

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042924

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.05

(21) Номер заявки
202091228

(22) Дата подачи заявки
2018.11.15

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ИММУНОГЛОБУЛИН-ПОДОБНОМУ
ТРАНСКРИПТУ 3 (ILT3), И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/587,604

(32) 2017.11.17

(33) US

(43) 2020.08.12

(86) PCT/US2018/061165

(87) WO 2019/099597 2019.05.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРК ШАРП И ДОУМ ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
Мил Майкл А., Брэндиш Филип Е.,
Фаядат-Дилман Лоренс, Цзюань
Вероника, Мечковски Карл, Сингх
Латика (US)

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

(56) WO-A2-2006138739
EP-A1-1964852
WO-A1-2018089300
WO-A1-2013033734
US-A1-2013071403

(57) Описаны гуманизированные специально отобранные моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулин-подобному транскрипту 3 (ILT3), также известному как член 4 подсемейства В лейкоцитарного иммуноглобулин-подобного рецептора (LILRB4).

042924 B1

042924 B1

042924

B1

Предпосылки создания изобретения

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к специально отобраным моноклональным антителам, специфичным к иммуноглобулин-подобному транскрипту 3 (ILT3), т.е. к ингибирующему рецептору, экспрессируемому на поверхности миелоидных иммунных клеток.

Описание уровня техники

Иммуноглобулино-подобный транскрипт 3 (ILT3), обозначаемый CD85k и также известный как член 4 подсемейства В лейкоцитарного иммуноглобулин-подобного рецептора (LILRB4) и лейкоцитного иммуноглобулин-подобного рецептора 5 (LIR-5), представляет собой мембранный белок типа I, который содержит цитоплазматический иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM) и участвует в ингибировании иммунных ответов (Cella et al., J. Exp. Med. 185(10):1743-51 (1997); Samaridis et al., Eur. J. Immunol. 27(3):660-665 (1997)). Экспрессия ILT3 активируется на толерогенных дендритных клетках. Этот ген является членом семейства лейкоцитарных иммуноглобулин-подобных рецепторов (LIR), который находится в кластере генов в области хромосомы 19q13.4. Кодированный белок принадлежит к подсемейству рецепторов LIR класса В, которые содержат два или четыре внеклеточных домена иммуноглобулина, трансмембранный домен и два-четыре ITIM.

ILT3 селективно экспрессируется миелоидными антигенпрезентирующими клетками (АПК), такими как моноциты, макрофаги и дендритные клетки, например дендритные клетки, происходящие от моноцитов и дифференцированные в присутствии IL-10 или витамина D₃. ILT3 состоит из 447 аминокислот с предсказанной молекулярной массой приблизительно 47 кДа. Аминоконцевая часть ILT3 начинается с гидрофобного сигнального пептида из 23 аминокислот, за которым следует внеклеточный домен, состоящий из двух доменов суперсемейства иммуноглобулинов типа C2 и имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, за исключением С-концевой His-метки (внеклеточный домен IL-3 макака-резуса имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2). Предполагаемый трансмембранный домен ILT3 состоит из 21 аминокислоты, за которыми следует длинная цитоплазматическая область из 167 аминокислот, характеризующаяся наличием мотивов, разделенных 26 аминокислотными остатками и напоминающая мотивы ITIM, идентифицированные в KIR (в рецепторах Ig природных клеток-киллеров) как сайты связывания с протеин-тирозин-фосфатазой SHP-1. ILT3 экспрессируется на иммунных клетках, где он связывается с молекулами МНС класса I на антигенпрезентирующих клетках и передает отрицательный сигнал, который ингибирует стимуляцию иммунного ответа. Рецептор может также обладать функцией захвата и презентации антигена. Считается, что ILT3 регулирует воспалительные ответы и цитотоксичность и, тем самым, стимулирует нацеливание на иммунный ответ и ограничивает аутореактивность. Было идентифицировано множество вариантов транскриптов, кодирующих различные изоформы ILT3.

