7,9E-03	7,2E-09	0,9	5,8
	hIgG1f	1,7E+05	7,4E-03	4,2E-08	1,1E+06	8,0E-03	7,1E-09	0,9	5,9
	hIgG1f								
	афуко- зилирова нное	1,7E+05	7,2E-03	4,1E-08	1,1E+06	7,8E-03	6,9E-09	0,9	5,9
P1- 068761	hIgG1.3f	3,8E+03	4,2E-02	1,1E-05	3,7E+05	1,6E-03	4,3E-09	26,3	2558,1
	hIgG1f	1,2E+03	4,2E-02	3,5E-05	3,6E+05	1,5E-03	4,2E-09	28,0	8333,3
	hIgG1f								
	афуко- зилирова нное	5,1E+03	4,2E-02	8,2E-06	3,7E+05	1,5E-03	4,1E-09	28,0	2000,0
P1- 068767	hIgG1.3f	1,9E+03	3,6E-02	1,9E-05	3,3E+05	2,6E-03	7,8E-09	13,8	2435,9
	hIgG1f	1,5E+03	3,2E-02	2,2E-05	3,2E+05	2,6E-03	8,0E-09	12,3	2750,0
	hIgG1f								
	афуко- зилирова нное	1,3E+03	3,3E-02	2,4E-05	3,3E+05	2,6E-03	7,9E-09	12,7	3038,0

	зильро нное								
α-VISTA, чувствит. к кислоте pH	hIgG1.3f	2,2E+ 05	7,8E -04	3,6E- 09	2,8E+0 6	9,0E -02	3,2E -08	0,01	0,1

Кинетику связывания человеческого VISTA у '029, '761 и '767 (в виде антител IgG1.3) измеряли при значениях pH между pH 7,4 и pH 6,0, т.е. при pH 6,9 и pH 6,45 с помощью прибора Biacore® T100 (GE Healthcare). Белок А (ThermoFisher Scientific, кат. № 21181) разбавляли до 20 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5, и иммобилизовали на проточных кюветах биосенсора CM5 в соответствии с протоколом производителя для связывания амина (GE Healthcare) с целевой плотностью иммобилизации белка А 2000 RU на проточную кювету. Анализ выполняли при 37°C с помощью подвижного буфера PBST (137 мМ хлорид натрия, 2,7 мМ хлорид калия, 10 мМ фосфатный буфер, 0,05% Твин 20) при pH 7,4, 6,9, 6,45 и 6,0. Антитела разбавляли до 25 нМ в PBST pH 7,4 и иммобилизовали в активных проточных кюветах биосенсора при 5 мкл/мин в течение 45 с. Готовили серийные разведения в пределах концентраций 100-0,78 нМ моновалентного hVISTA-ECD (SEQ ID NO:325), используя подвижный буфер с pH 7,4, 6,9, 6,45 и 6,0, и вводили поверх иммобилизованных антител со скоростью 40 мкл/мин для измерения ассоциации и диссоциации. Для регенерации поверхности захвата белка А между циклами анализа использовали две 15-секундные инъекции 10 мМ глицина с pH 1,5. Константы скоростей k_a (k_{on}) и K_D (k_{off}) получали из эталонной проточной кюветы и сенсограмм с вычтенным эталонным сигналом при 0 нМ и подгоняли к модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore® T200 Evaluation v.2.0. Константу сродства, K_D , рассчитывали для каждого анти-VISTA антитела в виде отношения скоростей k_{off}/k_{on} . Для оценки характера изменения k_{off} и K_D VISTA по мере смещения pH буфера к физиологическому значению вычисляли отношения k_{off} и K_D при каждом pH относительно pH 6,0, которые приведены в табл. 7. Родительское антитело '029 демонстрировало постоянную k_{off} при каждом протестированном pH, тогда как у клонов-потомков '761 и '767 k_{off} в отношении VISTA было, по меньшей мере, в 10 раз выше, а K_D в 100 раз слабее при pH 6,9 по сравнению с pH 6,0. По мере изменения pH буфера от кислого к физиологическому, у '761 и '767 наблюдали ослабление как k_{off} , так и K_D в отношении VISTA. Данные сравнения для '761 и '767 при физиологическом pH приведены в табл. 7 и отмечены звездочкой (*).

Таблица 7

Кинетические характеристики связывания антител
'029, '761 и '767 при различных значениях pH

Антитело	pH	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	Отношение k_{off} для pH 6,0	Отношение K_D для pH 6,0
P1-061029 (родительское)	6,0	2,9E+06	5,7E-03	2,0E-09	1,0	1,0
	6,45	7,4E+05	4,0E-03	5,3E-09	0,7	2,7
	6,9	4,1E+05	5,7E-03	1,4E-08	1,0	7,1
	7,4	2,5E+05	6,4E-03	2,6E-08	1,1	13,2
P1-068761	6,0	6,0E+05	6,6E-04	1,1E-09	1,0	1,0
	6,45	1,1E+05	2,1E-03	2,0E-08	3,2	18,4
	6,9	4,8E+04	8,9E-03	1,9E-07	13,4	170
	7,4*	3,8E+03	4,2E-02	1,1E-05	~63,6	~10000
P1-068768	6,0	5,6E+05	1,9E-03	3,4E-09	1,0	1,0
	6,45	1,3E+05	4,8E-03	3,8E-08	2,5	11,0
	6,9	7,4E+04	2,9E-02	4,0E-07	15,3	115,1
	7,4*	1,9E+03	3,6E-02	1,9E-05	~19,0	~5000

Данные в табл. 7 показывают, что сродство связывания у '761 и '767 с hVISTA при pH 6,45 ниже по меньшей мере более чем в 10 раз по сравнению с pH 6,0; сродство связывания у '761 и '767 с hVISTA при pH 6,9 по меньшей мере, более чем в 100 раз ниже по сравнению с pH 6,0; и сродство связывания у '761 и '767 с hVISTA при pH 7,4 по меньшей мере более чем в 1000 раз ниже по сравнению с pH 6,0.

Библиотека '015 также продемонстрировала небольшое предпочтение селективного связывания с VISTA при pH 6. Аминокислотные различия клонов-потомков относительно CDR VH '015 показаны в табл. 8. Связывание нескольких препаратов каждого из клонов-потомков '015 и родительского '015 (все в виде антител IgG1.3) с человеческим VISTA при pH 6,0 и 7,4 измеряли методом ППР аналогично тому, как описано для анализа '029 выше, и данные приведены в табл. 8.

Таблица 8
Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VH антител (разделенных знаком подчеркивания), полученных из родительского антитела '015

P1-061015 GFTFSSYAMH IPWYDGSNKYYADSVKG_DSGFYSSYYFDY 95
P1-068736 E _ D _ D _ D 107
P1-068738 E H _ D H _ ED 131
P1-068740 D _ D D _ D D 115
P1-068742 D _ D D _ ED 119
P1-068744 E _ H _ E _ E E 103
P1-068746 _ _ HH _ D 123
P1-068748 HH _ DD _ D 99
P1-068750 D D _ E D _ EE 127
P1-068752 _ E _ D _ D E 111
P1-068754 D D _ E D _ H D 135

Название CDR1 CDR2 CDR3 SEQ ID NO (полож. 26-35) (полож. 50-66) (полож. 99-110).

Сводные данные по кинетике связывания '029 и '015 и их клонов-потомков с huVISTA при pH 6,0 и 7,4, определенные методом ППР, показаны в табл. 9 и 10.

Таблица 9
Сводные данные по кинетике huVISTA и последовательности CDR VH клона '029 и его потомства

ID	Ср. 7,4 ka (1/Мс)	Ср. 7,4 kd (1/с)	Ср. 7,4 KD (M)	Ср. 6,0 ka (1/ Mc)	Ср. 6,0 kd (1/с)	Ср. 6.0 KD (M)	VH CDR 1 (пол. 26-35)	VH CDR 2 (полож ение 50-66)	VH CDR 3 (полож ение 99- 110)	SEQ ID NO
P1-069077	6,0E+04	1,9E-03	3,1E-08	6,3E+05	1,2E-04	1,9E-10	...E.E...	DE.....		47
P1-069065	5,9E+04	2,3E-03	3,9E-08	5,7E+05	2,2E-04	3,8E-10	...E.E...	DD.....		23
P1-069075	1,3E+05	2,3E-03	1,8E-08	1,3E+06	2,9E-04	2,2E-10	...E.....	...D..E.....	H..... E..	43
P1-069071	4,3E+04	4,0E-03	9,3E-08	7,0E+05	5,1E-04	7,3E-10	...E.E...	D...	E..... ...	35
P1-069061	Слабая, быстрая kd			4,3E+05	1,1E-03	2,5E-09	...E.....	E...	 E.D	15
P1-069069	9,0E+04	7,5E-03	8,4E-08	1,4E+06	1,2E-03	8,6E-10		EE..	 D..	31
P1-068761	Слабая, быстрая kd			3,8E+05	1,4E-03	3,8E-09	...E.E...	EE..	H..... E..	51

P1-069059	Слабая, быстрая kd			3,4E+05	1,6E-03	4,8E-09	...E....	DH.	 E.D	11
P1-068767	Слабая, быстрая kd			3,4E+05	2,6E-03	7,6E-09	...E....	..D...E..	 E.D	55
P1-068773	Слабая, быстрая kd			3,0E+05	2,9E-03	9,4E-09	...E....	..D...D..	 E.D	59
P1-069063	1,2E+05	2,7E-02	2,3E-07	1,9E+06	4,4E-03	2,4E-09	...E....	E..	 D.E	19
P1-069067	1,0E+05	2,7E-02	2,9E-07	1,7E+06	4,5E-03	2,7E-09		EE..	 D.E	27
P1-069073	Слабая, быстрая kd			6,1E+05	5,8E-03	9,4E-09	...E.E...	E..	 E..	39
P1-061029	2,9E+05	5,6E-03	1,9E-08	1,6E+06	5,8E-03	3,6E-09	GFTLD DYAM H	GINW NSANI GYAD SVKG	VPGY SGGW IDAFD V	67
P1-068765	Связывание отсутствует			3,7E+05	7,0E-03	1,9E-08	...DE.... .	EE..	 E.D	63
P1-068757	Связывание отсутствует			8,9E+05	1,7E-02	1,9E-08	...E.E...	EE..	 E.D	71
P1-068771	Связывание отсутствует			7,6E+05	1,8E-02	2,5E-08	...E.E...	HE..	 E.D	75
P1-068769	Связывание отсутствует			8,1E+05	4,0E-02	5,5E-08	...E.E...	DH.	 E.D	83
P1-068775	Связывание отсутствует			1,8E+06	4,7E-02	2,3E-08	...E.E...	..D...EE	H..... E.D	79
P1-068759	Связывание отсутствует			1,3E+06	8,0E-02	6,0E-08	...E.E...	..D...E..	 E.D	87

Таблица 10

Сводные данные по кинетике huVISTA и последовательности CDR VH клона '015 и его потомства

Клон	Ср. 7,4 ka (1/Mc)	Ср. 7,4 kd (1/s)	Ср. 7,4 KD (M)	Ср. 6,0 ka (1/Mc)	Ср. 6,0 kd (1/c)	Ср. 6,0 KD (M)	Последовательность HCDR (пол. 26-35) (пол. 50-66) (пол. 99-110)	SEQ ID NO
P1-061015	2,3E+05	2,0E-03	8,8E-09	1,8E+06	9,5E-04	5,4E-10	GFTFSSYAM H_IIWYDGS NKYYADSV KG_DSGFYS SYFDY	95
P1-068748	Связывание отсутствует			1,4E+06	1,5E-03	1,0E-09	HH..... DD.....D..	99
P1-068744				1,3E+06	1,8E-03	1,3E-09	E...H..... E.....E..... E	103
P1-068736				8,4E+06	9,5E-03	1,1E-09	E...D..... D.....D..... D	107
P1-068752				6,1E+06	3,4E-02	5,6E-09	E..... D.....D..... E	111
P1-068740				Очень быстрое	4,7E-02	ND	D.....D.. D.....D..... D	115
P1-068742				Очень быстрое	>1E-02	ND	D.....D.. D.....ED..	119

				...	
P1- 068746	Очень быстрое	>1E- 02	ND	H.....H H.....D..... .	123
P1- 068750	Слабое			D.D..E..D.. EE.....	127

Таким образом, было идентифицировано несколько клонов-потомков '029, которые либо сохраняли, либо улучшали k_{off} в отношении VISTA-ECD при pH 6,0 по сравнению с родительским '029, а также демонстрировали более слабую k_{off} или потерю связывания с VISTA при физиологическом pH. Клоны-потомки '015 показали связывание с VISTA-ECD, селективное при кислом pH, при этом не было обнаружено связывание с VISTA при нейтральном pH, но все проанализированные клоны-потомки '015 имели более быструю k_{off} при pH 6,0 по сравнению с родительским '015.

Пример 10. Клоны-потомки '029, селективные при кислом pH, демонстрируют связывание клеток, зависимое от кислого pH, и эффекторную функцию при сохранении блокирующей VISTA активности.

Измеряли pH-зависимое связывание клонов '761 и '767 с клетками Raji, сконструированными для эктопической экспрессии полноразмерного человеческого VISTA (SEQ ID NO:1 с заменой D187E). Для этого эксперимента '761 и '767 были отформатированы как антитела IgG1.3, и связывание измеряли с помощью вторичного антитела к человеческому IgG (Jackson ImmunoResearch кат. № 109-065-098). Результаты, приведенные на фиг. 8А, 8В, показывают, что клоны '761 (фиг. 8А) и '767 (фиг. 8В) плохо связываются при pH 7,2 и 8,1, но лучше при кислом pH, особенно при pH 6,0, 6,1, 6,2 и 6,4. Значения MFI связывания показаны на оси Y, а концентрации первичных антител показаны на оси X в логарифмическом масштабе. Также показаны нелинейные регрессии.

На фиг. 8С показаны данные из эксперимента, описанного на фиг. 8А, В, по измерению связывания P1-068767 (кружки) и неспецифического контрольного антитела соответствующего изотипа (треугольники) с клетками Raji, экспрессирующими человеческий VISTA, при 3125 нг/мл при различных pH. "PH50", pH, при котором теряется 50% связывания P1-068767, составляет примерно 6,6. Значения MFI связывания показаны на оси Y, а pH буфера - на оси X. Также показаны нелинейные регрессии.

На фиг. 8D показана MFI связывания неспецифического контрольного антитела соответствующего изотипа (окрашенные и неокрашенные кружки для pH 7,0 и 6,0, соответственно), анти-VISTA mAb 2 ("контроль", см. фиг. 6С, окрашенные и неокрашенные кружки квадраты для pH 7,0 и 6,0, соответственно), P1-068761 (окрашенные и неокрашенные кружки треугольники для pH 7,0 и 6,0, соответственно) и P1-068767 (окрашенные и неокрашенные кружки перевернутые треугольники для pH 7,0 и 6,0, соответственно) с человеческими моноцитами. Связывание определяли, как описано на фиг. 8А, В. Неселективное контрольное антитело VISTA (mAb 2) связывалось с моноцитами при обоих значениях pH. Оба сконструированных антитела, селективных при кислом pH, хорошо связывались с моноцитами при pH 6,0, но не связывались при pH 7,0 лучше, чем неспецифическое контрольное антитело соответствующего изотипа. Таким образом, клоны '761 и '767 имеют слабое связывание или не связываются с VISTA при нейтральном pH, но селективно связываются с VISTA на клетках при кислом pH.

На фиг. 8Е показано сопоставимое блокирование связывания рекомбинантного мультимера VISTA с активированными человеческими CD4⁺ Т-клетками при pH 6,0 антителами '029 (квадраты), '761 (треугольники) и '767 (перевернутые треугольники), в то время как не специфическое к VISTA контрольное антитело (кружки) не блокирует связывание VISTA. Этот анализ блокирования выполняли, как описано в Примере 4. Эти данные показывают, что сконструированные анти-VISTA антитела, селективные при кислом pH, все еще способны блокировать VISTA лиганд рецепторное связывание при кислом pH.

Опосредованный NK-клетками специфический лизис клеток-мишеней (те же самые клетки Raji, экспрессирующие человеческий VISTA, описанные на фиг. 8А, В) через антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) при физиологическом pH измеряли для P1-061029.IgGlf, P1-068761.IgGlf, P1-068767.IgGlf антител, не специфического к VISTA антитела и не специфического к VISTA антитела отрицательного контроля, причем все антитела экспрессируются как афукозилированные антитела IgG1. NK-клетки обогащали из PBMC путем отрицательного отбора гранул (StemCell Technologies, кат. № 19055) и культивировали в течение ночи в среде Myelocult™ (StemCell Technologies кат. № 05150) с добавлением 1 мкМ гидрокортизона (StemCell Technologies кат. № 07904) и 500 ед./мл рекомбинантного человеческого IL-2 (Peprotech кат. № 200-02). В день анализа клетки Raji, эктопически экспрессирующие человеческий VISTA (описанные на фиг. 8А, В), метили Calcein AM (Life Technologies кат. № C3100MP) и совместно культивировали с культивируемыми NK-клетками при 10:1 отношении NK:клетки-мишени и с антителами P1-061029.IgGlf, P1-068761.IgGlf, P1-068767.IgGlf, не специфическим к VISTA антителом и не специфическим к VISTA антителом отрицательного контроля в течение 2 ч при физиологическом pH. Специфический лизис интерполировали по сигналу флуоресценции супернатанта (планшетный ридер EnVision™). Сигнал спонтанного лизиса, полученный при совместном культивировании без антител, и максимальный сигнал лизиса определяли по лизису клеток-мишеней с помощью буфера для лизиса Delia® (PerkinElmer, кат. № 4005-0010). Антитело-специфический лизис рассчитывали в виде процента от

наблюдаемого лизиса, деленного на (максимальный сигнал лизиса минус сигнал спонтанного лизиса).

Результаты, представленные на фиг. 8F, показывают пониженную активность P1-068761.IgGlf и P1-068767.IgGlf по сравнению с активностью P1-061029 и положительного контроля, опосредованную анти-тело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC), при физиологическом pH.

Пример 11. PK анти-VISTA антител яванского макака.

Яванским макакам, наивным по человеческим антителам, вводили внутривенно однократную дозу, равную 5 мг/кг массы тела, либо анти-VISTA антитело, которое сопоставимо связывается при кислом и нейтральном pH ("контроль"; mAb2), либо анти-VISTA антитело с нарушенным связыванием при кислом pH ("чувствительное к кислому pH", MAb3), либо селективное при кислом pH антитело 767 для определения фармакокинетических параметров (PK) этих антител у яванского макака.