Патентные публикации, в которых раскрывается применение антитела для модуляции активности ILT3, а также для подавления отторжения трансплантата или для лечения рака или инфекционных заболеваний, включают публикации США № 2009/0202544, 2015/0110714, 2015/0139986 и 2017/0267759 и публикации международных заявок № WO 2013/043569, WO 2013/181438, WO 2014/116846, WO 2016/049641, WO 2016/127427, WO 2018/089300 и WO 2018/148494. Интерес представляет также публикация международной заявки WO 2017/015227, в которой раскрывается CD166, также известный как молекула адгезии лимфоцитов (ALCAM), служащая в качестве лиганда для ILT3, и в которой описаны способы лечения рака, включающие в некоторых вариантах осуществления изобретения использование антитела против CD166 или ALCAM. Также представляют интерес патенты США № 7777008 и 8901281, в которых раскрывается моноклональное антитело 9B11 для его применения в различных способах лечения, где желательно активировать иммунную систему для противораковой терапии и подавлять иммунную систему для ингибирования отторжения трансплантата.

Хотя в патентных публикациях раскрываются анти-ILT3 антитела, однако в некоторых случаях раскрываются неспецифические антитела или раскрываются специфические антитела, которые, как было показано в некоторых случаях, являются неспецифическими и перекрестно реагируют с одним или более ILT3-родственными рецепторами, такими как LILRA6 и ILT8. Неспецифические анти-ILT3-антитела могут иметь нежелательные эффекты, которые при их использовании в терапевтических целях могут давать негативные эффекты. Следовательно, существует необходимость в получении антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с ILT3 и не обладают детектируемой неспецифичностью к другим родственным рецепторам.

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам и антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с иммуноглобулин-подобным транскриптом 3 (ILT3) без какого-либо детектируемого связывания с близкородственными белками (например, ILT5, ILT7, ILT8 или ILT11), как было определено (i) с помощью клеточного ELISA с использованием 10 мкг/мл антитела или антигенсвязывающего фрагмента или (ii) с помощью Вiascore с использованием 10 мкг/мл антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются как с человеческим ILT3, так и с ILT3 ма-

как-резуса. Эти антитела и антигенсвязывающие фрагменты способны подавлять активность ИЛТ3 и, тем самым, усиливать активацию дендритных клеток и примирование Т-клеток. Толерантные дендритные клетки и миелоидные супрессорные клетки (MDSC) также чувствительны к этим антителам. Кроме того, исследования *in vivo* этих антител в моделированных системах гуманизированных мышей NSGTM (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) показали, что эти антитела могут снижать опухолевую нагрузку и переключать клеточные фенотипы в более активированное состояние.

В образцах клинических испытаний было обнаружено, что экспрессия ИЛТ3, подобная экспрессии PD-L1 и LAG3, и сигнатура GEP ассоциируется с чувствительностью к анти-PD-1 антителу, пембролизумабу. Уровень растворимого ИЛТ3 в кровотоке также увеличивается при определенных типах рака. В целом, анти-ИЛТ3-антитела согласно изобретению могут быть эффективными для лечения определенных видов рака либо в качестве монотерапии, либо в комбинации с антителом против PD-1 и/или против PD-L1 для повышения чувствительности к анти-PD-1 антителу или анти-PD-L1 антителу, а в частности, в противораковой терапии, где рак является невосприимчивым к монотерапии анти-PD-1 или анти-PD-L1 антителами. В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к химерным или гуманизированным анти-ИЛТ3 антителам. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела могут представлять собой полностью человеческие антитела, которые конкурируют с раскрытыми здесь антителами за связывание с раскрытым здесь эпитопом ИЛТ3.

Настоящее изобретение относится к антителу или к антигенсвязывающему фрагменту, содержащим одну, две или три гипервариабельные области (CDR) вариабельного домена V_H тяжелой цепи, имеющего гипервариабельную область тяжелой цепи (HC-CDR) 1, 2 и 3 и одну, две или три CDR вариабельного домена V_L легкой цепи, имеющего LC-CDR1, 2 и 3, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с человеческим ИЛТ3, где связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента может быть определено с помощью клеточного ELISA или Biacore.

В другом варианте осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом на человеческом ИЛТ3 или конкурируют с раскрытым здесь антителом за связывание с эпитопом на человеческом ИЛТ3, где эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту в одной или более аминокислотных последовательностях, представленных в группе, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом на человеческом ИЛТ3 или конкурируют с раскрытым здесь антителом за связывание с эпитопом на человеческом ИЛТ3, где эпитоп содержит одну или более аминокислотных последовательностей, представленных в группе, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом на человеческом ИЛТ3 или конкурируют с раскрытым здесь антителом за связывание с эпитопом на человеческом ИЛТ3, где эпитоп содержит аминокислотные последовательности, представленные в группе, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В конкретных вариантах осуществления изобретения эпитоп определяют с помощью анализа методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS).

Настоящее изобретение также относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с человеческим ИЛТ3 и содержит тяжелую цепь (HC), где вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) содержит гипервариабельную область тяжелой цепи (HC-CDR) 3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 и 105, или аминокислотную последовательность, которая имеет 3, 2 или 1 отличия от аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 и 105. В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с человеческим ИЛТ3, содержат тяжелую цепь (HC), где вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) содержит гипервариабельную область тяжелой цепи (HC-CDR) 3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 и 105, или аминокислотную последовательность, которая имеет 3, 2 или 1 отличие от аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 и 105. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В другом варианте осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом на человеческом ИЛТ3 или конкурируют с раскрытым здесь антителом за связывание с эпитопом на человеческом ИЛТ3, где эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту в одной или более аминокислотных последовательностях, представленных в группе, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом на человеческом ИЛТ3 или конкурируют с раскрытым здесь антителом за связывание с эпитопом на человеческом ИЛТ3, где эпитоп содержит одну или более аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с

эпитопом на человеческом ILT3 или конкурируют с раскрытым здесь антителом за связывание с эпитопом на человеческом ILT3, где эпитоп содержит аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В конкретных вариантах осуществления изобретения эпитоп определяют с помощью анализа методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS).

Настоящее изобретение также относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с человеческим ILT3 и включают (а) HC, имеющую вариabельный домен (V_H), содержащий гипервариabельную область вариabельного домена (HC-CDR) 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, 47, 55, 63, 71, 79, 87, 95 или 103; HC-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 или 104; и HC-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 или 105; и их варианты, где одна или более HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации; и (б) легкую цепь (LC), имеющую вариabельный домен (V_L), содержащий гипервариabельную область вариabельного домена (LC-CDR) 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 98 или 106; LC-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, 51, 59, 67, 75, 83, 91, 99 или 107; и LC-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, 60, 68, 76, 84, 92, 100 или 108; и их варианты, где одна или более LC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В дополнительном варианте антитела или его антигенсвязывающего фрагмента HC-CDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; HC-CDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, 20 или 21; HC-CDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и LC-CDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 или 42; LC-CDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; и LC-CDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 и их варианты, где одна или более HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В дополнительном варианте антитела или его антигенсвязывающего фрагмента HC-CDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; HC-CDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и HC-CDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и LC-CDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; LC-CDR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43; и LC-CDR3 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44 и их варианты, где одна или более HC-CDR и LC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В другом варианте антитела или антигенсвязывающего фрагмента, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат (а) V_H , имеющий каркасную область, выбранную из группы, состоящей из семейства человеческих V_{H1} , V_{H2} , V_{H3} , V_{H4} , V_{H5} и V_{H6} и их вариантов, имеющих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеции или их комбинаций; и (б) V_L , имеющий каркасную область, выбранную из группы, состоящей из семейства человеческих V_{L1} , V_{L2} , V_{L3} , V_{L4} , V_{L5} , V_{L6} , V_{L7} , V_{L8} , V_{L9} и V_{L10} и их вариантов, имеющих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат (а) V_H , имеющий каркасную последовательность семейства человеческих V_{H1} или ее вариант, имеющий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций; и (б) V_L , имеющий каркасную последовательность семейства человеческих V_{L5} или ее вариант, имеющий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В другом варианте антитела это антитело содержит константный домен HC человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или его вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного константного домена HC изотипа человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В конкретных аспектах изобретения константный домен может содержать С-концевой лизин или может не содержать С-концевого лизина или С-концевого дипептида глицин-лизин.