Представленную в табл. 11 кинетику связывания использованных в этом примере антител, полученную методом ППР определяли следующим образом. Перекрестную реактивность Cyно VISTA для селективного при кислом pH антитела и контрольного анти-VISTA антитела оценивали при кислом и нейтральном pH. Измерения сродства связывания для VISTA Ab выполняли с помощью прибора Biacore® T100 (GE Healthcare). Белок A (ThermoFisher Scientific кат. № 21181) разбавляли до 20 мкг/мл в 10 mM ацетате натрия, pH 4,5, и иммобилизовали на проточных кюветах биосенсора CM5 в соответствии с протоколом производителя для связывания амина (GE Healthcare) с целевой плотностью иммобилизации белка 2000 RU на проточную кювету. Анализ выполняли при 37°C, используя подвижный буфер PBST (137 mM хлорид натрия, 2,7 mM хлорид калия, 10 mM фосфатный буфер, 0,05% Твин 20) при pH 7,4 и 6,0. Антитела (отформатированные как антитела IgG1.3) разбавляли до 25 nM в PBST, pH 7,4, и иммобилизовали в активных проточных кюветах биосенсора при 5 мкл/мин в течение 45 с. Готовили серийные разведения в пределах концентраций 1600-0,78 nM (pH 7,4) и 100-0,78 nM (pH 6,0) моновалентного hVISTA-ECD (SEQ ID NO:325) и cyно VISTA-ECD (AFKVATLYSL YVCPEGQNVT LTCRVFGPVD KGHDVTFYKT WYRSSRGEVQ TCSERRPIRN LTFQDLHLHH GGHQAANTSH DLAQRHGLS ASDHHGNFSI TMRNLTLTLD GLYCCLVVEIRHHHSEHRVH GAMELQVQTG KDAPSSCVAY PSSSQE-SENI TАНННННННННН (SEQ ID NO:326), используя подвижный буфер, и вводили поверх иммобилизованных антител со скоростью 40 мкл/мин для измерения ассоциации и диссоциации. Для регенерации поверхности захвата белка A между циклами анализа использовали две 15-секундные инъекции 10 mM глицина с pH 1,5. Константы скоростей k_a (k_{on}) и K_D (k_{off}) получали из эталонной проточной кюветы и сенсограмм с вычтенным эталонным сигналом при 0 nM и подгоняли к модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore® T200 Evaluation v.2.0. Для каждого анти-VISTA антитела рассчитывали константу сродства, K_D , как отношение k_{off}/k_{on} . Для сравнения различий между скоростью диссоциации и сродством при кислом pH относительно нейтрального pH вычисляли отношения k_{off} и K_D при pH 7,4/pH 6,0, которые представлены в табл. 11. Все протестированные анти-VISTA антитела показали сопоставимые (в пределах 2-кратного значения) параметры кинетического связывания человеческого и cyно VISTA при обоих протестированных значениях pH, что является подтверждением наличия перекрестной реактивности с cyно VISTA. Оба контрольных анти-VISTA антитела показали улучшенные K_D и более сильные K_D при физиологическом pH по сравнению с кислым pH, а контроль, чувствительный к кислому pH, показал более быстрый K_D для VISTA при кислом pH по сравнению с контрольным антителом.

Таблица 11

ПНР кинетика связывания анти-VISTA антител с супо VISTA

Антитело	VISTA A	pH 7.4			pH 6.0			Отношение k_d (7,4/6)	Отношение K_D (7,4/6)
		k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (M)	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (M)		
P1-061029	челов.	1,2E+05	7,5E-03	6,2E-08	9,8E+05	6,6E-03	6,8E-09	1,1	9,1
	яванс к. макак	1,4E+05	6,7E-03	4,7E-08	6,2E+05	6,2E-03	1,0E-08	1,1	4,7
P1-068761	челов.	4,3E+03	3,7E-02	8,7E-06	3,5E+05	1,4E-03	4,1E-09	26,4	2122,0
	яванс к. макак	6,5E+03	3,6E-02	5,5E-06	2,1E+05	1,7E-03	7,9E-09	21,2	696,2
P1-068767	челов.	1,6E+03	3,5E-02	2,3E-05	3,2E+05	2,4E-03	7,5E-09	14,6	3066,7
	яванс к. макак	1,3E+03	3,4E-02	2,6E-05	1,9E+05	2,5E-03	1,3E-08	13,6	2000,0
α -VISTA A контроль (mAb 3)	челов.	4,4E+05	1,3E-03	3,0E-09	9,6E+05	6,0E-03	6,2E-09	0,2	0,5
	яванс к. макак	4,9E+05	1,7E-03	3,4E-09	5,5E+05	7,1E-03	1,3E-08	0,2	0,3
α -VISTA A, чувств. к кисло	челов.	1,8E+05	7,8E-04	4,3E-09	1,8E+06	5,0E-02	2,8E-08	0,02	0,2
	яванс к. макак	1,9E+05	6,8E-04	3,5E-09	1,2E+06	5,2E-02	4,4E-08	0,01	0,08
му pH (mAb 2)									

Яванским макакам, наивным по человеческим антителам, вводили внутривенно однократную дозу, равную 5 мг/кг массы тела, либо VISTA mAb2 ("контроль"), либо VISTA mAb3 ("чувствительное к кислой среде"), либо P1-068767.IgG1.3. Концентрация каждого антитела в сыворотке после инъекции показана на фиг. 9. Среднее время пребывания P1-068767.IgG1.3 и контрольного анти-VISTA антитела составило 717 и 22 ч, соответственно, что указывает на то, что селективность при кислом pH значительно снижала TMDD антитела к человеческому VISTA. Хотя контрольное антитело (mAb 2) и чувствительное к кислому pH антитело (mAb 3) связывались с VISTA на сопоставимом уровне при физиологическом pH, чувствительное к кислому pH антитело имело более низкое среднее время пребывания, равное 7,6 ч, что демонстрирует важность связывания при кислом pH для рециркуляции анти-VISTA антитела, как описано в примерах 6 и 7. Результаты показывают, что селективные к кислому pH антитела демонстрируют превосходный PK-профиль и, таким образом, легче связываются с мишенью в опухолях или других микроокружениях.

Пример 12. pH-Селективные клоны-потомки '029 не связываются неспецифическим образом с белками с высоким pI.

Специфичность связывания клонов '029, '761 и '767 с VISTA и другими белками с высоким pI оценивали методом ПНР при нейтральном и кислом pH на приборе Biacore® T100 (GE Healthcare). Белок A (ThermoFisher Scientific кат. № 21181) разбавляли до 20 мкг/мл в 10 mM ацетате натрия, pH 4,5, и иммобилизовали на проточных кюветах биосенсора CM3 в соответствии с протоколом производителя для связывания амина (GE Healthcare) с целевой плотностью иммобилизации белка 800 RU на проточную кювету. Эксперименты ПНР проводили при 25°C с использованием подвижного буфера PBST (137 mM хлорид натрия, 2,7 mM хлорид калия, 10 mM фосфатный буфер, 0,05% Твин 20) при pH 7,4 и 6,0. Антитела (отформатированные как антитела IgG1.3) разводили до 50 нМ в PBST pH 7,4 и иммобилизовали в активных проточных кюветах биосенсора при 5 мкл/мин в течение 60 с. Готовили серийные разведения в пределах концентраций 100-10 нМ моновалентного hVISTA-ECD (SEQ ID NO:325), авидина (ThermoFisher Scientific кат. № 21128), цитохрома C (Sigma кат. № C2867), BSA (Calbiochem кат. № 126593) и моновалентного контрольного антигена ("Ag"), используя подвижный буфер с pH 7,4 и 6,0, и вводили

поверх иммобилизованных антител со скоростью 50 мкл/мин для оценки специфичности связывания. Для регенерации поверхности захвата белка А между циклами анализа использовали две 15-секундные инъекции 10 мМ глицина с pH 1,5. Эталонную проточную кювету и сенсограмм с вычтенным эталонным сигналом при 0 нМ проверяли с помощью программного обеспечения Biacore® T200 Evaluation v.2.0. Результаты показаны в табл. 12.

Таблица 12
Связывание клонов VISTA с белками, имеющими высокий pI

Образец	Изоэл. точка (pI)	'029		'761		'767		Анти-Ag		PBS (без Ab)	
		pH 6	pH 7,4	pH 6	pH 7,4	pH 6	pH 7,4	pH 6	pH 7,4	pH 6	pH 7,4
huVISTA-His	6.9										
Авидин	10										
цитохром С	10.7										
BSA	4.7										
Ag-His	6.5										

В табл. 12 специфическое связывание, определенное как детектируемый ППР ответ связывания >10 RU в конце введения образца, показано серыми прямоугольниками. "Анти-Ag" представляет собой контрольное Ab, связывающее VISTA. Клон '029 был специфичным к VISTA при кислом и нейтральном pH. Клоны '761 и '767, являющиеся потомками '029, были специфичными к VISTA при кислом pH, при этом контрольное антитело также сохраняло антигенную специфичность. Неспецифическое связывание ("NSB") pI-контрольных белков с поверхностью с иммобилизованным эталонным белком А в этом анализе не наблюдали.

Таким образом, заряженные аминокислоты, введенные в CDR VH '761 и '767, не вызывают электростатического связывания этих антител с другими белками с высоким pI, такими как авидин и цитохром С, или белками с низким pI, такими как BSA.

Пример 13. Ингибирование активации Т-клеток антителами '761 и '767.

В этом примере описан анализ, который можно выполнять для определения способности антител '761 и '767 блокировать вызываемое hVISTA ингибирование активации Т-клеток Jurkat.

Был использован тот же анализ, что описан в примере 5. Вкратце, клетки Jurkat (линия человеческих Т-клеток), экспрессирующие репортер люциферазы NFkB, совместно культивируют при различных значениях pH с клетками 293Т, экспрессирующими человеческий VISTA и одноцепочечный вариативный фрагмент агонистического антитела к Т-клеточному рецептору человека, ОКТ3. Анти-VISTA антитела '761 и '767 или не специфические к VISTA контрольные антитела соответствующего изотипа добавляли к совместно культивируемым клеткам. Активация Jurkat показана в виде единиц люциферазы и в виде кратного увеличения сигнала люциферазы при обработке анти-VISTA антителом относительно контроля.

Пример 14. Мутационный анализ выявил ключевые остатки, наделяющие анти-VISTA антитела свойствами pH-зависимого связывания.

Антитела P1-068761.IgG1.3 и P1-068767.IgG1.3 содержат 5-6 мутаций относительно P1-061029 (табл. 7). Мутационный анализ выполняли для выявления ключевых остатков, важных для придания pH-зависимых свойств анти-VISTA антителам. Таким образом, синтезировали панели N-1 (одна реверсия аминокислот в P1-061029) и N-2 (2 реверсии аминокислот в P1-061029) вариантов P1-068761 и P1-068767, выраженные как IgG1.3, и проанализировали их связывание с huVISTA при pH 6, pH 6,7 и pH 7,4.

Кинетику связывания измеряли на приборе Biacore® T100 (GE Healthcare). Белок А (ThermoFisher Scientific, кат. № 21181) разбавляли до 20 мкг/мл в 10 мМ ацетата натрия, pH 4,5, и иммобилизовали на проточных кюветах биосенсора CM5 в соответствии с протоколом производителя для связывания амина (GE Healthcare) с целевой плотностью иммобилизации белка А 2000 RU на проточную кювету. Анализ проводили при 37°C, используя подвижный буфер PBST (137 мМ хлорид натрия, 2,7 мМ хлорид калия, 10 мМ фосфатный буфер, 0,05% Твин 20) при pH 7,4, 6,7 и 6,0. Антитела разводили до 25 нМ в PBST pH 7,4 и иммобилизовали в активных проточных кюветах биосенсора при 5 мкл/мин в течение 40 с. Готовили серийные разведения в пределах концентраций 100-10 нМ моновалентного hVISTA-ECD (SEQ ID NO:325), используя подвижный буфер с pH 7,4, 6,7 и 6,0, и вводили поверх иммобилизованных антител со скоростью 40 мкл/мин для измерения ассоциации и диссоциации. Для регенерации поверхности захвата белка А между циклами анализа использовали две 15-секундные инъекции 10 мМ глицина с pH 1,5. Константы скоростей k_a (k_{on}) и K_D (k_{off}) получали из эталонной проточной кюветы и сенсограмм с вычтенным эталонным сигналом при 0 нМ и подгоняли к модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore® T200 Evaluation v.2.0.

Константу сродства, K_D , рассчитывали для каждого анти-VISTA антитела в виде отношения скоро-

стей $k_{\text{off}}/k_{\text{off}}$. Для сравнения, каким образом pH влияет на способность антитела связываться с VISTA рассчитывали % Rmax, и получали измеренный максимальный ответ связывания VISTA относительно ожидаемого максимального ответа связывания VISTA. % Rmax определяли как отношение ответа в точке "связывания" с вычтенным референсным сигналом в конце инъекции 100 нМ VISTA для каждого антитела (Rmax) относительно ожидаемого ответа связывания VISTA (Rexp). Rexp вычисляли как $R_{\text{exp}} = [(молекулярная\ масса\ VISTA\text{-}ECD/молекулярная\ масса\ mAb) \times (\text{ответ в точке "захвата" } mAb\ (RU))] \times 2$ участка связывания на mAb.

Результаты НИР, полученные для вариантов реверсии P1-068761, показаны на фиг. 10А, которые ранжированы по величине k_{off} при pH 6,0, от самой медленной до самой быстрой. В таблице антитела, которые проявляли слабый ответ или не обнаруживали связывания (<10 RU) с 100 нМ hVISTA, классифицированы как не связывающие (NB). Результаты показывают, что E в положениях 32 (т.е. аминокислотный остаток 7 в CDR1 VH '761) и 100f (аминокислотный остаток 12 в CDR3 VH '761), оба необходимы для сохранения селективности при кислом pH, поскольку эти реверсии в родительской последовательности P1-061029 допускали значимое связывание hVISTA при физиологическом pH (% Rmax >10). Дальнейший анализ показал, что варианты с реверсией E55A (аминокислотный остаток 6 в CDR2 VH '761) сохраняли селективность при кислом pH и демонстрировали сопоставимую кинетику связывания в пределах 2-кратного значения по сравнению с P1-068761. Напротив, в то время как варианты с реверсиями H100G, E56N и E30D (аминокислотные остатки 12 в CDR3 VH, 7 в CDR2 VH и 4 в CDR1 VH '761, соответственно) сохраняли селективность при кислом pH, эти mAb также демонстрировали k_{off} , которая была примерно в 3 раза быстрее при кислых значениях pH по сравнению с таковой у P1-068761, в результате чего скорости диссоциации у этих мутантов при кислых pH приближаются к таковым у родительского P1-061029. Таким образом, добавление мутаций G100H, N56E и/или D30E к исходному клону P1-061029 способствовало улучшению сродства при кислом pH VISTA, наблюдаемого в селективном при кислом pH клоне P1-068761.

Результаты ППР, полученные для вариантов реверсии P1-068767, показаны на фиг. 10В, которые ранжированы по величине k_{off} при pH 6,0, от самой медленной до самой быстрой. Результаты показывают, что D в положении 102 (аминокислотный остаток 14 в CDR3 VH '767) необходим для сохранения селективности при кислом pH, а реверсия D102V назад в родительскую последовательность P1-061029 допускала значимое связывание hVISTA при нейтральном pH (% Rmax >10). Дальнейший анализ показал, что варианты с реверсиями E30D, D52N и E55A (аминокислотные остатки 4 в CDR1 VH, 3 в CDR2 VH и 6 в CDR3 VH '767, соответственно) сохраняли селективность при кислом pH и демонстрировали сопоставимую кинетику связывания при pH 6,0 в пределах 2-кратного значения, наблюдаемого у P1-068767. Напротив, варианты с реверсией E100fF (аминокислотный остаток 12 в CDR3 VH '767) способствовал сохранению селективности при кислом pH, хотя с более чем 3-кратным увеличением k_{off} при кислом pH по сравнению с таковой у P1-068767. Примечательно, что варианты с реверсией E100fF демонстрировали еще более быструю k_{off} при кислом pH по сравнению с исходным mAb P1-061029.

Таким образом, сводные данные по мутантам с реверсией P1-068761 и P1-068767 (селективным при кислом pH) относительно P1-061029 (pH-толерантного) приведены в табл. 13 (HCDR1, HCDR2 и HCDR3 разделены знаком подчеркивания).

Таблица 13

```
SEQ ID.
P1-061029 GFTLDDYAMH_GINWNSANIGYADSVKG_VPGYSGGWIDAFDV 67
P1-068761 ...E_E.....EE.....H....E.. 51
P1-068767 ...E.....D..E.....E..D 55
aa полож. 26–35 50–66 99–110
```

Описанные выше последовательности CDR VH P1-061029, P1-068761 и P1-068767 указаны в табл. 13 для аминокислот ("полож. aa") 26-35, 50-66 и 99-110 в SEQ ID NO:67, 51, 55 соответственно. Ключевые мутации, необходимые для селективности при кислом pH, выделены жирным шрифтом, а мутации с более чем 3-кратным увеличением влияния на K_D при pH 6,0 по сравнению с P1-068761 и P1-068767 подчеркнуты.

Пример 15. Картирование эпитопов антител VISTA.

Эпитопы hVISTA в '015, '029, 761 и '767, отформатированные как антитела IgG1.3, определяли двумя различными методами: конкуренцией методом BLI (биослойной интерферометрии) и представления на поверхности дрожжей.

BLI конкурентные анализы связывания эпитопа выполняли для оценки сохранения у селективных при кислых pH анти-VISTA антител P1-068761 и P1-068767 аналогичных или перекрывающихся эпитопов VISTA по сравнению с родительскими P1-061029, P1-061015 и соответствующими контрольными анти-VISTA антителами 1, 2 и 3. Анализы биннинга в формате сэндвич и тандемном формате выполняли на приборе OctetRed384 BLI (PALL/ForteBio). Все этапы анализа выполняли при 30°C и скорости встряхивания 1000 об/мин, и в качестве буфера использовали кислый (pH 6,0) или нейтральный (pH 7,4) PBST (137 мМ хлорид натрия, 2,7 мМ хлорид калия, 10 мМ фосфатный буфер, 0,05% Твин 20). Для сэндвич-формата на сенсоры античеловеческого IgG-Fc (АНС, PALL/ForteBio) сначала иммобилизовали панель

анти-VISTA антител при pH 7,4, затем сенсоры захвата античеловеческих антител блокировали общими человеческими IgG (Jackson кат. № 009-000-002). После этого при pH 6,0 иммобилизовали человеческий VISTA-ECD и, наконец, при pH 6,0 анализировали конкуренцию для всех возможных комбинаций антител. В анализе в тандемном формате на покрытые стрептавидином (SAX, PALL/ForteBio) биосенсоры сначала иммобилизовали биотинилированный hVISTA-ECD при pH 7,4, затем на сенсорах иммобилизовали полную панель анти-VISTA антител при pH 6,0 для гарантии полного насыщения связывания VISTA для каждого антитела перед оценкой конкуренции со всеми возможными комбинациями антител при pH 6,0.