В конкретных вариантах осуществления изобретения константный домен тяжелой цепи имеет изотип человеческого IgG1, который был модифицирован, так, чтобы он обладал пониженной или мини-

мальной эффекторной функцией. В других аспектах изобретения минимальная эффекторная функция является результатом мутации Fc, не обладающего эффекторной функцией, где указанная мутация может включать, или состоять из нее, мутацию N297A или D265A/N297A, идентифицированную в соответствии с нумерацией по Кабату, где в данном случае минимальная эффекторная функция является результатом агликозилирования (см., например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, где мутация N297A соответствует аминокислотному положению 180; мутация D265A, если она присутствует, будет соответствовать аминокислотному положению 148). В конкретных аспектах изобретения IgG1 был модифицирован так, чтобы он содержал, или состоял из них, мутации L234A, L235A и D265S, идентифицированные в соответствии с нумерацией по Кабату, для отмены эффекторной функции Fc (см., например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или 13, где мутации L234A, L235A и D265S соответствуют аминокислотным положениям 117, 118 и 148 соответственно).

В другом аспекте изобретения, константный домен HC имеет изотип человеческого IgG4, и этот изотип дополнительно включает замену серинового остатка в положении 228 (в соответствии с нумерацией EU) на пролин, что соответствует положению 108 SEQ ID NO: 9 или 10 (серину в положении 108).

В другом варианте антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, антитело содержит константный домен человеческой LC каппа или лямбда или их вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного константного домена человеческой LC каппа или лямбда. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В другом варианте антитела или его антигенсвязывающего фрагмента антитело содержит (i) V_H , имеющий каркасную последовательность, выбранную из семейства человеческих V_H1 , V_H2 , V_H3 , V_H4 , V_H5 и V_H6 и константный домен HC человеческого IgG1 или IgG4 или его вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного константного домена HC изотипа человеческого IgG1 или IgG4; и (ii) V_L , имеющий каркасную последовательность, выбранную из семейства человеческих V_{K1} , V_{K2} , V_{K3} , V_{K4} , V_{K5} , V_{K6} , V_{L1} , V_{L2} , V_{L3} , V_{L4} , V_{L5} , V_{L6} , V_{L7} , V_{L8} , V_{L9} и V_{L10} , и константный домен человеческой LC каппа или лямбда или его вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного константного домена человеческой LC каппа или лямбда. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В другом варианте антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитело содержит (i) V_H , имеющий каркасную последовательность семейства человеческих V_H2 , и V_L , имеющий каркасную последовательность семейства человеческих V_{K5} ; (ii) константный домен HC человеческого IgG1 или IgG4 или его вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного константного домена HC изотипа человеческого IgG1 или IgG4; и (iii) константный домен человеческой LC каппа или его вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного константного домена человеческой LC каппа. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В другом варианте антитела или его антигенсвязывающего фрагмента антитело содержит (i) V_H , имеющий каркасную последовательность семейства человеческих V_H1 , и человеческой V_L , имеющий каркасную последовательность семейства человеческих V_{K5} ; (ii) константный домен HC человеческого IgG4 или его вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного константного домена HC изотипа человеческого IgG4; и (iii) константный домен человеческой LC каппа или его вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного константного домена человеческой LC каппа. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В дополнительном варианте антитела, или антигенсвязывающего фрагмента антитела, или антигенсвязывающий фрагмент содержат V_H и V_L , имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 соответственно; SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46 соответственно; SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54 соответственно; SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62 соответственно; SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70 соответственно; SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78 соответственно; SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86 соответственно; SEQ ID NO: 93 и SEQ ID NO: 94 соответственно или SEQ ID NO: 101 и SEQ ID NO: 102 соответственно.

В дополнительном варианте антитела, или антигенсвязывающего фрагмента антитела, или антигенсвязывающий фрагмент содержат V_H , имеющий аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 117, 118, 119, 123, 124 или 125, и V_L, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140 или 141.

В дополнительном варианте антитела, или антигенсвязывающего фрагмента антитела, или антигенсвязывающий фрагмент содержат V_H, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118, и V_L, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140.

В дополнительном варианте указанное антитело содержит константный домен HC, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 или 13. В конкретных аспектах изобретения константный домен HC, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 11, 12 или 13, может не содержать С-концевого лизина или С-концевого дипептида глицин-лизин. В конкретных вариантах осуществления изобретения константный домен HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В другом варианте антитела это антитело содержит константный домен LC, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В дополнительном варианте антитела это антитело содержит HC, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, 143, 144, 148, 149, 150, 167, 168, 169, 170, 174, 175, 176, 177, 178, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 191, 192 или 193. В конкретных аспектах изобретения HC, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, 143, 144, 148, 149, 150, 167, 168, 169, 170, 174 или 175, может не содержать С-концевого лизина или С-концевого дипептида глицин-лизин. В конкретных вариантах осуществления изобретения HC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143 или 177. В конкретных вариантах осуществления изобретения HC, представленная в SEQ ID NO: 177, также не содержит С-концевого глицина.

В другом варианте антитела это антитело содержит LC, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165 или 166. В конкретных вариантах осуществления изобретения LC включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165.

В другом варианте антитела это антитело содержит HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, и LC, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165. В конкретных аспектах изобретения HC, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, не содержит С-концевого лизина или С-концевого дипептида глицин-лизин.

Настоящее изобретение также относится к химерному, гуманизированному или рекомбинантному человеческому антителу или антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с эпитопом на человеческом ILT3, где эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту в аминокислотных последовательностях, представленных в группе, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В дополнительном варианте осуществления изобретения химерное, гуманизированное или рекомбинантное человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом на человеческом ILT3, содержащим аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В этих вариантах осуществления изобретения эпитоп определяют с помощью анализа методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS).

Настоящее изобретение также относится к химерному, гуманизированному или рекомбинантному человеческому антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с ILT3, где указанное связывание перекрестно блокирует или конкурирует со связыванием антитела, содержащего тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В дополнительном варианте осуществления изобретения химерное, гуманизированное или рекомбинантное человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент перекрестно блокируют связывание или конкурируют с антителом, содержащим тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и легкую цепью, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, за связывание с эпитопом на ILT3, который содержит аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей одно или более антител или антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых или заявленных в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака у индивидуума, включающему введение индивидууму раскрытого или заявленного здесь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в эффективном количестве, достаточном для лечения рака у индивидуума.

В другом варианте осуществления изобретения рак представляет собой рак поджелудочной железы, меланому, рак молочной железы, рак легких, рак головы и шеи, рак бронхов, рак прямой и ободочной кишки, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак головного мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак пищевода, рак шейки матки, рак матки или эндометрия, рак ротовой полости или глотки, рак печени, рак почек, рак яичек, рак желчных путей, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, рак надпочечников, остеосаркому, хондросаркому или рак кровеносных тканей.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака у индивидуума, включающему од-

новременное или последовательное введение индивидууму раскрытого здесь антитела или антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с одним или более ингибиторами или антагонистами PD-1, PD-L1 и/или PD-L2. В одном варианте осуществления изобретения антагонист PD-1 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с человеческим PD-1 и блокируют связывание PD1 с человеческим PD-L1 и PD-L2. В одном варианте осуществления изобретения антагонист PD-L1 или PD-L2 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с человеческим PD-L1 или PD-L2 и блокируют связывание человеческого PD-L1 или PD-L2 с PD1.

В другом варианте осуществления изобретения антагонистом PD1 является анти-PD-1 антитело, которое представляет собой ниволумаб, пембролизумаб, цемлиплимаб или пидилизумаб, а ингибитором PD-L1 является дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C или MDX-1105.

Настоящее изобретение также относится к раскрытому или заявленному здесь антителу или его антигенсвязывающему фрагменту для лечения рака у индивидуума.

В другом варианте осуществления изобретения рак представляет собой рак поджелудочной железы, меланому, рак молочной железы, рак легких, рак головы и шеи, рак бронхов, рак прямой и ободочной кишки, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак головного мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак пищевода, рак шейки матки, рак матки или эндометрия, рак ротовой полости или глотки, рак печени, рак почек, рак яичек, рак желчных путей, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, рак надпочечников, остеосаркому, хондросаркому или рак кроветворных тканей.