Результаты BLI анализа конкурентного связывания эпитопа суммировали с помощью матрицы конкуренции, фиг. 11A. На этом чертеже первое иммобилизованное антитело указано в строке, а его связывающая или блокирующая активность с (вторыми) конкурентными антителами показана в каждом столбце. Матрица конкуренции была идентичной для обоих форматов анализа. Для сэндвич-анализа связывание (светло-серое) конкурирующего антитела определяли по сигналу в диапазоне 0,4-1,2 нм, а блокированные антитела (черный) демонстрировали сигнал отсутствия связывания <0,1 нм. Для тандемного анализа связывание конкурирующего антитела определяли по сигналу в диапазоне от 0,3 до 0,8 нм, а блокированные антитела демонстрировали отсутствие сигнала связывания <0,2 нм. Хотя "VISTA mAb 3" показало быструю диссоциацию из комплекса с hVISTA-ECD при кислом pH по данным ППР при 37°C (фиг. 6C), оно не продемонстрировало быструю диссоциацию ни в одном из форматов BLI анализа (проведенном при 30°C). Эти конкурентные анализы показали, что P1-061015, P1-061029, антитела, селективные при кислом pH антитела P1-068761 и P1-068767, а также анти-VISTA антитела 2 и 3, все конкурируют друг с другом за сходные или перекрывающиеся эпитопы на VISTA. Тем не менее, анти-VISTA антитело 1 связывается с отдельным отличающимся эпитопом. Таким образом, заряженные аминокислотные мутации, введенные в CDR VH P1-061029 для генерации селективных при кислом pH клонов P1-068761 и P1-068767, существенно не изменили связывание с эпитопом VISTA.

Эпитопы антител '029, '015, '761 и '767 также картировали, используя представление на поверхности дрожжей и NGS в соответствии с методом, описанным у Chao et al. (2004) J. Mol. Biol. 342:539-550, Oliphant et al. (2006) J. Virol. 80:12149-12159 и Kowalsky et al. (2015) J. Biol. Chem. 290:26457-26470. Вкратце, создавали библиотеку мутагенеза насыщения отдельных точечных мутантов ECD VISTA и представляли на поверхности дрожжей. Мутанты VISTA, которые потеряли связывание с картируемым антителом, но сохранили связывание с неблокирующим антителом (mAb1), отсортировывали и секвенировали. Поскольку они сохраняли связывание с mAb1, эти мутанты, вероятно, имели правильную укладку, и потеря связывания, наблюдаемая с картируемым антителом, вероятно, связана с потерей остатка, энергетически важного для формирования контакта. Положения этих мутаций обозначали как энергетически важные остатки в эпитопе антитела, которые показаны в табл. 14.

Таблица 14

Остатки huVISTA, которые идентифицированы
как эпитопные остатки анти-VISTA mAb

mAb	T 35	Y 37	K 38	T 39	Y 41	R 54	T 61	F 62	Q 63	L 65	H 66	L 67	H 68	H 69	F 97	L 115	V 117	I 119	H 121	H 122	S 124	E 125	R 127
P1-061015		x	x	x		x		x	x	x	x				x	x	x	x			x	x	
P1-061029		x		x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		x	x	x			x	x	x
P1-068761	x	x		x		x	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x			x	x	x
P1-068767		x		x	x	x	x	x	x	x	x					x	x	x	x	x	x	x	x

В табл. 15 приведены подробные данные, показанные в табл. 14, и перечислены аминокислотные остатки hVISTA, которые могут уменьшать связывание каждого из перечисленных антител, исходя из частоты остатков, наблюдаемой в методе представления на поверхности дрожжей/NGS.

Таблица 15

Аминокислотные замены VISTA, которые могут
уменьшать связывание перечисленных антител

	P1-061015 pH 6	P1-061015 pH 7	P1-061029 pH 6	P1-061029 pH 7	P1-068761 pH 6	P1-068767 pH 6
T35					P, Y, W	
Y37	P, G, A, S, T, K, R, H, N, D, E, Q	P, G, S, N, D, E, Q	Y, S, T, V, L, I, M, K, R, N, D, Q	P, G, S, T, V, L, I, M, K, R, N, D, E, Q	P, G, A, S, T, V, L, I, M, K, R, N, D, E, Q	G, T, V, L, I, M, K, R, N, Q
K38	P, G, A, S, V					
T39	G, M, R, H, F, Y, W, N, D, E, Q	M, K, R, H, F, Y, W, D, E, Q	G, A, S, M, Y, W, N, D, E, Q	G, A, S, V, L, M, R, H, F, Y, W, N, D, E, Q	G, Y, D, E	G, A, S, H, Y, W, N, D, E, Q
Y41				A, S, T, I, M		P, I, M, H
R54	L, M, F, Y, E	M, E	P, A, T, V, I, M, F, Y, N, D, E, Q	P, G, A, S, T, V, L, I, M, H, F, Y, W, N, D, E, Q	A, T, V, L, I, M, K, F, Y, E, Q	P, A, S, T, V, L, I, M, F, Y, W, D, E, Q
T61			G, L, R, H, F, Y, D, E, Q	V, L, K, R, H, F, Y	G, V, H, Y, D	L, R, H, F, Y, D, E
F62	G, A, S, M, K, R, N, D, E, Q	G, K, R, D, E, Q	P, G, A, S, T, V, I, M, H, Y, W, D, E, Q	P, G, A, S, T, V, L, I, M, K, R, H, Y, W, N, D, E, Q	P, G, A, S, T, V, M, H, Y, W, D, E, Q	P, G, A, S, T, V, L, M, H, Y, W, N, D, E, Q
Q63	G, R, W, D, E	W, D, E	G, A, S, T, V, K, R, H, Y, W, N, D, E	P, G, S, T, L, M, K, R, H, F, Y, W, N, D, E	G, S, T, K, H, Y, N, D, E	P, G, A, S, T, V, L, I, M, K, H, F, Y, W, N, D, E

	P1-061015 pH 6	P1-061015 pH 7	P1-061029 pH 6	P1-061029 pH 7	P1-068761 pH 6	P1-068767 pH 6
L65	P, G, A, S, T, K, R, H, W, N, D, E, Q	P, G, S, K, W, D, E, Q	G, T, Y, D, E, Q	P, G, A, S, T, H, Y, W, N, D, E, Q		P, G, S, H, D, E, Q
H66	P, T, V, L, I, M, K, R, F, Y, W	P, T, V, L, I, M, K, R, F, Y, W	T, V, L, I, Y, D, E, Q	G, S, T, V, L, I, M, K, R, W, N, D, E, Q	T, I, K, W, D	T, V, I, K, W, D, E
L67					G, A	
H68			L, I, M, F, E	L, I, E	G, T, V, L, I, Y, W, D, E, Q	
F97	G, D, E					
I.115	R, W		A, T, K, N, Q	A, T, K, F, N, Q	A, T, M, K, F, N	A, T, K, F, N, Q
V11 7	M, K, N, D	M, K, R, W, E	T, M, K, R, W, E	T, L, I, M, K, R, W, E	T, I, M, K, W	T, L, I, M, K, R, W, E
I119	F, P	P, N	P, M, E	P, M, E	M, H	P, M, H, F, N, E
H12 1						V, E, Q
H12 2						P, Y, N, D
S124	P, V, L, I, K, F, D, E	L, I, M, H, W, Q	L, I, M, H, W, Q		L, I, M, Q	L, I, M
E125	A, S, T, L, M, K, H, Y, D	A, T, V, I, M, K, H, F, Y, W, N, D	T, V, I, M, H, F, Y, W	G, T, K, H, Y, W, N, D	V, I, H, N	T, V, I, F, Y, W, N
R127			S, V, M, H	P, S, V, M, K, H, N	P, V, M, N	P, S, V, M, H, N

На фиг. 11B и 11C показан вид эпитопа, охватывающего все остатки для блокирования анти-hVISTA антитела, как указано в табл. 14 (фиг. 11B), по сравнению с эпитопом неблокирующего анти-hVISTA антитела (mAb1; фиг. 11C). Аминокислотные остатки 66(H) и 162(A) указаны для обозначения ориентации молекулы. Остатки гистидина выделены серым, а остатки эпитопа - черным. Примечательно, что все блокирующие анти-VISTA mAb занимают одну и ту же область эпитопа, что согласуется с данными биннинга октетов (показывающими, что они конкурируют друг с другом), с небольшими различиями остатков среди протестированных антител. Напротив, неблокирующее анти-hVISTA антитело (mAb1) занимает отдельную область эпитопа на молекуле hVISTA, и это дополнительно подтверждается данными биннинга октетов, которые показывают, что ни одно из блокирующих mAb не конкурирует с mAb1.

Пример 16. Биофизические свойства '761 и '767.

Физические и химические свойства P1-068761 и P1-068767 сравнивали со свойствами родительского P1-061029 (все с константной областью IgG1.3) с помощью следующих аналитических и биофизических методов.

Аналитические данные SEC получали с помощью прибора для ВЭЖХ Agilent 1260 с использованием колонки Shodex™ KW403-4F (4,6 мм ID × 300 мм) в буфере, содержащем 100 мМ фосфат натрия, 150 мМ хлорид натрия, pH 7,3 (с 0,2-мкм фильтром), текущем со скоростью потока 0,30 мл/мин. Данные собирали с помощью детектора Agilent 1260 Infinity Diode Array Detector, установленного для сбора данных при 280 нм, и анализировали с помощью программного обеспечения Agilent Chemstation (Agilent, Санта-Клара, Калифорния).

Визуализированные данные изoeлектрической фокусировки в капиллярах (icIEF) получали на приборе ProteinSimple iCE3 с автосэмплером Alcott 720NV. Образцы антител смешивали со смесью для разделения для получения конечных концентраций антител 0,2 мг/мл, содержащей 0,35% метилцеллюлозы, 2,0 М мочевины, 1% об./об. фармалита pI 5-8 и 3% об./об. фармалита pI 8-10,5. Эти образцы анализировали со временем предварительной фокусировки 1 мин при 1500 В и временем фокусировки 10 мин при 3000 В в картридже ProteinSimple cIEF с FC-покрытием (продукт № 101701). Данные анализировали с помощью программного обеспечения iCE CFR V4.3.1.5352.

Гидродинамический размер антител определяли с помощью динамического рассеяния света (DLS), а термостабильность характеризовали с помощью флуоресцентной спектроскопии и статического рассеяния света (SLS) с использованием прибора для молекулярной характеристики Uncle (Unchained Labs).

Антитела P1-061029, P1-068761 и P1-068767 получали в концентрации 2 мг/мл в 1X буфере PBS, а затем разводили 1:1 либо 40 mM Трис в 1X PBS, либо 40 mM цитратом в 1X PBS при разных значениях pH с получением конечных образцов антител с концентрацией 1 мг/мл в 20 mM Трис/1X PBS или 20 mM цитрате/1X PBS при pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 или 9,0. Эти образцы загружали в кюветный картридж UNi и анализировали в течение 1 ч после разбавления в составах с разными pH. Данные DLS собирали при 25°C, используя 4 сбора по 5 сек каждый. Функции автокорреляции интенсивности устанавливали с помощью программного обеспечения для анализа UNcle V2.0. Данные по термической денатурации получали путем сканирования образцов при температуре от 25°C до 90°C со скоростью сканирования 0,5°/мин при возбуждении при 266 нм и 473 нм. Данные флуоресценции получали в диапазоне от 250 нм до 720 нм. Данные флуоресценции и SLS анализировали с помощью программного обеспечения UNcle V2.0.

Кажущуюся вязкость антител P1-061029, P1-068761 и P1-068767 измеряли на приборе для молекулярной характеристики UNcle (Unchained Labs), используя метод DLS на основе сфер, который измеряет скорость диффузии полистирольных сфер в присутствии приготовленного раствора антител, в соответствии с протоколом Unchained Labs. Вкратце, 10% раствор 100 нм полистирольных сфер (Thermo Scientific кат. № 3100A) готовили в буфере для приготовления состава, содержащем 0,5% Твина 80, 3 мкл этой смеси полистирольных сфер добавляли к 30 мкл приготовленного антитела (различные концентрации Ab в 20 mM гистидина, 260 mM сахарозы, pH 6,0), и полученную смесь белок/сферы загружали на 3 отдельные дорожки кюветного картриджа UNi (по 9 мкл на каждую дорожку) для трехкратного анализа. Данные анализировали с помощью программного обеспечения для анализа UNcle версии V2.0, используя эталонную вязкость 1,3 cP.

Физическую стабильность антител P1-061029, P1-068761 и P1-068767 изучали в условиях ускоренного стресса путем приготовления 50 мг/мл образцов антител в 20 mM гистидина, 260 mM сахарозы, pH 6,0 и воздействия теплового стресса 40°C в течение 4 недель. Аликвоты удаляли непосредственно перед инкубацией при 40°C (время ноль=t₀), а также через 1 неделю (1 н) и 4 недели (4 н) термического стресса, и образцы разбавляли до 2 мг/мл буфером для приготовления состава и анализировали по aSEC. Данные aSEC получали на приборе для ВЭЖХ Agilent 1260 с использованием колонки Shodex KW403-4F (4,6 мм ID × 300 мм) в буфере, содержащем 100 mM фосфат натрия, 150 mM хлорид натрия, pH 7,3 (с 0,2-мкм фильтром), текущем со скоростью потока 0,30 мл/мин. Данные собирали с помощью детектора Agilent 1260 Infinity Diode Array Detector, установленного для сбора при 280 нм, и анализировали с помощью программного обеспечения Agilent Chemstation (Agilent, Санта-Клара, Калифорния).

Результаты были следующими. Данные аналитической эксклюзионной хроматографии (aSEC) показали, что все три антитела могут быть очищены до высокой степени, причем каждый образец антитела состоит из более чем 99,3% мономеров (основной пик), менее чем 0,7% высокомолекулярных (HMW) видов, и недетектируемых уровней низкомолекулярных (LMW) видов, табл. 16.

Таблица 16

Аналитические данные SEC для анти-VISTA антител, показывающие процент видов с высокой молекулярной массой (% HMW), процент мономерных/доминирующих видов (% Main) и процент видов с низкой молекулярной массой (% LMW)

Название образца	%HMW	%Основной	%LMW
P1-061029	0,4	99,6	0,0
P1-068761	0,6	99,4	0,0
P1-068767	0,5	99,5	0,0

Профиль изменения заряда, определенный с помощью визуализированной изоэлектрической фокусировки в капиллярах (icIEF) для антитела P1-061029, показал присутствие основного вида (69,4%) с изоэлектрической точкой (pI) 8,56 и 30,6% кислых частиц (фиг. 12A-C). P1-068761 продемонстрировал основной вид (66,4%) с pI 6,69 и 33,6% кислых видов. P1-068767 продемонстрировал основной вид (61,4%) с pI 6,63 и 38,6% кислых видов. Следовательно, распределение кислых, щелочных и основных (доминирующих) видов является одинаковым для трех антител, но сконструированные антитела P1-068761 и P1-068767 имеют значительно более низкую изоэлектрическую точку, чем родительское антитело P1-061029.

Олигомерное состояние P1-061029, P1-068761 и P1-068767 определяли в диапазоне pH 3-9 с использованием динамического рассеяния света (DLS) в буферах с разными значениями pH. Все значения гидродинамического радиуса (Rh) для каждого антитела находились в диапазоне 4,8-5,7 нм, что типично для образцов мономерных антител, табл. 17. Это свидетельствует о том, что эти антитела не образуют обнаруживаемых уровней высокомолекулярных агрегированных частиц при 1 мг/мл в течение первого часа после разбавления составами с pH в диапазоне от 3 до 9.

Таблица 17
Гидродинамический радиус, определенный DLS, для образцов
1 мг/мл анти-VISTA антител в диапазоне pH от 3-9

pH	Буфер	Rh (нм) P1-061029	Rh (нм) P1-068761	Rh (нм) P1-068767
9	20 mM Трис/1 X PBS	5,2	4,8	5,2
8	20 mM Трис/1 X PBS	5,2	5,2	5,2
7	20 mM Трис/1 X PBS	4,8	5,2	5,2
7	20 mM цитрат/1 X PBS	4,8	5,2	5,7
6	20 mM цитрат/1 X PBS	5,2	5,2	4,8
5	20 mM цитрат/1 X PBS	5,2	4,8	5,2
4	20 mM цитрат/1 X PBS	4,8	4,8	5,2
3	20 mM цитрат/1 X PBS	5,2	5,2	5,2

Термостабильность P1-061029, P1-068761 и P1-068767 измеряли в диапазоне pH 3-9 путем мониторинга флуоресценции и статического рассеяния света как функции температуры в буферах с разными значениями pH. Первый термический денатурационный переход (Tm1), который обычно представляет собой денатурацию домена CH2 антител IgG1, определяли по флуоресценции, который показан в табл. 18, а начало агрегации (Tagg), которое обычно представляет денатурацию домена FАВ антител IgG1, измеряли по статическому рассеянию света, данные показаны в табл. 19. При нейтральном pH (pH 7,0) в составе Трис/PBS значения Tm1 для трех антител были следующими: P1-061029 (67,4°C), P1-068761 (67,0°C) и P1-068767 (65,3°C), а значения Tagg - P1-061029 (67,8°C), P1-068761 (67,5°C) и P1-068767 (65,8°C). Tm1 для каждого антитела в составе цитрат/PBS при том же нейтральном pH 7,0 или чуть более кислом pH 6,0 находились в пределах 0,7° от значений в составе Трис/PBS, pH 7,0. Однако для каждого антитела значения Tm1 были несколько ниже (в пределах 0,3-1,1° и ниже) при более щелочном pH 8-9 и значительно ниже при более кислом pH 3-5. По сравнению с нейтральным pH, значение Tagg для P1-061029 при более щелочных pH 8,0-9,0 находилось в пределах 0,1° значения при pH 7,0, и было на 1,0° ниже при pH 5,0 и намного ниже (на 6,1-19,6° ниже) в самых кислых условиях при pH 3,0-4,0. Значение Tagg для P1-068761 и P1-068767 также было значительно ниже при pH 3,0-4,0. Однако при pH 5,0 значение Tagg для P1-068761 было только на 0,2° ниже, чем при pH 6,0, тогда как значение Tagg для P1-068767 было на 2,2° ниже при pH 5,0 чем при pH 6,0, что показывает некоторые различия в Tagg каждого антитела, табл. 19.

Таблица 18
Термостабильность (значения Tm1) для P1-061029, P1-068761, P1-068767 в
диапазоне pH 3-9, определенная методом флуоресцентной спектроскопии

pH	Буфер	Tm1 (°C) P1-061029	Tm1 (°C) P1-068761	Tm1 (°C) P1-068767
9	20 mM Трис/1 X PBS	66,6	65,9	65,0
8	20 mM Трис/1 X PBS	67,0	66,5	64,8
7	20 mM Трис/1 X PBS	67,4	67,0	65,3
7	20 mM цитрат/1 X PBS	67,2	66,9	64,8
6	20 mM цитрат/1 X PBS	67,6	67,5	65,0
5	20 mM цитрат/1 X PBS	64,4	64,7	62,1
4	20 mM цитрат/1 X PBS	51,8	52,0	50,8
3	20 mM цитрат/1 X PBS	30,7	28,1	28,7

Таблица 19
Термическая стабильность (значения Tagg) для P1-061029, P1-068761, P1-068767
в диапазоне pH от 3 до 9, определенная статическим рассеянием света

pH	Буфер	Tagg (°C) P1-061029	Tagg (°C) P1-068761	Tagg (°C) P1-068767
9	20 mM Трис/1 X PBS	67,7	67,1	66,0
8	20 mM Трис/1 X PBS	67,8	67,5	65,8
7	20 mM Трис/1 X PBS	67,8	68,2	65,9
7	20 mM цитрат/1 X PBS	67,8	68,1	65,7
6	20 mM цитрат/1 X PBS	68,1	68,9	65,6
5	20 mM цитрат/1 X PBS	66,8	68,7	63,7
4	20 mM цитрат/1 X PBS	61,7	63,6	56,9
3	20 mM цитрат/1 X PBS	48,2	48,8	41,0

Кажущуюся вязкость P1-061029, P1-068761 и P1-068767 измеряли методом DLS на основе сфер, который измеряет скорость диффузии полистирольных сфер в присутствии растворов, содержащих антитела. Сравнение всех трех антител при 44 мг/мл показывает сходную вязкость для обоих сконструированных антител относительно исходного антитела в этих условиях, табл. 20. Во втором исследовании до-

полнительный белковый материал для P1-068761 и P1-068767 концентрировали до более высоких концентраций для анализа вязкости при 136 мг/мл, 100 мг/мл и 50 мг/мл. Эти данные показывают увеличение кажущейся вязкости при более высоких концентрациях антител, с максимальной кажущейся вязкостью $5,7 \pm 0,7$ для P1-068761 и $5,3 \pm 0,6$ для P1-068767 при 136 мг/мл.

Таблица 20

Кажущаяся вязкость (в сП) для антител в 20 мМ гистидина, 260 мМ сахарозы, pH 6,0, при 25°C, определенная методом DLS на основе сфер.

Значения представляют среднее арифметическое и стандартное отклонение данных, полученных из трех полос UNi

Антитело	Кажущаяся вязкость (сП) @ 136 мг/мл	Кажущаяся вязкость (сП) @ 100 мг/мл	Кажущаяся вязкость (сП) @ 50 мг/мл	Кажущаяся вязкость (сП) @ 44 мг/мл
P1-061029				$1,6 \pm 0,1$
P1-068761	$5,7 \pm 0,7$	$3,1 \pm 0,0$	$1,4 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,4$
P1-068767	$5,3 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$

Физическую стабильность образцов 50 мг/мл P1-061029, P1-068761 и P1-068767 в 20 мМ гистидине, 260 мМ сахарозе, pH 6,0, изучали в условиях ускоренного стресса при 40°C в течение 4 недель. Олигомерное состояние антител отслеживали с помощью aSEC для образцов непосредственно перед инкубацией при 40°C (нулевой момент времени=t0), а также через 1 неделю (1 н) и 4 недели (4 н) стресса при 40°C. Эти данные показывают, что все три антитела остаются мономерными более чем на 96% через 4 недели при 40°C с низкими уровнями HMW видов (<1,6% HMW) и низкими уровнями LMW видов (<2,0% LMW), табл. 21.

Таблица 21

Данные aSEC для образцов в ускоренных тестах стабильности анти-VISTA-антител, показывающие процент высокомолекулярных видов (% HMW), процент мономерных/основных видов (% Main) и процент низкомолекулярных видов (% LMW), для образцов в t0, 1 н и 4 н

Антитело	Образец	% HMW	% Основной	% LMW
P1-061029	t0	0,4	99,7	0,0
	1н	0,5	99,4	0,2
	4н	0,8	97,2	2,0
P1-068761	t0	0,6	99,4	0,0
	1н	0,9	98,8	0,3
	4н	1,6	96,4	2,0
P1-068767	t0	0,5	99,5	0,0
	1н	0,8	98,9	0,3
	4н	1,6	96,4	2,0

Таблица последовательности

Ниже приведена таблица некоторых последовательностей, упомянутых в настоящей заявке. В SEQ ID NO:2 положение аминокислоты 187 может представлять собой D или E.

В приведенных ниже последовательностях антител последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VH расположены в аминокислотных положениях, содержащих аминокислоты 26-35, 50-66 и 99-110, соответственно, а последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VL расположены в аминокислотных положениях, содержащих аминокислоты 24-35, 51-57 и 90-98, соответственно. CDR1 VH пронумеровано в соответствии с AbM (AA 26-35; Abhinandan and Martin (2008) Mol. Immunol. 45:3832-3839; Swindells et al. (2017) J. Mol. Biol. 429: 356-364), и все другие CDR (CDR2, VH CDR3 VH, CDR1-3 VL) пронумерованы в соответствии с Cabat. Последовательности CDR конкретных видов антител выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в своих последовательностях VH и VL.

SEQ ID NO	Название	Последовательность
1	hVISTA (с лидерной последовательностью)	<u>MGVPTALEAG</u> <u>SWRWGSLLEA</u> <u>LFLAASLGPV</u> <u>AAFKVATPYS</u> <u>LYVCEGQNV</u> <u>TLTCRLGVP</u> <u>DKGHDVTFYK</u> <u>TWYRSSRGEV</u> <u>QTCERRPIR</u> <u>NLTFODLHLH</u> <u>HGGHQAANTS</u> <u>HDLAQRHGLE</u> <u>SASDHHGNFS</u> <u>ITMRNLTLDD</u> <u>SGLYCCLVVE</u> <u>IRHHHSEHRV</u> <u>HGAMELQVQT</u> <u>GKDAPSNV</u> <u>YPSSSQDSEN</u> <u>ITAAALATGA</u> <u>CIVGILCLPL</u> <u>LLLVYKQRQ</u> <u>AASNRRAQEL</u> <u>VRMDSNIQGI</u> <u>ENPGFEASPP</u> <u>AQGIPEAKVR</u> <u>HPLSYVAQRQ</u> <u>PSESGRHLLS</u> <u>EPSTPLSPPG</u> <u>PGDVFFPSLD</u> <u>PVPDSPNFEV</u> <u>I</u>
2	hVISTA (без лидерной последовательности)	<u>FKVATPYSLY</u> <u>VCPEGQNVTL</u> <u>TCRLGVPVDK</u> <u>GHDVTFYKTW</u> <u>YRSSRGEVQT</u> <u>CSERRPIRNL</u> <u>TFQDLHLHHG</u> <u>GHOAANTSHD</u> <u>LAQRHGLESA</u> <u>SDHHGNFSIT</u> <u>MRNLTLDDSG</u> <u>LYCCLVVEIR</u>
		<u>HHHSEHRVHG</u> <u>AMELQVQTGK</u> <u>DAPSNVVPY</u> <u>SSSQDSENIT</u> <u>AAALATGACI</u> <u>VGILCLPLIL</u> <u>LLVYKQRQAA</u> <u>SNRRAQELVR</u> <u>MDSNIQGIEN</u> <u>PGFEASPPAQ</u> <u>GIPEAKVRHP</u> <u>LSYVAQRQPS</u> <u>ESGRHLLSEP</u> <u>STPLSPPGPG</u> <u>DVFFPSLDPV</u> <u>PDSPNFEVI</u>
3	Предшественник изоформы 2 человеческого PSGL-1 с сигнальным пептидом	<u>MPLQLLLLI</u> <u>LLGPGNSLQL</u> <u>WDTWADEAEK</u> <u>ALGPLLARDR</u> <u>RQATEYEYLD</u> <u>YDFLPETEP</u> <u>EMLRNSTDIT</u> <u>PLTGPGTPES</u> <u>TTVEPAARRS</u> <u>TGLDAGGAVT</u> <u>ELTTELANMG</u> <u>NLSTDSAAE</u> <u>IQTTQPAATE</u> <u>AQTTQVPTE</u> <u>AQTTPLAATE</u> <u>AQTTRLTATE</u> <u>AQTTPLAATE</u> <u>AQTTPPAATE</u> <u>AQTTQPTGLE</u> <u>AQTTAPAAME</u> <u>AQTTAPAAME</u> <u>AQTTPPAAME</u> <u>AQTTQTAME</u> <u>AQTTAPEATE</u> <u>AQTTQPTATE</u> <u>AQTTPLAAME</u> <u>ALSTEPSATE</u> <u>ALSMEPTTKR</u> <u>GLFIPFSVSS</u> <u>VTHKGIPMAA</u> <u>SNLSVNYPVG</u> <u>APDHISVKQC</u> <u>LLAILILALV</u> <u>ATIFFVCTVV</u> <u>LAVRLSRKGH</u> <u>MYPVRNYSPT</u> <u>EMVCISSLLP</u> <u>DGGEGPSATA</u> <u>NGGLSKAKSP</u> <u>GLTPEPREDR</u> <u>EGDDLTLHSF LP</u>
4	Изоформа 2 человеческого PSGL-1 без сигнального пептида	<u>LQL</u> <u>WDTWADEAEK</u> <u>ALGPLLARDR</u> <u>RQATEYEYLD</u> <u>YDFLPETEP</u> <u>EMLRNSTDIT</u> <u>PLTGPGTPES</u> <u>TTVEPAARRS</u> <u>TGLDAGGAVT</u> <u>ELTTELANMG</u> <u>NLSTDSAAE</u> <u>IQTTQPAATE</u> <u>AQTTQVPTE</u> <u>AQTTPLAATE</u> <u>AQTTRLTATE</u> <u>AQTTPLAATE</u> <u>AQTTPPAATE</u> <u>AQTTQPTGLE</u> <u>AQTTAPAAME</u> <u>AQTTAPAAME</u> <u>AQTTPPAAME</u> <u>AQTTQTAME</u> <u>AQTTAPEATE</u> <u>AQTTQPTATE</u> <u>AQTTPLAAME</u> <u>ALSTEPSATE</u> <u>ALSMEPTTKR</u> <u>GLFIPFSVSS</u> <u>VTHKGIPMAA</u> <u>SNLSVNYPVG</u> <u>APDHISVKQC</u> <u>LLAILILALV</u> <u>ATIFFVCTVV</u> <u>LAVRLSRKGH</u> <u>MYPVRNYSPT</u> <u>EMVCISSLLP</u> <u>DGGEGPSATA</u> <u>NGGLSKAKSP</u> <u>GLTPEPREDR</u> <u>EGDDLTLHSF LP</u>
5	ECD изоформы 2 человеческого PSGL-1 с сигнальным пептидом	<u>MPLQLLLLI</u> <u>LLGPGNSLQL</u> <u>WDTWADEAEK</u> <u>ALGPLLARDR</u> <u>RQATEYEYLD</u> <u>YDFLPETEP</u> <u>EMLRNSTDIT</u> <u>PLTGPGTPES</u> <u>TTVEPAARRS</u> <u>TGLDAGGAVT</u> <u>ELTTELANMG</u> <u>NLSTDSAAE</u> <u>IQTTQPAATE</u> <u>AQTTQVPTE</u> <u>AQTTPLAATE</u>

		AQTTRLTATE AQTTPLAATE AQTTPPAATE AQTTQPTGLE AQTTAPAAME AQTTAPAAME AQTTPPAAME AQTTQT
6	ECD изоформы 2 человеческого PSGL-1 без сигнального пептида	LQL WDTWADEAEK ALGPLLARDR RQATEYEYLD YDFLPETEPP EMLRNSTDIT PLTGPGTPES TTVEPAARRS TGLDAGGAVT ELTTELANMG NLSTDSAAME IQTTPAATE AQTTQVPTE AQTTPLAATE AQTTRLTATE AQTTPLAATE AQTTPPAATE AQTTQPTGLE AQTTAPAAME AQTTAPAAME AQTTPPAAME AQTTQT
7	ECD человеческого PSGL-1 (N- терминальные положения с 42 по 295 полноразмерного человеческого PSGL-1, № доступа AAC50061)	QATEYEYLD YDFLPETEPP EMLRNSTDIT PLTGPGTPES TTVEPAARRS TGLDAGGAVT ELTTELANMG NLSTDSAAME IQTTPAATE AQTTPLAATE AQTTRLTATE AQTTPLAATE AQTTPPAATE AQTTQPTGLE AQTTAPAAME AQTTAPAAME AQTTPPAAME AQTTQTAME AQTTAPEATE AQTTQPTATE AQTTPLAAME ALSTEPSATE ALSMEPTTKR GLFIPFSVSS VTHKGIPMAA SNLSV
8	Предшественник изоформы 1 HumPSGL-1 с сигнальным пептидом NP_001193538	MAVGASGLEG DKMAGAMPLQ LLLLLILLGP GNSLQLWDTW ADEAEKALGP LLARRRQAT EYEYLDYDFL PETEPEMLR NSTDTTPLTG PGTPESTTVE PAARRSTGLD AGGAVTELT ELANMGNLST DSAAMEIQT QPAATEAQTT QVPVTEAQTT PLAATEAQTT RLTAATEAQTT PLAATEAQTT PPAATEAQTT QPTGLEAQTT APAAMEAQTT APAAMEAQTT PPAAMEAQTT QTTAMEAQTT APEATEAQTT QPTATEAQTT PLAAMEALST EPSATEALSM EPTTKRGLFI PFSVSSVTHK GIPMAASNLS VNYPVGAPDH ISVKQCLLAI LILALVATIF

		FVCTVVLAVR LSRKGHMYPV RNYSPTMVC ISSLLPDGGE GPSATANGGL SKAKSPGLTP EPREDREGDD LTLHSFLP
9	Человеческий PSGL-1 без сигнального пептида	LQLWDTW ADEAEKALGP LLARRRRQAT EYEYLDYDFL PETEPPEMLR NSTDTTPLTG PGTPESTTVE PAARRSTGLD AGGAVTELT ELANMGNLST DSAAMEIQTT QPAATEAQTT QPVPTEAQTT PLAATEAQTT RLTATEAQTT PLAATEAQTT PPAATEAQTT QPTGLEAQTT APAAMEAQTT APAAMEAQTT PPAAMEAQTT QTTAMEAQTT APEATEAQTT QPTATEAQTT PLAAMEALST EPSATEALSM EPTTKRGLFI PFSVSSVTHK GIPMAASNLS VNYPVGAPDH ISVKQCLLAI LILALVATIF FVCTVVLAVR LSRKGHMYPV RNYSPTMVC ISSLLPDGGE GPSATANGGL SKAKSPGLTP EPREDREGDD LTLHSFLP
10	ECD человеческого PSGL-1 с сигнальным пептидом	MAVGASGLEG DKMAGAMPLQ LLLLLILLGP GNSLQLWDTW ADEAEKALGP LLARRRRQAT EYEYLDYDFL PETEPPEMLR NSTDTTPLTG PGTPESTTVE PAARRSTGLD AGGAVTELT ELANMGNLST DSAAMEIQTT QPAATEAQTT QPVPTEAQTT PLAATEAQTT RLTATEAQTT PLAATEAQTT PPAATEAQTT QPTGLEAQTT APAAMEAQTT APAAMEAQTT PPAAMEAQTT QT
111	VH P1-069059	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA <u>MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSDHIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAEDDWGQGMVTVSS</u>
112	VL P1-069059	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
113	HC P1-069059 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA

		MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSDHIGYADSV KGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
114	LC P1-069059	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
115	VH P1-069061	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVSS</u>
116	VL P1-069061	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPG TKVDIK
117	HC P1-069061 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSVK GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
118	LC P1-069061	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK

		VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
119	VH P1-069063	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TLEDYA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSV <u>KGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDADDE</u> WGQGTMTVTVSS
220	VL P1-069063	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
221	HC P1-069063 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGF <u>TLEDYA</u> MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDADDEWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKAALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
222	LC P1-069063	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS TDFLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
223	VH P1-069065	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TLEDEA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVSGINWNSDDIGYADSV <u>KGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAFDV</u> WGQGTMTVTVSS
224	VL P1-069065	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
225	HC P1-069065 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGF <u>TLEDEA</u> MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSDDIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAFDVWGQGTMTVTVSSASTKGP

		SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
226	LC P1-069065	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
227	VH P1-069067	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GF~~TLDDYA~~ MH WVRQAPGKGLEWVS GINWNSEEIGYADSV KGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDADDE WGQGTMTVTVSS
228	VL P1-069067	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYG ASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC COQYGSSPFT FGPG TKVDIK
229	HC P1-069067 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGF ~~TLDDYA~~ MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDADDEWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKAALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
330	LC P1-069067	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS

		SPVTKSFNRGEC
331	VH P1-069069	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA <u>MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDADDV</u> WGQGTMTVTVSS
332	VL P1-069069	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
333	HC P1-069069 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDADDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
334	LC P1-069069	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
335	VH P1-069071	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA <u>MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSADIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSEGWIDAFDV</u> WGQGTMTVTVSS
336	VL P1-069071	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
337	HC P1-069071 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSADIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSEGWIDAFDVWGQGTMTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH

		TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
338	LC P1-069071	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
339	VH P1-069073	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GF~~T~~LEDEA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>GINWNSAEIGYADSV</u> <u>KGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAEDV</u> WGQGTMTVTVSS
440	VL P1-069073	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYG <u>ASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
441	HC P1 069073 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGF ~~T~~ LEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
442	LC P1-069073	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
443	VH P1-069075	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GF~~T~~LEDYA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>GINWDSAEIGYADSV</u>

		<u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTE</u> DALYYCA <u>KVPGYSHGWIDAEDV</u> WGQGTMTVTVSS
444	VL P1-069075	EIVLTQSPGTL ~~SLSPGERATL~~ SC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
445	HC P1-069075 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MIHWVRQAPGKGLEWVSGINWDSAEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTE <u>DALYYCA</u> VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
446	P1-069075 LC	EIVLTQSPGTL ~~SLSPGERATL~~ SCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
447	VH P1-069077	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDEA</u> <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSDEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTE</u> DALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAFDV</u> WGQGTMTVTVSS
448	VL P1-069077	EIVLTQSPGTL ~~SLSPGERATL~~ SC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
449	HC P1-069077 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MIHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSDEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTE <u>DALYYCA</u> VPGYSGGWIDAFDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS

		NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
50	LC P1-069077	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
51	VH P1-068761	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA <u>MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVSS</u>
52	VL P1-068761	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPG TKVDIK
53	HC P1-068761 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
54	P1-068761 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
55	P1-068767 VH	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEYA <u>MHWVVRQAPGKGLEWVSGIDWNSENIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAEDDVGQGTMTVSS</u>
56	P1-068767 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA

		WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
57	P1-068767 IgG1.3 HC	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSNIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKAALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
58	LC P1-068767	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
59	VH P1-068773	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDYA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>GIDWNSDNIGYADSV</u> <u>KG</u> RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAEDD</u> WGQGTMTVTVSS
60	VL P1-068773	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
61	HC P1-068773 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSDNIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKAALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF

		SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
62	LC P1-068773	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
63	VH P1-068765	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GFTDEDYA MH WVRQAPGKGLEWVS GINWNSEEIGYADSV KGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDD WGQGTMTVTVSS
64	VL P1-068765	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYG GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QOYGSSPFT FGPG TKVDIK
65	HC P1-068765 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTDEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDDWDWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKAALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
66	LC P1-068765	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
67	VH P1-061029	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GFTLDDYA MH WVRQAPGKGLEWVS GINWNSANIGYADSV KGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAFDV WGQGTMTVTVSS
68	VL P1-061029	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYG GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QOYGSSPFT FGPG TKVDIK

69	HC P1-061029 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSANIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAFDVGQGTMTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
70	LC P1-061029	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSSTFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
71	VH P1-068757	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSSEEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVSS</u>
72	VL P1-068757	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSSTFTFGPG TKVDIK
73	HC P1-068757 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
74	LC P1-068757	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS

		TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
75	VH P1-068771	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSHEIGYADSV KGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDD WGQGTMTVTVSS
76	VL P1-068771	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPFT FGPG TKVDIK
77	HC P1-068771 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSHEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDDVGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKAALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
78	LC P1-068771	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
79	VH P1-068775	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSEEIGYADSV KGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSHGWIDAEDD WGQGTMTVTVSS
80	VL P1-068775	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPFT FGPG TKVDIK
81	HC P1-068775 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK

		VPGYSHGWIDAEDDWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKDTH CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
82	LC P1-068775	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
83	VH P1-068769	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSDHIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVTVSS</u>
84	VL P1-068769	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPPFTFGPGTK VDIK
85	HC P1-068769 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSDHIGYADSV KGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKDTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
86	LC P1-068769	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK

		DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
87	VH P1-068759	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSENIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVTSS</u>
88	VL P1-068759	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
89	HC P1-068759 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVTSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
90	LC P1-068759	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
91	VH P1-068763	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSENIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTSS</u>
92	VL P1-068763	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
93	HC P1-068763 IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS

		LGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
94	LC P1-068763	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
95	VH P1-061015	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYA MH WVRQAPGKGLEWVA IHWYDGSNKYYADSV KGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFYSSYYFDY WGQGTLVTVSS
96	VL P1-061015	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY DASN RATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFATYYC QQYNSYPY TFGQG TKLEIK
97	HC P1-061015 IgG1.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYA MHWVRQAPGKGLEWVAIHWYDGSNKYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFYSSYYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
98	LC P1-061015	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
99	VH P1-068748	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSHHA

		<u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVA <u>HIWYDGSNDDYADSV</u> <u>KGR</u> FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>RDSGFYDSYYFDY</u> WGQGLTVTVSS
100	VL P1-068748	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DASN</u> RATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFATYYC <u>QOYNSYPY</u> TFGQG TKLEIK
101	IIC P1-068748 IgG1.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTSHIIA MHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGSNDDYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFYDSYYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
102	LC P1-068748	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DASN</u> RATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFATYYCQOYNSYPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
103	VH P1-068744	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEYA <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVA <u>HIWYDGSNKYEADS</u> <u>VKG</u> RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARDSGFYESYYFDE</u> WGQGLTVTVSS
104	VL P1-068744	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DASN</u> RATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFATYYC <u>QOYNSYPY</u> TFGQG TKLEIK
105	HC P1-068744 IgG1.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEYA MHWVRQAPGKGLEWVAHIWYDGSNKYEADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFYESYYFDEWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

		QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
106	LC P1-068744	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
107	VH P1-068736	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSEYA MHW VVRQAPGKGLEWVA IDWYDGSNKDYADS VKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR DSGFYDSYYFDD WGQGLTVTVSS
108	VL P1-068736	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY DASNRAT GIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFATYYC COQYNSYPYTF GQG TKLEIK
109	HC P1-068736 IgG1.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEYA MHWVRQAPGKGLEWVAIDWYDGSNKDYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFYDSYYFDDWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
110	LC P1-068736	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
111	VH P1-068752	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYA MHW VVRQAPGKGLEWVA EIWYDGSNKDYADS VKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR DSGFYDSYYFDE WGQGLTVTVSS

112	VL P1-068752	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DASNRA</u> TGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFATYYC <u>QOYNSYPY</u> TFGQG TKLEIK
113	HC P1-068752 IgG1.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYA MHWVRQAPGKGLEWVAEIWYDGSNKDYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFYDSYYFDEWQGGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
114	LC P1-068752	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFATYYCQOYNSYPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
115	VH P1-068740	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS <u>GFTFSDYA</u> <u>MHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGS</u> <u>DKDYADSV</u> <u>KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA</u> <u>RDSGFYDSYYFDD</u> WGQGLTVTVSS
116	VL P1-068740	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DASNRA</u> TGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFATYYC <u>QOYNSYPY</u> TFGQG TKLEIK
117	HC P1-068740 IgG1.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYA MHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGSNDKYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFYDSYYFDDWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT

		TPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
118	LC P1-068740	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSYISLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
119	VH P1-068742	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS <u>GFTFSDYA</u> <u>MHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGSDDYADSV</u> <u>KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA</u> <u>RDSGFYEDYFDYWGQGLTVTVSS</u>
120	VL P1-068742	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DASNRAT</u> GIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFATYYC <u>QQYNSYPYTFGQG</u> TKLEIK
121	HC P1-068742 IgG1.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYA MHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGSDDYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFYEDYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
122	LC P1-068742	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSYISLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
123	VH P1-068746	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS <u>GFTFSSYA</u> <u>MHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGSNHHYADSV</u> <u>KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA</u> <u>RDSGFYDSYFDYWGQGLTVTVSS</u>
124	VL P1-068746	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DASNRAT</u> GIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFATYYC <u>QQYNSYPYTFGQG</u>

		TKLEIK
125	HC P1-068746 IgG1.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYA MHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGSNNHYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFYDSYYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
126	LC P1-068746	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELEPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
127	VH P1-068750	QVQLVFSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYD <u>MHWVRQAPGKGLEWVAEIIWDDGSNKYYADS</u> <u>YKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC</u> <u>ARDEEFYSSYYFDYWGQGLVTVSS</u>
128	VL P1-068750	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELEPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQG TKLEIK
129	HC P1-068750 IgG1.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYD MHWVRQAPGKGLEWVAEIIWDDGSNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDEEFYSSYYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
130	LC P1-068750	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA

		WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELEPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
131	VH P1-068738	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSEYA HH WVRQAPGKGLEWVA IIWDDG SNHY ADSV KGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFYEDYYFDY WGQGLTVTVSS
132	VL P1-068738	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY DASNRAT GIPARFSGSGS GTDFTLTISSELEPEDFATYYC QQYNSYPY TFGQG TKLEIK
133	HC P1-068738 IgG1.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEYA HHWVRQAPGKGLEWVAIIWDDGSNHYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFYEDYYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
134	LC P1-068738	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELEPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
135	VH P1-068754	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSDYD MH WVRQAPGKGLEWVA EIWDDG SNKY ADS VKG RTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSGFHSDYYFDY WGQGLTVTVSS
136	VL P1-068754	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY DASNRAT GIPARFSGSGS GTDFTLTISSELEPEDFATYYC QQYNSYPY TFGQG TKLEIK
137	HC P1-068754 IgG1.3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYD MHWVRQAPGKGLEWVAEIWDDGSNKYADSV

		KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDSGFHSDYYFDYWGGTLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
138	LC P1-068754	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLLEPEDFATYYCQQYNSYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
139	VH P1-069293 (P1-068761.IgG1f)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GFTLEDEA MHW VVRQAPGKGLEWVSGINWN SEEIGYADSV KGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR TD ALYYCA KVPGYSHGWIDAEDV WGQGTMTVSS
140	VL P1-069293 (P1-068761.IgG1f)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR ASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QOYGSSPFT FGPG TKVDIK
141	HC P1-069293 (P1-068761.IgG1f)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWN SEEIGYADSVK GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR TDALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
142	LC P1-069293 (P1-068761.IgG1f)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYC QOYGSSPFT FGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN

		NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
143	VH P1-069298 (P1-068767.IgG1f)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDYA</u> <u>MHWVVRQAPGKGLEWVS</u> <u>GIDWNS</u> <u>ENIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> <u>AKNSLYLQMN</u> <u>SLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAEDD</u> WGQGTMTVTVSS
144	VL P1-069298 (P1-068767.IgG1f)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
145	HC P1-069298 (P1-068767.IgG1f)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVVRQAPGKGLEWVSGIDWNSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDDVGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVKS NKAAPLPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
146	LC P1-069298 (P1-068767.IgG1f)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
147	VH P1-069302 (P1-061029.IgG1f)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLDDYA</u> <u>MHWVVRQAPGKGLEWVS</u> <u>GINWNS</u> <u>ANIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> <u>AKNSLYLQMN</u> <u>SLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAFDV</u> WGQGTMTVTVSS
148	VL P1-069302 (P1-061029.IgG1f)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
149	HC P1-069302 (P1-061029.IgG1f)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSANIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAFDVWGQGTMTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS

		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
150	LC P1-069302 (P1-061029.IgG1f)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
151	VH P1-069312 (P1-068761.IgG1f афукозилированное)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSS
152	VL P1-069312 (P1-068761.IgG1f афукозилированное)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEFAVYYC QQYGSSPFT FGPG TKVDIK
153	HC P1-069312 (P1-068761.IgG1f афукозилированное)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
154	LC P1-069312 (P1-068761.IgG1f афукозилированное)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

155	VH P1-069309 (P1-068767.IgG1f афукозилированное)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA <u>MHWVRQAPGKGLEWVS</u> <u>GIDWNS</u> <u>ENIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> <u>AKNSLYLQMN</u> <u>SLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAEDD</u> WGQGTMTVTVSS
156	VL P1-069309 (P1-068767.IgG1f афукозилированное)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
157	HC P1-069309 (P1-068767.IgG1f афукозилированное)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNS ~~ENIGYADSVK~~ GRFTISRDN ~~AKNSLYLQMN~~ SLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDD ~~WGQGTMTVTVSS~~ ASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALEPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
158	LC P1-069309 (P1-068767.IgG1f афукозилированное)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS TDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
159	VH P1-069307 (P1-061029.IgG1f афукозилированное)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA <u>MHWVRQAPGKGLEWVS</u> <u>GINWNS</u> <u>ANIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> <u>AKNSLYLQMN</u> <u>SLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAFDV</u> WGQGTMTVTVSS
160	VL P1-069307 (P1-061029.IgG1f афукозилированное)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
161	HC P1-069307 (P1-061029.IgG1f афукозилированное)	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNS ~~ANIGYADSV~~ KGRFTISRDN ~~AKNSLYLQMN~~ SLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAFDV ~~WGQGTMTVTVSS~~ ASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV

		TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
162	LC P1-069307 (P1-061029.IgG1f афукозилированное)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
163	IgG1.3 (или IgG1.3f) константная область тяжелой цепи (L234A, L235E, G237A)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHCTCPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
164	Пример константной области легкой цепи	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
165	человеческий VISTA NP_071436.1 (Fig. 1B)	See Fig. 1B
166	Сыно VISTA XP_005565644.1 (Fig. 1B)	See Fig. 1B
167	Мышиный VISTA NP_083008.1 (Fig. 1B)	See Fig. 1B
168	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7A)	<u>X</u> PGYSGGWIDAFDV
169	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7A)	<u>XX</u> GYSGGWIDAFDV
170	Олиго-чип HDR3	<u>XPX</u> YSGGWIDAFDV

	P1-061029 (Фиг. 7А)	
171	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7А)	<u>X</u> PG <u>X</u> SGGWIDAFDV
172	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7А)	<u>X</u> PGY <u>X</u> GGWIDAFDV
173	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7А)	<u>X</u> PGYS <u>X</u> GWIDAFDV
174	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7А)	<u>X</u> PGYSG <u>X</u> WIDAFDV
175	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7А)	<u>X</u> PGYSGG <u>X</u> IDAFDV
176	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7А)	<u>X</u> PGYSGGW <u>X</u> DAFDV
177	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7А)	<u>X</u> PGYSGGW <u>X</u> AFDV
178	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7А)	<u>X</u> PGYSGGWID <u>X</u> FDV
179	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7А)	<u>X</u> PGYSGGWIDA <u>X</u> DV
180	Олиго-чип HDR3 P1-061029 (Фиг. 7А)	<u>X</u> PGYSGGWIDAF <u>X</u> V
181	Олиго-чип HDR3 P1-061029	<u>X</u> PGYSGGWIDAFD <u>X</u>

	(Фиг. 7А)	
182	IgG1f (аллотип f дикого типа человека) константная область тяжелой цепи	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
183	IgG1.1f Константная область тяжелой цепи (L234A, L235E, G237A, A330S, P331S)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTPCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
184	Константная область тяжелой цепи (или IgG1fa.P238K IgG1.P238K)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
185	VH P1-070864 P1-068761_E30D	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDDEA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSS</u>
186	VL P1-070864 P1-068761_E30D	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPFTFGPGTKVDIK
187	HC P1-070864 P1-068761_E30D IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKVPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS

		LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
188	LC P1-070864 P1-068761_E30D	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
189	VH P1-070866 P1-068761_E32Y	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDYA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSV <u>KG</u> RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSHGWIDAEDV</u> WGQGTMTVTVSS
190	VL P1-070866 P1-068761_E32Y	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYG <u>ASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
191	HC P1-070866 P1-068761_E32Y IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
192	LC P1-070866 P1-068761_E32Y	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
193	VH P1-070868	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDEA</u>

	P1-068761_E55A	<u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSS</u>
194	VL P1-070868 P1-068761_E55A	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
195	IIC P1-070868 P1-068761_E55A IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
196	LC P1-070868 P1-068761_E55A	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
197	VH P1-070870 P1-068761_E56N	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDEA</u> <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSENIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSS</u>
198	VL P1-070870 P1-068761_E56N	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
199	HC P1-070870 P1-068761_E56N IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR

		EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
200	LC P1-070870 P1-068761_E56N	CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
201	VH P1-070872 P1-068761_H100G	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GFTLEDEA MH WVRQAPGKGLEWVS GINWNSEEIGYADSV KGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDV WGQGTMTVTVSS
202	VL P1-070872 P1-068761_H100G	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGS SPFTFGPG TKVDIK
203	HC P1-070872 P1-068761_H100G IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
204	LC P1-070872 P1-068761_H100G	CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
205	VH P1-070874 P1-068761_E100fF	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GFTLEDEA MH WVRQAPGKGLEWVS GINWNSEEIGYADSV KGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSHGWIDAEDV WGQGTMTVTVSS

206	VL P1-070874 P1-068761_E100fF	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
207	HC P1-070874 P1-068761_E100fF IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAFDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
208	LC P1-070874 P1-068761_E100fF	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
209	VH P1-070876 P1-068761_E30D_E32Y	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLDDYA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSV <u>KGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSHGWIDAEDV</u> WGQGTMTVTVSS
210	VL P1-070876 P1-068761_E30D_E32Y	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
211	HC P1-070876 P1-068761_E30D_E32Y IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY

		KTTTPVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
212	LC P1-070876 P1-068761_E30D_E32Y	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
213	VH P1-070878 P1-068761_E55A_E56N	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSANIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSHGWIDAEDV</u> WGQGTMTVTVSS
214	VL P1-070878 P1-068761_E55A_E56N	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYG <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
215	HC P1-070878 P1-068761_E55A_E56N IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSANIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVTS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
216	LC P1-070878 P1-068761_E55A_E56N	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
217	VH P1-070880 P1- 068761_H100G_E100fF	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAEDV</u> WGQGTMTVTVSS
218	VL P1-070880 P1-	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYG <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG

	068761_H100G_E100fF	TKVDIK
219	P1-070880 HC P1- 068761_H100G_E100fF IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAFDVGWQGTMVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
220	LC P1-070880 P1- 068761_H100G_E100fF	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
221	VH P1 070882 P1-068761_E32Y_E55A	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSHGWIDAEDVWGQTMVTVSS
222	VL P1-070882 P1-068761_E32Y_E55A	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QOYGSSPFT FGPG TKVDIK
223	HC P1-070882 P1-068761_E32Y_E55A IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVGWQGTMVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
224	LC P1-070882	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA

	P1-068761_E32Y_E55A	WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
225	VH P1-070884 P1-068761_E32Y_E56N	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA <u>MHWVRQAPGKGLEWVS</u> <u>GINWNSENIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSHGWIDAEDV</u> WGQGTMTVTVSS
226	VL P1-070884 P1-068761_E32Y_E56N	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
227	HC P1-070884 P1-068761_E32Y_E56N IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSENIGYADSVK GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSK NKALEPPIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
228	LC P1-070884 P1-068761_E32Y_E56N	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
229	VH P1-070886 P1-068761_E32Y_H100G	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA <u>MHWVRQAPGKGLEWVS</u> <u>GINWNSEEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAEDV</u> WGQGTMTVTVSS
230	VL P1-070886 P1-068761_E32Y_H100G	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
231	HC P1-070886 P1-068761_E32Y_H100G	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK

	IgG1.3	GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
232	LC P1-070886 P1-068761_E32Y_H100G	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
233	VH P1-070888 P1-068761_E32Y_E100F	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDYA</u> <u>MHWV</u> RQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSV <u>KGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSHGWIDAFDV</u> WGQGTMTVTVSS
234	VL P1-070888 P1-068761_E32Y_E100F	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR <u>ASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
235	HC P1-070888 P1-068761_E32Y_E100F IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAFDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
236	LC P1-070888 P1-068761_E32Y_E100F	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLN

		NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
237	VH P1-070890 P1-068761_E30D_E55A	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLDDDEA</u> <u>MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSS</u>
238	VL P1-070890 P1-068761_E30D_E55A	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
239	HC P1-070890 P1-068761_E30D_E55A IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDDEA MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKAALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
240	LC P1-070890 P1-068761_E30D_E55A	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
241	VH P1-070892 P1-068761_E30D_E56N	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLDDDEA</u> <u>MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSS</u>
242	VL P1-070892 P1-068761_E30D_E56N	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
243	HC P1-070892 P1-068761_E30D_E56N IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDDEA MHWVVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW

		NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS LGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
244	LC P1-070892 P1-068761_E30D_E56N	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
245	VH P1-070894 P1-068761_E30D_H100G	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GF TL DDEA MH WVRQAPGKGLEWVS GINWNSEEIGYADSV KGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDV WGQGTMTVTVSS
246	VL P1-070894 P1-068761_E30D_H100G	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPFT FGPG TKVDIK
247	HC P1-070894 P1-068761_E30D_H100G IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGF TL DDEA MHWVRQAPGKGLEWVS GINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS LGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
248	LC P1-070894 P1-068761_E30D_H100G	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

249	VH P1-070896 P1-068761_E30D_E100fF	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDEA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSHGWIDAFDV</u> WGQGTMTVTVSS
250	VL P1-070896 P1-068761_E30D_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
251	HC P1-070896 P1-068761_E30D_E100fF IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSEEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAFDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKAALPAIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
252	LC P1-070896 P1-068761_E30D_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
253	VH P1-070898 P1-068761_E55A_E100fF	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSHGWIDAFDV</u> WGQGTMTVTVSS
254	VL P1-070898 P1-068761_E55A_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
255	HC P1-070898 P1-068761_E55A_E100fF IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSAEIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAFDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

		CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
256	LC P1-070898 P1-068761_E55A_E100f	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
257	VH P1-070900 P1-068761_E56N_H100G	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDEA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVSGINWNS <u>ENIGYADSV</u> <u>KGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMN <u>SLRTED</u> TALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAEDV</u> WGQGTMTVTVSS
258	VL P1-070900 P1-068761_E56N_H100G	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR <u>ASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGS</u> <u>SPFT</u> FGPG TKVDIK
259	HC P1-070900 P1-068761_E56N_H100G IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNS <u>ENIGYADSV</u> GRFTISRDNAKNSLYLQMN <u>SLRTED</u> TALYYCAK VPGYSGGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTH CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
260	LC P1-070900 P1-068761_E56N_H100G	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
261	VH P1-070902 P1-068761_E56N_E100f	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDEA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVSGINWNS <u>ENIGYADSV</u> <u>KGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMN <u>SLRTED</u> TALYYCA

		KVPGYSHGWIDAFDV WGQGTMTVTVSS
262	VL P1-070902 P1-068761_E56N_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QOYGSSPFT FGPG TKVDIK
263	HC P1-070902 P1-068761_E56N_E100fF IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDEA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSHGWIDAFDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
264	LC P1-070902 P1-068761_E56N_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYC QOYGSSPFT FGPGTK VDIKRTVAAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCCLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
265	VH P1-070904 P1-068767_E30D	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GFTLDDYA MH WVRQAPGKGLEWVS GIDWNS ENIGYADSV KGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDD WGQGTMTVTVSS
266	VL P1-070904 P1-068767_E30D	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QOYGSSPFT FGPG TKVDIK
267	HC P1-070904 P1-068767_E30D IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM

		TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
268	LC P1-070904 P1-068767_E30D	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
269	VH P1-070906 P1-068767_D52N	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDYA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>GINWNS</u> ENIGYADSV <u>KGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAEDD</u> WGQGTMTVTVSS
270	VL P1-070906 P1-068767_D52N	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR <u>ASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
271	HC P1-070906 P1-068767_D52N IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDDVGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKAIPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
272	LC P1-070906 P1-068767_D52N	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
273	VH P1-070908 P1-068767_E55A	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDYA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>GIDWNS</u> ANIGYADSV <u>KGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAEDD</u> WGQGTMTVTVSS
274	VL P1-070908 P1-068767_E55A	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR <u>ASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS

		GTDFLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
275	HC P1-070908 P1-068767_E55A IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSANIGYADSV KGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
276	LC P1-070908 P1-068767_E55A	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
277	VH P1-070910 P1-068767_E100fF	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDYA</u> <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNS</u> <u>ENIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAFDD</u> WGQGTMTVSS
278	VL P1-070910 P1-068767_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR <u>ASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
279	HC P1-070910 P1-068767_E100fF IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSANIGYADSVK GRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAFDDWGQGTMTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

280	LC P1-070910 P1-068767_E100fF	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
281	VH P1-070912 P1-068767_D102V	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TLEDYA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>GIDW</u> <u>NS</u> <u>ENIGYADSV</u> <u>KGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAEDV</u> WGQGTMTVTVSS
282	VL P1-070912 P1-068767_D102V	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
283	HC P1-070912 P1-068767_D102V IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGF <u>TLEDYA</u> MHWVRQAPGKGLEWVSGIDW <u>NS</u> <u>ENIGYADSVK</u> GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHT CPPCPAPEAFEGAPSVFI.FPPKPKDITLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
284	LC P1-070912 P1-068767_D102V	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
285	VH P1-070914 P1-068767_E30D_D52N	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TLD</u> <u>DDYA</u> <u>MH</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>GINW</u> <u>NS</u> <u>ENIGYADSV</u> <u>KGR</u> FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAEDD</u> WGQGTMTVTVSS
286	VL P1-070914 P1-068767_E30D_D52N	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
287	HC P1-070914	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGF <u>TLD</u> <u>DDYA</u>

	P1-068767_E30D_D52N IgG1.3	MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVTSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKAALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
288	LC P1-070914 P1-068767_E30D_D52N	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
289	VH P1-070916 P1-068767_D52N_E55A	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSANIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVTSS</u>
290	VL P1-070916 P1-068767_D52N_E55A	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPG TKVDIK
291	HC P1-070916 P1-068767_D52N_E55A IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSANIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDDWGQGTMTVTSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
292	LC P1-070916 P1-068767_D52N_E55A	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK

		VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
293	VH P1-070918 P1-068767_E55A_E100fF	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GF <u>TLEDYA</u> MHW VVRQAPGKGLEWVSGIDWNSANIGYADSV KGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAFDD WGQGTMTVTVSS
294	VL P1-070918 P1-068767_E55A_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPFT FGPG TKVDIK
295	HC P1-070918 P1-068767_E55A_E100fF IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGF TLEDYA MHWVVRQAPGKGLEWVSGIDWNSANIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAFDDWGQGTMTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
296	LC P1-070918 P1-068767_E55A_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS TDFLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPFT FGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
297	VH P1-070920 P1- 068767_E100fF_D102V	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS GF <u>TLEDYA</u> MHW VVRQAPGKGLEWVSGIDWNS ENIGYADSV KGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAFDV WGQGTMTVTVSS
298	VL P1-070920 P1- 068767_E100fF_D102V	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPFT FGPG TKVDIK
299	HC P1-070920 P1- 068767_E100fF_D102V	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGF TLEDYA MHWVVRQAPGKGLEWVSGIDWNS ENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAFDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS

	IgG1.3	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
300	LC P1-070920 P1- 068767_E100f_D102V	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
301	VH P1-070922 P1-068767_E30D_E55A	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLDDYA</u> <u>MHWVRQAPGKGLEWVS</u> <u>GIDWNSANIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAEDD</u> WGQGMVTVSS
302	VL P1-070922 P1-068767_E30D_E55A	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
303	HC P1-070922 P1-068767_E30D_E55A IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSANIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDDWGQGMVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
304	LC P1-070922 P1-068767_E30D_E55A	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS

		SPVTKSFNRGEC
305	VH P1-070924 P1-068767_E30D_E100fF	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSENIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAFDD</u> WGQGTMTVTVSS
306	VL P1-070924 P1-068767_E30D_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
307	HC P1-070924 P1-068767_E30D_E100fF IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAFDDWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALEPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
308	LC P1-070924 P1-068767_E30D_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
309	VH P1-070926 P1-068767_E30D_D102V	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA <u>MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSENIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAEDV</u> WGQGTMTVTVSS
310	VL P1-070926 P1-068767_E30D_D102V	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
311	HC P1-070926 P1-068767_E30D_D102V IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT

		CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
312	LC P1-070926 P1-068767_E30D_D102V	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
313	VH P1-070928 P1-068767_D52N_E100fF	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDYA</u> <u>MHWVRQAPGKGLEWVS</u> <u>GINWNSENIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA</u> <u>KVPGYSGGWIDAFDDW</u> GQGTMVTVSS
314	VL P1-070928 P1-068767_D52N_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYG <u>ASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSPPFT</u> FGPG TKVDIK
315	HC P1-070928 P1-068767_D52N_E100fF IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGINWNSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAFDDWQGTMVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNIAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
316	LC P1-070928 P1-068767_D52N_E100fF	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
317	VH P1-070930 P1-068767_D52N_D102V	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDYA</u> <u>MHWVRQAPGKGLEWVS</u> <u>GINWNSENIGYADSV</u>

		<u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAED</u> VWGQGTMTVTVSS
318	VL P1-070930 P1-068767_D52N_D102V	EIVLTQSPGTL ~~SL~~ SPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
319	HC P1-070930 P1-068767_D52N_D102V IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MIHWVRQAPGKGLEWVSGINWSENIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK VPGYSGGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
320	LC P1-070930 P1-068767_D52N_D102V	EIVLTQSPGTL ~~SL~~ SPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
321	VH P1-070932 P1-068767_E55A_D102V	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAAS <u>GFTLEDYA</u> <u>MHWVRQAPGKGLEWVS</u> <u>GIDWNSANIGYADSV</u> <u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA <u>KVPGYSGGWIDAED</u> VWGQGTMTVTVSS
322	VL P1-070932 P1-068767_E55A_D102V	EIVLTQSPGTL ~~SL~~ SPGERATLSC <u>RASQSVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPFT</u> FGPG TKVDIK
323	HC P1-070932 P1-068767_E55A_D102V IgG1.3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTLEDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGIDWNSANIGYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCA KVPGYSGGWIDAEDVWGQGTMTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV

		SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
324	LC P1-070932 P1-068767_E55A_D102V	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
325	hVISTA-ECD 6-His метка	AFKVATPYSL YVCPEGQNVLT LTRLLGPVD KGHDVTFYKT WYRSSRGEVQ TCSERRPIRN LTFQDLHLHH GGHQAANTSH DLAQRHGLES ASDHHGNFSI TMRNLTLLDS GLYCCLVVEI RHHHSEHRVH GAMELQVQTG KDAPSNCVVY PSSSQESEN TAHHHHHHH
326	Cyno VISTA-ECD 6-His метка	AFKVATLYSL YVCPEGQNVLT LTRVFGPVD KGHDVTFYKT WYRSSRGEVQ TCSERRPIRN LTFQDLHLHH GGHQAANTSH DLAQRHGLES ASDHHGNFSI TMRNLTLLDS GLYCCLVVEI RHHHSEHRVH GAMELQVQTG KDAPSSCVAY PSSSQESEN TAHHHHHHH
327	ДНК VH P1-069059	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCAACCCTTGAAGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGACCATATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
328	ДНК VL P1-069059	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA

		GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAGTGGATAT CAAA
329	ДНК VH P1-069061	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAAGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGCTGAAATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
330	ДНК VL P1-069061	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAGTGGATAT CAAA
331	ДНК VH P1-069063	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAAGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGCTGAAATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGACGATGAATGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
332	ДНК VL P1-069063	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC

		TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
333	ДНК VH P1-069065	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAAGATGAA GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGACGACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
334	ДНК VL P1-069065	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
335	ДНК VH P1-069067	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAAATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGACGATGAATGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
336	ДНК VL P1-069067	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT

		CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
337	ДНК VH P1-069069	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAAATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGACGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
338	ДНК VL P1-069069	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
339	ДНК VH P1-069071	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAAGATGAA GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGCTGACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGAAGGCTGGAT TGACGCTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
340	ДНК VL P1-069071	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCT

		GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
341	ДНК VH P1-069073	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTGAAGATGAA GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGCTGAAATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
342	ДНК VL P1 069073	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
343	ДНК VH P1-069075	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTGAAGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGG ACAGTGCTGAAATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA

344	ДНК VL P1-069075	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
345	ДНК VH P1-069077	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAAGATGAA GCCATGCAGTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGACGAAATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
346	ДНК VL P1-069077	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
347	ДНК VH P1-068761	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCAGTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA

		ATGGTCACCGTCTCTTCA
348	ДНК VL P1-068761	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCAATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
349	ДНК VH P1-068767	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
350	ДНК VL P1-068767	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCAATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
351	ДНК VH P1-068773	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGATAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT

		TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
352	ДНК VL P1-068773	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
353	ДНК VH P1-068765	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCAACGATGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GC AAAAGTTCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
354	ДНК VL P1-068765	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
355	ДНК VH P1-061029	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCAACCTTGATGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGCTAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT

		GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
356	ДНК VL P1-061029	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
357	ДНК VH P1-068757	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTAATCTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
358	ДНК VL P1-068757	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
359	ДНК VH P1-068771	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTCATGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC

		TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
360	ДНК VL P1-068771	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
361	ДНК VH P1-068775	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
362	ДНК VL P1-068775	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
363	ДНК VH P1-068769	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGATCACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC

		CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
364	ДНК VL P1-068769	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
365	ДНК VH P1-068759	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
366	ДНК VL P1-068759	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
367	ДНК VH P1-068763	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG

		AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTCA
368	ДНК VL P1-068763	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
369	ДНК VH P1-061015	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG TGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTA TGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATGGTAT GATGGAAGTAATAATACTATGCAGACTCCGT GAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG TGCGAGAGATAGTGGTTTTACTCCTCGTACT ACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTC ACCGTCTCCTCA
370	ДНК VL P1-061015	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACT GGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTGCAA CTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCG TACACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA
371	ДНК VH P1-068748	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG TGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTCACCA TGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATGGTAT

		GATGGAAGTAATGACGACTATGCAGACTCCGT GAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG TGCGAGAGATAGTGGTTTTTACGACTCGTACT ACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTC ACCGTCTCCTCA
372	ДНК VL P1-068748	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACTCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCG TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA
373	ДНК VH P1-068744	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG TGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTGAGTA TGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCACATATATGGTAT GATGGAAGTAATAAATACGAGGCAGACTCCG TGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAT TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACT GTGCGAGAGATAGTGGTTTTTACGAATCGTAC TACTTTGACGAGTGGGGCCAGGGAACCTGGT CACCGTCTCCTCA
374	ДНК VL P1-068744	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACTCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCG TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA
375	ДНК VH P1-068736	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG TGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTGAGTA TGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA

		AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTGATTGGTAT GATGGAAGTAATAAAGACTATGCAGACTCCGT GAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG TGCGAGAGATAGTGGTTTTTACGACTCGTACT ACTTTGACGACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
376	ДНК VL P1-068736	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCATCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCG TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA
377	ДНК VH P1-068752	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG TGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTA TGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGAGATATGGTA TGATGGAAGTAATAAAGACTATGCAGACTCCG TGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAT TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACT GTGCGAGAGATAGTGGTTTTTACGACTCGTAC TACTTTGACGAGTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCCTCTCCTCA
378	ДНК VL P1-068752	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCATCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCG TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA
379	ДНК VH P1-068740	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG TGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTGACTA

		TGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATGGTAT GATGGAAAGTGATAAAGACTATGCAGACTCCGT GAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG TGCGAGAGATAGTGGTTTTTACGACTCGTACT ACTTTGACGACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
380	ДНК VL P1-068740	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA ACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACTCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCG TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA
381	ДНК VH P1-068742	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG TGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTCACTTCAGTGACTA TGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATGGTAT GATGGAAGTGATAAAGACTATGCAGACTCCGT GAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG TGCGAGAGATAGTGGTTTTTACGAAGATTACT ACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
382	ДНК VL P1-068742	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA ACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACTCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCG TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA
383	ДНК VH P1-068746	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG TGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC

		TGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTA TGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATGGTAT GATGGAAGTAATCACCCTATGCAGACTCCGT GAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG TGCGAGAGATAGTGGTTTTACGACTCGTACT ACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
384	ДНК VL P1-068746	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTACAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCG TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA
385	ДНК VH P1-068750	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG TGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTGACTA TGACATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGAGATATGGGA TGATGGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCG TGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAT TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACT GTGCGAGAGATGAGGAATTTTACTCCTCGTAC TACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGT CACCGTCTCCTCA
386	ДНК VL P1-068750	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTACAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCG TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA
387	ДНК VH P1-068738	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG

		TGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTGAGTA TGCCCATCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATGGGAT GATGGAAGTAATCACTACTATGCAGACTCCGT GAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG TGCGAGAGATAGTGGTTTTACGAAGATTACT ACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
388	ДНК VL P1-068738	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA ACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCCTCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCG TACACTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA
389	ДНК VH P1 068754	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG TGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTGACTA TGACATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGAGATATGGGA TGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCG TGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAT TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACT GTGCGAGAGATAGTGGTTTTCACTCCGATTAC TACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGT CACCGTCTCCTCA
390	ДНК VL P1-068754	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA ACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCCTCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCG TACACTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT CAAA

391	ДНК VH P1-070864	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
392	ДНК VL P1-070864	GAAATTGTGTTGACGCACTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAACTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
393	ДНК VH P1-070866	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
394	ДНК VL P1-070866	GAAATTGTGTTGACGCACTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAACTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT

		CAAA
395	ДНК VH P1-070868	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGCTGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
396	ДНК VL P1-070868	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
397	ДНК VH P1-070870	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
398	ДНК VL P1-070870	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA

		TTCAC TTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
399	ДНК VH P1-070872	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
400	ДНК VL P1-070872	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTCAG TGATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCAC TTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
401	ДНК VH P1-070874	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
402	ДНК VL P1-070874	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTCAG

		TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
403	ДНК VH P1-070876	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
404	ДНК VL P1-070876	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
405	ДНК VH P1-070878	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGCTAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
406	ДНК VL P1-070878	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC

		CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
407	ДНК VH P1-070880	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGTCACCGTCTCTTCA
408	ДНК VL P1-070880	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
409	ДНК VH P1-070882	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGTGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
410	ДНК VL P1-070882	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT

		GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
411	ДНК VH P1-070884	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
412	ДНК VL P1-070884	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
413	ДНК VH P1-070886	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
414	ДНК VL P1-070886	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA

		GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
415	ДНК VH P1-070888	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGGTACCGTCTCTTCA
416	ДНК VL P1-070888	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAACTTGCCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCAATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
417	ДНК VH P1-070890	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGCTGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTACCGTCTCTTCA
418	ДНК VL P1-070890	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAACTTGCCCA

		GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAGTGGATAT CAAA
419	ДНК VH P1-070892	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
420	ДНК VL P1-070892	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAGTGGATAT CAAA
421	ДНК VH P1-070894	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
422	ДНК VL P1-070894	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC

		TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
423	ДНК VH P1-070896	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
424	ДНК VL P1-070896	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
425	ДНК VH P1-070898	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGTGAGATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
426	ДНК VL P1-070898	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT

		CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
427	ДНК VH P1-070900	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
428	ДНК VL P1-070900	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
429	ДНК VH P1-070902	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATGAG GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCCATGGCTGGAT TGACGCTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
430	ДНК VL P1-070902	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCT

		GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTAATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
431	ДНК VH P1-070904	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
432	ДНК VL P1 070904	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTAATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
433	ДНК VH P1-070906	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA

434	ДНК VL P1-070906	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
435	ДНК VH P1-070908	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCAGTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGCTAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTACCCGTCTCTCA
436	ДНК VL P1-070908	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
437	ДНК VH P1-070910	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCAGTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTTTGATGACTGGGGCCAAGGGACAA

		TGGTCACCGTCTCTTCA
438	ДНК VL P1-070910	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCAATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
439	ДНК VH P1-070912	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAAGATGTCTGGGGCCAAAGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
440	ДНК VL P1-070912	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCAATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
441	ДНК VH P1-070914	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT

		TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
442	ДНК VL P1-070914	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
443	ДНК VH P1-070916	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGCTAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GC AAAAGTTCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
444	ДНК VL P1-070916	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
445	ДНК VH P1-070918	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGCTAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT

		GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTTTTGATGACTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
446	ДНК VL P1-070918	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
447	ДНК VH P1-070920	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
448	ДНК VL P1-070920	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
449	ДНК VH P1-070922	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGCTAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC

		TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGACTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
450	ДНК VL P1-070922	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
451	ДНК VH P1-070924	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTTTGATGACTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
452	ДНК VL P1-070924	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
453	ДНК VH P1-070926	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGATGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC

		CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
454	ДНК VL P1-070926	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
455	ДНК VH P1-070928	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGT GCAAAAGTTCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTTTGATGACTGGGGCCAAGGGACAA TGGTCACCGTCTCTTCA
456	ДНК VL P1-070928	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTGGATAT CAAA
457	ДНК VH P1-070930	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAATTGGA ACAGTGAAAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG

		AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTAATCTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
458	ДНК VL P1-070930	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
459	ДНК VH P1-070932	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCCCTTGAGGATTAT GCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTGATTGGA ACAGTGCTAACATAGGCTATGCGGACTCTGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTC TGAGAACTGAGGACACGGCCTTGTAATCTGT GCAAAAGTTCCTGGGTATAGCGGTGGCTGGAT TGACGCTGAAGATGTCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCA
460	ДНК VL P1-070932	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCA TTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAA
461	ДНК константной области тяжелой цепи IgG1.3	GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCT GGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTC AGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCC

		CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTC ACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCC GAAGGGGCCCCGTCACTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGA CCCCGTAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTG AGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAG CAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAG CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCT GCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGAC CACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGCGTCG ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGC CCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CAGGACACCTACATCTGCAACGTGAATCACA AGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAT GCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGAAGG GGCCCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTG AGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCGTAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCC
		CCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGAGACAACCTACAAGACCAC GCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTTGA
462	Пример константной легкой цепи	ДНК области CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGA GAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGACCCCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGTTAG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с Ig-V-домен супрессором Т-клеточной активации человека (hVISTA),
где антитело связывается с hVISTA в кислых условиях,
кислые условия представляют собой условия с pH, равным от 6,0 до 6,5,
антитело содержит:

- (i) VL CDR1, CDR2 и CDR3 P1-061029, где VL CDR1, CDR2 и CDR3 P1-061029 содержит положения 24-35, 51-57 и 90-98 SEQ ID NO:68 и VH CDR1, CDR2 и CDR3 P1-068767 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:55), P1-068761 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:51), P1-069061 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:15),

P1-069059 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:11),
 P1-068773 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:59),
 P1-069073 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:39),
 P1-068765 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:63),
 P1-068757 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:71),
 P1-068771 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:75),
 P1-068769 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:83),
 P1-068775 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:79),
 P1-068759 (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:87),
 P1-068761_E55A (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:193),
 P1-068761_H100G (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:201),
 P1-068761_E56N (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:197),
 P1-068761_E55A_E56N (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:213),
 P1-068761_E30D (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:185),
 P1-068761_E30D_E55A (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:237),
 P1-068761_E56N_H100G (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:257),
 P1-068761_E30D_H100G (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:245),
 P1-068761_E30D_E56N (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:241),
 P1-068767_D52N (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:269),
 P1-068767_D52N_E55A (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:289),
 P1-068767_E55A (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:273),
 P1-068767_E30D_D52N (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:285),
 P1-068767_E30D (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:265),
 P1-068767_E30D_E55A (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:301),
 P1-068767_E55A_E100ff (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:293),
 P1-068767_D52N_E100ff (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:313),
 P1-068767_E100ff (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:277) или
 P1-068767_E30D_E100ff (положения 26-35, 50-66 и 99-112 SEQ ID NO:305); или
 антитело содержит:

(ii) VL CDR1, CDR2 и CDR3 P1-061015 (положения 24-35, 51-57 и 90-98 SEQ ID NO:96) и VH CDR1, CDR2 и CDR3

P1-068748 (положения 26-35, 50-66 и 99-110 SEQ ID NO:99),
 P1-068744 (положения 26-35, 50-66 и 99-110 SEQ ID NO:103),
 P1-068736 (положения 26-35, 50-66 и 99-110 SEQ ID NO:107) или
 P1-068752 (положения 26-35, 50-66 и 99-110 SEQ ID NO:111).

2. Выделенное антитело по п.1, где указанное антитело связывается с hVISTA в кислых условиях со значением K_D , которое по меньшей мере в 10 раз меньше, по меньшей мере в 100 раз меньше или по меньшей мере в 1000 раз меньше, чем его значение K_D в нейтральных или физиологических условиях, где нейтральные условия представляют собой условия с pH 7,0 и физиологические условия представляют собой условия с pH 7,4.

3. Выделенное антитело по п.1 или 2, где антитело связывается с hVISTA в нейтральных или физиологических условиях со значением K_D , равным 10^{-5} М или более, с K_D 10^{-4} М или более или с K_D 10^{-3} М или более, и необязательно, где антитело связывается с hVISTA в кислых условиях со значением K_D , равным 10^{-7} М или менее, со значением K_D , равным 10^{-8} М или менее, или со значением K_D 10^{-9} М или менее.

4. Выделенное антитело по любому из пп.1-3, где указанное антитело связывается с hVISTA в кислых условиях с k_{off} , которое по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз меньше его значения k_{off} в нейтральных или физиологических условиях.

5. Выделенное антитело по пп.1-4, которое связывается в богатой гистидином области hVISTA или около нее в условиях, имеющих pH 6,0-6,5.

6. Выделенное антитело по любому из пп.1-5, которое конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание с hVISTA с одним или более антителами, содержащими:

(а) VH, содержащим SEQ ID NO:67, 71, 87, 51, 91, 63, 55, 83, 75, 59, 79, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 193, 201, 197, 213, 185, 237, 257, 245, 241, 205, 253, 217, 249, 261, 189, 221, 225, 209, 229, 233, 317, 269, 289, 321, 281, 273, 285, 309, 265, 301, 297, 293, 313, 277 или 305, и VL, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, или содержащими:

(b) VH, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95, 107, 131, 115, 119, 103, 99, 127, 111 или 135, и VL, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:96.

7. Выделенное антитело по любому из пп.1-6, которое не демонстрирует значительного связывания с hVISTA, в котором мутирован один или более из следующих аминокислотных остатков: T35, Y37, K38, T39, Y41, R54, T61, F62, Q63, L65, H66, L67, H68, H69, F97, L115, V117, I119, H121, H122, S124, E125, R127.

8. Выделенное антитело по любому из пп.1-7, где выделенное антитело обладает одним или несколькими из следующих свойств:

- а) специфически связывается с hVISTA в кислых условиях, но незначительно в нейтральных или физиологических условиях;
- б) связывается с супоVISTA;
- в) ингибирует связывание hVISTA с человеческими Т-клетками в условиях, имеющих pH менее 7,0;
- г) ингибирует связывание hVISTA с huPSGL-1 в условиях, имеющих pH менее 7,0;
- д) ингибирует связывание hVISTA с гепарансульфатными протеогликами;
- е) ингибирует связывание hVISTA с гепарансульфатными протеогликами в условиях, имеющих pH менее 7,0;
- ж) стимулирует активацию Т-клеток в условиях, имеющих pH менее 7,0;
- з) снижает VISTA-опосредованную клеточную адгезию;
- и) имеет среднее время пребывания антитела в организме яванского макака по меньшей мере 500 дней;
- й) не имеет значимого связывания с VISTA-положительными клетками, например нейтрофилами, в периферической крови индивида, которому оно введено;
- к) не приводит к существенному истощению VISTA-положительных клеток, например нейтрофилов, в периферической крови индивида, которому оно введено; и
- л) имеет изоэлектрическую точку (pI) от 6,5 до 6,8, как измерено с помощью icIEF.

9. Выделенное антитело по любому из пп.1-8, которое представляет собой антитело IgG.

10. Выделенное антитело по п.9, которое содержит IgG1, IgG2 или IgG4 константную область тяжелой цепи человека.

11. Выделенное антитело по п.9, которое содержит IgG4 константную область тяжелой цепи человека с заменой S228P.

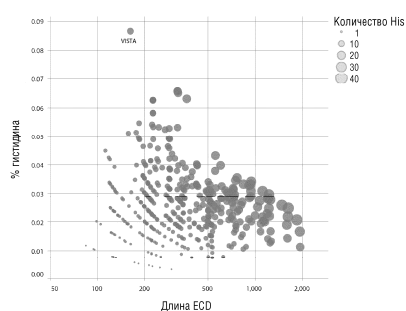
12. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.1-11.

13. Композиция для экспрессии антитела по любому из пп.1-11, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь указанного антитела, и нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь указанного антитела.

14. Клетка, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п.12 или композиции по п.13.

15. Способ получения выделенного антитела, которое специфически связывается с Ig-V-домен супрессором Т-клеточной активации (hVISTA) в кислых условиях, включающий культивирование клетки по п.14 в условиях, при которых экспрессируется антитело.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело по любому из пп.1-11, которое специфически связывается с Ig-V-домен супрессором Т-клеточной активации (hVISTA) в кислых условиях, или содержит выделенную нуклеиновую кислоту, композицию или клетку по любому из пп.12-14, кодирующую или экспрессирующую антитело, и также содержащая фармацевтически приемлемый носитель.



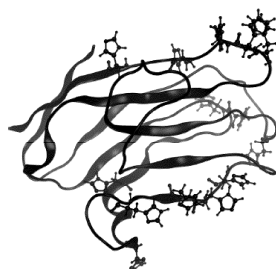
Фиг. 1А

Сохранявшиеся остатки гистидина у Hu/Cy/Ms (выделены жирным шрифтом, подчеркнуты)

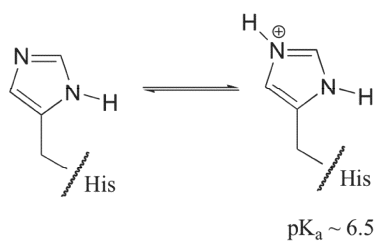
Сохранявшиеся остатки гистидина у Hu/Cy (выделены жирным шрифтом)

Человеческий NP_071436.1	Sig- FRVATEYSLVCPFGQNVTLTCRLLLGPEVDRGHDVTFYKWTWR
Яванского макака XP_005565644.1	Sig- FRVATLYSLVCPFGQNVTLTCRVFGPEVDRGHDVTFYKWTWR
Мышиный NP_083008.1	Sig- FRVTFYSLVCPFGQNVTLTCRLLLGPEVDRGHDVTFYKWTWR
Человеческий NP_071436.1	SSRGEVQTCSERRPFRNLTPQDLH HC QQAANTS DLAQRH CLES
Яванского макака XP_005565644.1	SSRGEVQTCSERRPFRNLTPQDLH HC QQAANTS DLAQRH CLES
Мышиный NP_083008.1	SSRGEVQTCSERRPFRNLTPQDLH HC QQAANTS DLAQRH CLES
Человеческий NP_071436.1	ASD HC GNFSITMRNLTLDSGLYCLVVEIR HC SRVWGAMELQV
Яванского макака XP_005565644.1	ASD HC GNFSITMRNLTLDSGLYCLVVEIR HC SRVWGAMELQV
Мышиный NP_083008.1	ASD HC GNFSITMRNLTLDSGLYCLVVEIR HC SRVWGAMELQV
Человеческий NP_071436.1	QTGRDAPSNVCVYPSSQDSNTAA -TMD
Яванского макака XP_005565644.1	QTGRDAPSNVCVYPSSQDSNTAA -TMD
Мышиный NP_083008.1	QTGRDAPSNVCVYPSSQDSNTAA -TMD

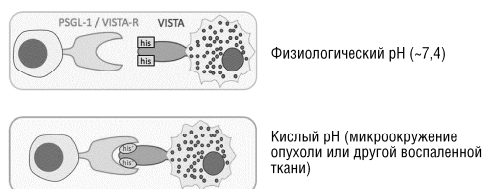
Фиг. 1В



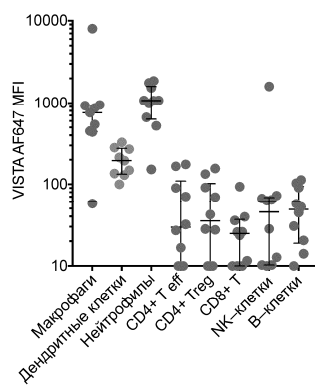
Фиг. 1С



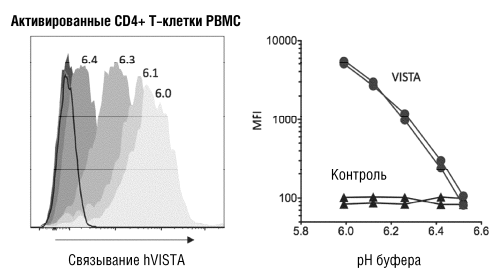
Фиг. 2А



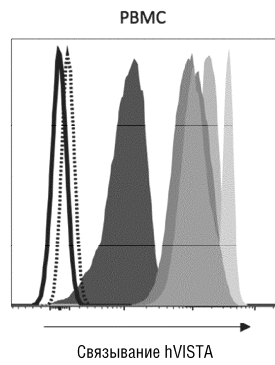
Фиг. 2В



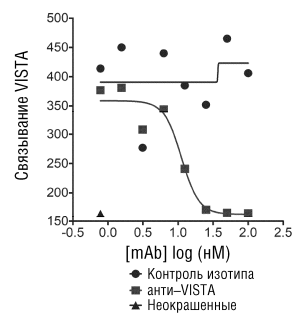
Фиг. 3



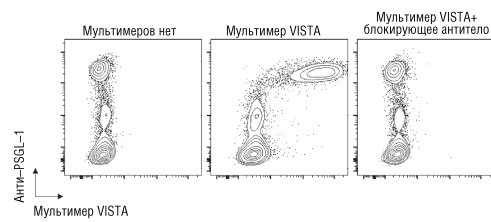
Фиг. 4А



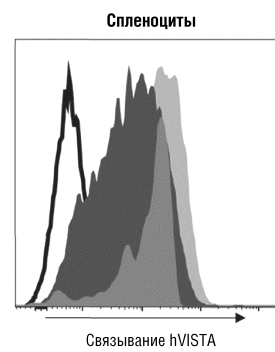
Фиг. 4B



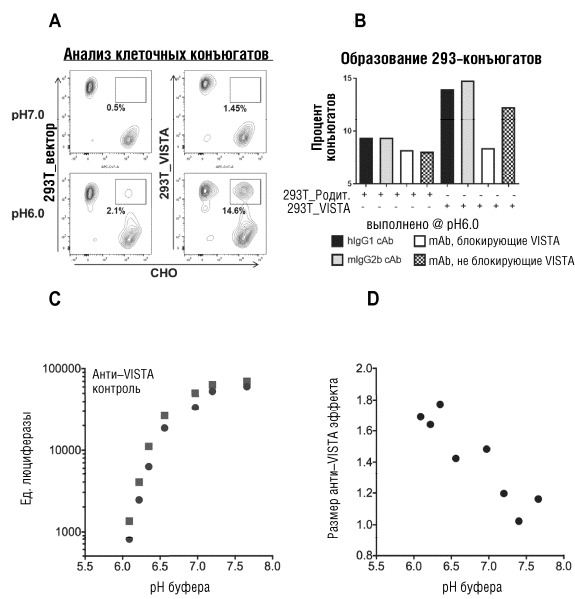
Фиг. 4C



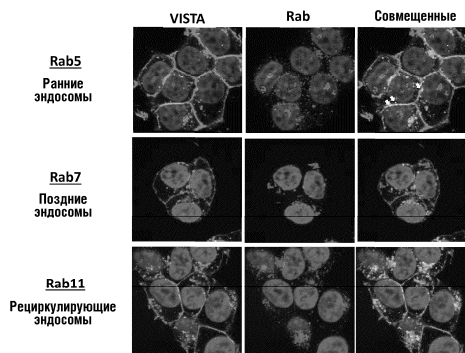
Фиг. 4D



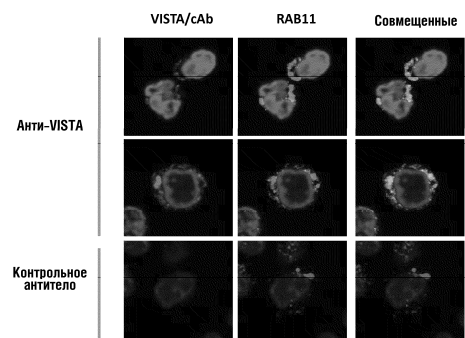
Фиг. 4E



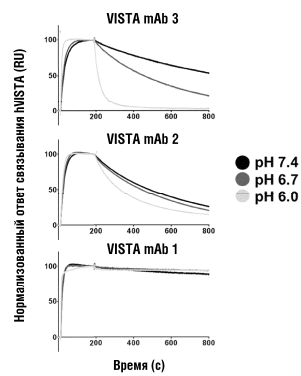
Фиг. 5A-D



Фиг. 6A

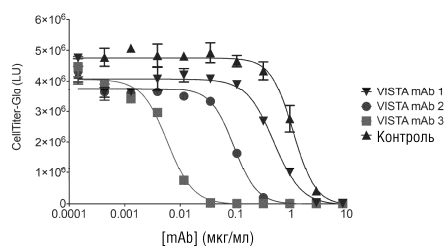


Фиг. 6B

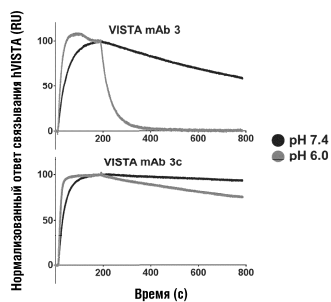


Фиг. 6C

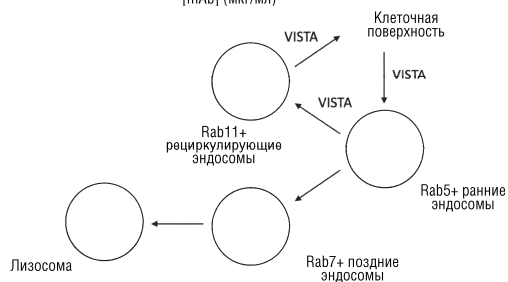
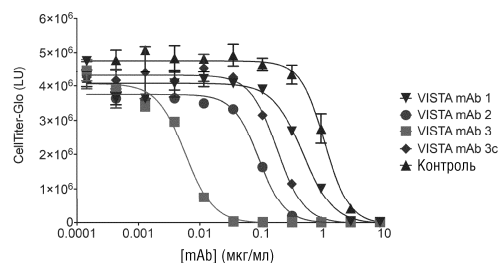
042790



ФИГ. 6D



Фиг. 6Е

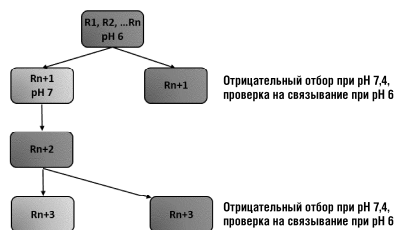


ФИГ. 6G

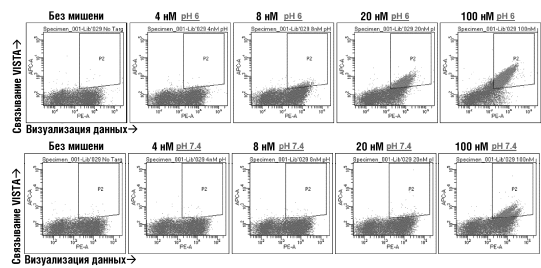


1. X = H, D или E
2. Заключенные в скобки последовательности были исключены из синтеза, чтобы избежать введения каких-либо негативных признаков

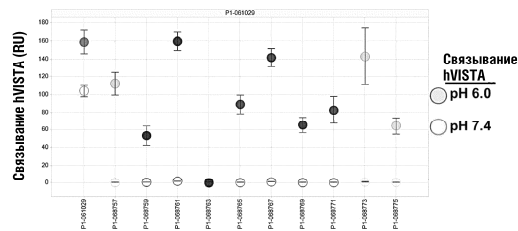
Фиг. 7А



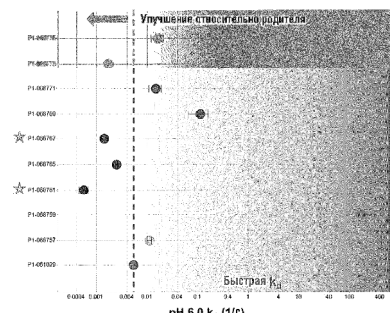
ФИГ. 7В



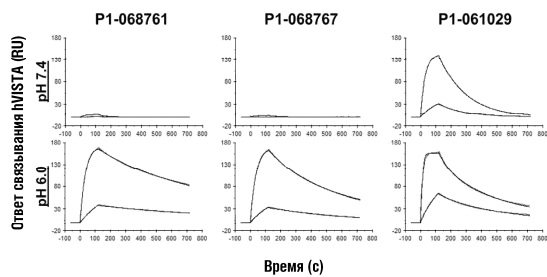
Фиг. 7C



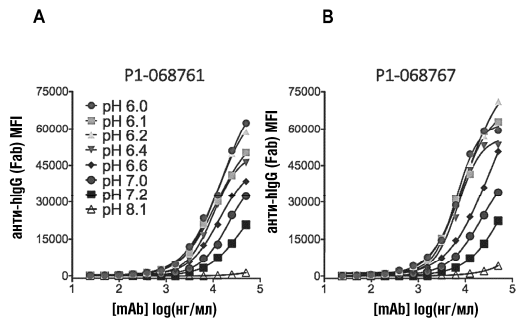
Фиг. 7D



Фиг. 7E

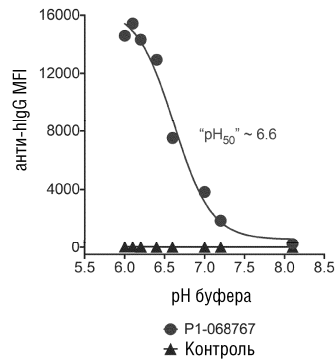


Фиг. 7F

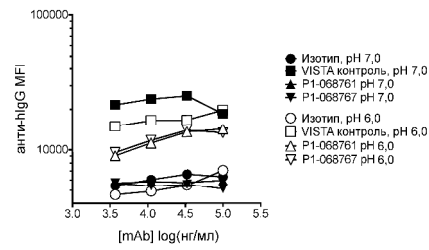


Фиг. 8A, B

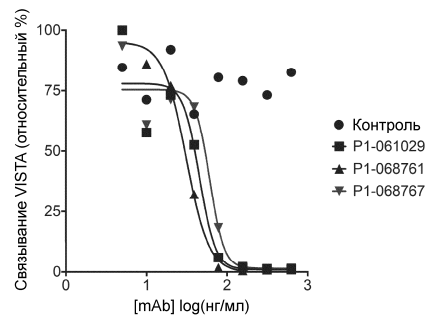
042790



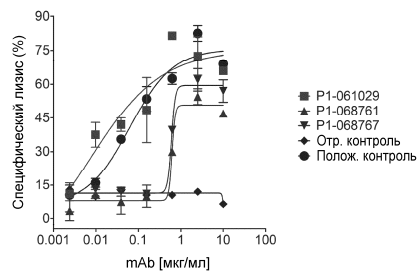
Фиг. 8С



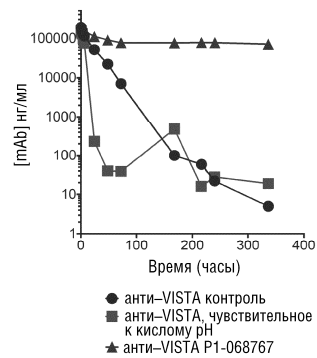
Фиг. 8D



Фиг. 8Е



Фиг. 8F



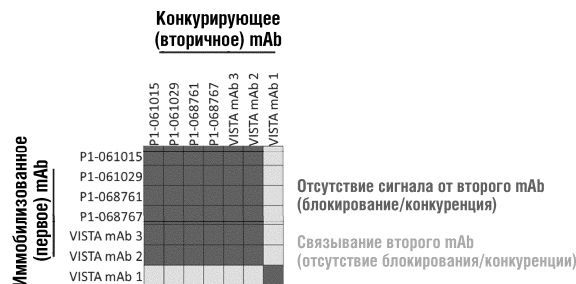
Фиг. 9

Антитело	P1 ID	pH 7.4			pH 6.7			pH 6.0			HCDR1	HCDR2	HCDR3
		kd (L/c)	KD (M)	HVISTA %Rmax	kd (L/c)	KD (M)	HVISTA %Rmax	kd (L/c)	KD (M)	HVISTA %Rmax			
P1-068761_E100F	P1-070874	1.3E-03	1.2E-08	71.3	1.3E-04	1.3E-09	117.0	1.3E-04	1.3E-10	130.1			
P1-068761_E55A_E100F	P1-070898	1.7E-03	1.4E-08	82.3	2.8E-04	1.5E-09	119.8	1.8E-04	2.6E-10	133.7			
P1-068761_H100G_E100F	P1-070880	2.3E-03	4.1E-08	61.8	4.0E-04	2.3E-09	116.7	2.1E-04	2.3E-10	126.7			
P1-068761_E10D_E100F	P1-070906	3.5E-03	4.8E-08	65.2	5.7E-04	3.7E-09	112.6	3.3E-04	4.3E-10	130.4			
P1-068761_E54N_E100F	P1-070902	1.0E-03	6.5E-08	67.4	6.1E-04	6.5E-09	119.9	1.8E-04	1.4E-09	136.5			
P1-068761_E32Y	P1-070866	2.5E-03	1.8E-08	103.5	6.4E-04	1.6E-09	120.9	4.1E-04	2.1E-10	123.1			
P1-068761_E32Y_E55A	P1-070882	2.7E-03	2.3E-08	89.3	6.0E-04	2.0E-09	116.3	5.7E-04	3.1E-10	117.6			
P1-068761_E32Y_E54N	P1-070884	2.5E-03	4.2E-08	75.7	8.6E-04	5.1E-09	104.4	7.0E-04	1.2E-09	115.8			
P1-068761_E10D_E32Y	P1-070876	3.5E-03	2.3E-08	120.8	9.9E-04	3.0E-09	124.0	7.1E-04	2.4E-10	124.9			
P1-068761_E32Y_H100G	P1-070886	3.5E-03	7.2E-08	68.0	1.3E-03	5.0E-09	113.4	9.2E-04	4.8E-10	120.4			
P1-068761_E32Y_E100F	P1-070888	1.9E-03	3.7E-09	123.1	9.5E-04	1.1E-09	125.0	1.1E-03	2.5E-10	120.8			
P1-068761	P1-068761	ND	ND	0.7	5.6E-03	2.1E-08	49.7	1.4E-03	2.6E-09	121.5			
P1-068761_E55A	P1-070868	ND	ND	2.8	6.4E-03	1.2E-07	42.2	1.7E-03	3.4E-09	113.1			
P1-068761_H100G	P1-070872	ND	ND	2.9	1.4E-02	2.3E-07	36.1	5.2E-03	4.4E-09	121.0			
P1-068761_E54N	P1-070870	ND	ND	1.7	>1E-02	>8.2E-06	17.6	5.5E-03	1.9E-08	86.3			
P1-068761_E55A_E54N	P1-070878	ND	ND	0.9	2.9E-02	2.1E-07	16.4	5.6E-03	2.1E-08	79.3			
P1-068761_E10D	P1-070864	ND	ND	0.4	1.8E-02	1.7E-07	25.6	6.2E-03	8.3E-09	109.9			
P1-068761_E10D_E55A	P1-070860	ND	ND	1.8	>1E-02	>1.1E-07	22.1	7.4E-03	1.2E-08	99.1			
P1-061015	P1-061015	7.5E-03	3.2E-08	93.4	4.4E-03	1.1E-08	96.3	8.2E-03	4.5E-09	94.5			
P1-068761_E54N_H100G	P1-070900	ND	ND	4.4	ND	ND	19.4	8.1E-03	1.0E-08	110.9			
P1-068761_E10D_H100G	P1-070894	ND	ND	0.1	>1E-02	>8.1E-08	14.6	2.1E-02	1.5E-08	91.9			
P1-068761_E10D_E54N	P1-070892	ND	ND	0.4	>1E-02	>3.2E-08	8.3	3.4E-02	5.0E-08	56.3			

Фиг. 10А

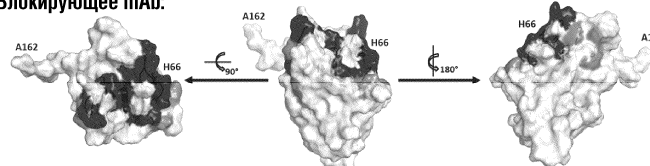
Антитело	P1 ID	pH 7.4			pH 6.7			pH 6.0			HCDR1	HCDR2	HCDR3
		kd (L/c)	KD (M)	HVISTA %Rmax	kd (L/c)	KD (M)	HVISTA %Rmax	kd (L/c)	KD (M)	HVISTA %Rmax			
P1-068767_DS2N_D102V	P1-070930	6.7E-03	6.7E-08	60.0	1.8E-03	7.5E-09	101.0	1.2E-03	8.8E-10	114.6			
P1-068767_DS2N	P1-070906	ND	ND	3.9	6.7E-03	2.1E-07	38.9	1.9E-03	3.2E-09	116.6			
P1-068767_DS2N_E55A	P1-070916	ND	ND	2.3	5.5E-03	1.2E-07	33.7	1.5E-03	4.0E-09	112.0			
P1-068767_E55A_D102V	P1-070932	1.0E-02	2.6E-07	26.4	3.1E-03	1.5E-08	86.7	2.0E-03	1.9E-09	111.3			
P1-068767_D102V	P1-070912	9.2E-03	3.7E-07	44.7	2.8E-03	1.4E-08	98.5	2.0E-03	1.3E-09	111.8			
P1-068767_E55A	P1-070908	ND	ND	2.8	8.5E-03	3.8E-07	26.8	2.3E-03	5.7E-09	108.0			
P1-068767_E30D_DS2N	P1-070914	ND	ND	6.5	1.1E-02	1.2E-07	35.8	2.3E-03	5.8E-09	105.7			
P1-068767	P1-068767	ND	ND	1.9	7.2E-03	1.8E-07	33.1	2.4E-03	5.2E-09	111.7			
P1-068767_E30D_D102V	P1-070916	1.3E-02	2.2E-07	40.8	3.5E-03	1.7E-08	95.7	3.0E-03	2.1E-09	114.8			
P1-068767_E30D	P1-070904	ND	ND	5.8	ND	ND	21.0	3.2E-03	9.6E-09	99.8			
P1-068767_E30D_E55A	P1-070922	ND	ND	3.5	ND	ND	22.6	3.5E-03	8.3E-09	108.8			
P1-061015	P1-061015	7.5E-03	3.2E-08	93.4	4.4E-03	1.1E-08	96.3	8.2E-03	4.5E-09	94.5			
P1-068767_E30D_D102V	P1-070932	1.0E-02	2.6E-07	26.4	3.1E-03	1.5E-08	86.7	2.0E-03	1.9E-09	111.3			
P1-068767_E55A_E100F	P1-070918	ND	ND	1.8	ND	ND	8.6	1.3E-02	6.2E-08	42.5			
P1-068767_DS2N_E100F	P1-070918	ND	ND	5.4	>1E-02	>3.9E-08	22.7	6.6E-02	2.0E-08	64.0			
P1-068767_E100F	P1-070910	ND	ND	1.8	2.6E-02	5.2E-06	9.6	>1E-02	>4.2E-08	49.4			
P1-068767_E30D_E100F	P1-070914	ND	ND	1.0	2.7E-02	1.0E-05	7.0	>1E-02	>8.2E-08	32.9			

Фиг. 10В



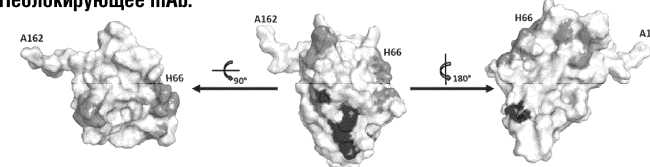
Фиг. 11А

Блокирующее mAb:



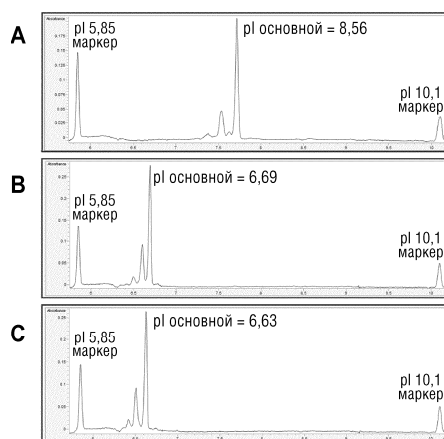
Фиг. 11В

Неблокирующее mAb:

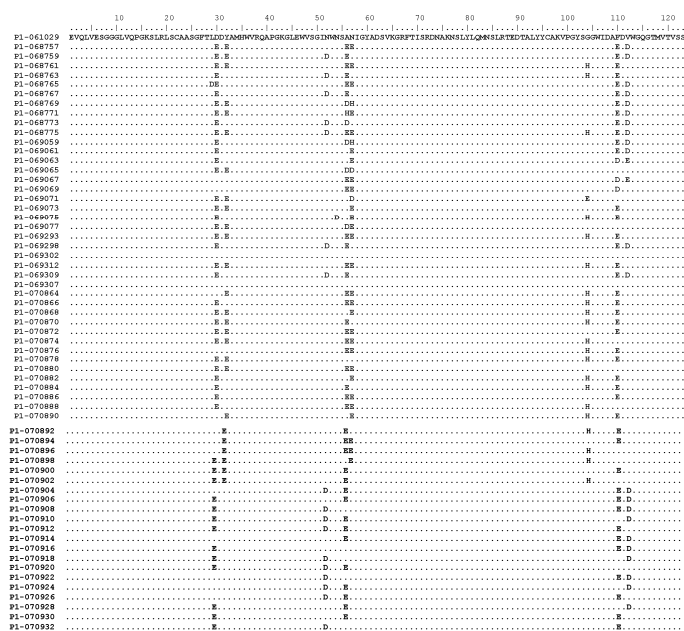


Фиг. 11С

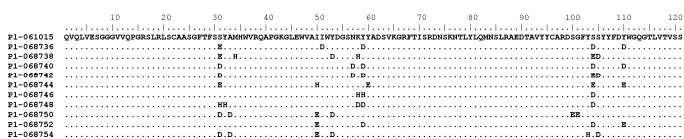
042790



Фиг. 12А-С



Фиг. 13А



Фиг. 13В