Настоящее изобретение также относится к раскрытому или заявленному здесь антителу или его антигенсвязывающему фрагменту для лечения рака у индивидуума, где лечение также включает введение одного или более ингибиторов или антагонистов PD-1, PD-L1 и/или PD-L2.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист PD-1 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с человеческим PD-1 и блокируют связывание PD1 с PD-L1 и PD-L2.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист PD-L1 или PD-L2 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с человеческим PD-L1 или PD-L2 и блокируют связывание человеческого PD-L1 или PD-L2 с PD1.

В другом варианте осуществления изобретения анти-PD1 антителом являются ниволумаб, пембролизумаб, цемлиплимаб или пидилизумаб, а ингибитором PD-L1 является дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C или MDX-1105.

Настоящее изобретение также относится к применению раскрытого или заявленного здесь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для лечения рака.

Настоящее изобретение также относится к применению раскрытого или заявленного здесь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в целях приготовления лекарственного средства для лечения рака.

В другом варианте осуществления изобретения рак представляет собой рак поджелудочной железы, меланому, рак молочной железы, рак легких, рак головы и шеи, рак бронхов, рак прямой и ободочной кишки, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак головного мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак пищевода, рак шейки матки, рак матки или эндометрия, рак ротовой полости или глотки, рак печени, рак почек, рак яичек, рак желчных путей, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, рак надпочечников, остеосаркому, хондросаркому или рак кроветворных тканей.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей любое из вышеуказанных антител или их антигенсвязывающих фрагментов и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретных вариантах осуществления изобретения композиция включает смесь антител, содержащих тяжелую цепь, имеющую С-концевой лизин, и антител, содержащих тяжелую цепь, в которой отсутствует С-концевой лизин. В конкретных вариантах осуществления изобретения композиция включает раскрытое здесь антитело, где преобладающая форма антитела содержит тяжелую цепь, имеющую С-концевой лизин. В конкретных вариантах осуществления изобретения композиция включает раскрытое здесь антитело, где преобладающая форма антитела содержит тяжелую цепь, в которой отсутствует С-концевой лизин. В конкретных вариантах осуществления композиции включает раскрытое здесь антитело, где приблизительно 100% антител в данной композиции содержат тяжелую цепь, в которой отсутствует С-концевой лизин.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1F показано сравнение селективности нескольких раскрытых здесь анти-ILT3-антител с селективностью моноклональных антител 9B11 и мышиного IgG1 (mIgG1) с помощью клеточного ELISA. Клетки CHO-K1, экспрессирующие человеческий ILT3 (фиг. 1A), ILT3 макак-резуса (фиг. 1B), человеческий ILT5 (фиг. 1C), человеческий ILT7 (фиг. 1D), человеческий ILT8 (фиг. 1E) или человеческий ILT11 (фиг. 1F) тестировали по отдельности с использованием моноклонального антитела p40B5

(LB179.40B5.1A1), p49C6 (LB181.49C6.1A1) и p52B8 (1b181.52B8. LBL); антитела 9B11 (патент США № 7777008), имеющего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 (легкая цепь) и SEQ ID NO: 34 (тяжелая цепь)) и мышинового IgG1.

На фиг. 2A показаны характеристические данные по аффинности связывания, изоэлектрической точке, чистоте мономерных молекул и по измерениям термостабильности для вариантов mAb 10. Обозначения: "huILT3" означает человеческий ILT3; "rhILT3" означает ILT3 макака-резуса; "pI" означает изоэлектрическую точку; "Tm" означает среднюю точку на температурной кривой теплового разворачивания белка, "Tagg" означает среднюю точку на кривой теплового агрегирования; "SEC" обозначает эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию).

На фиг. 2B показана взаимосвязь SEC-чистоты и температуры плавления гуманизированных вариантов легкой цепи mAb 10 (M64V V_H1 IgG4). V_L1-V_L8 означает варианты, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126-133 соответственно.

На фиг. 3A показана тепловая карта различий в мечении дейтерием для аминокислотных остатков внеклеточного домена человеческого ILT3, которые связаны с химерным родительским V_H 52B8 мышинового анти-ILT3-антитела 52B8/человеческим IgG4 (S228P); родительским V_L мышинового 52B8/человеческим антителом каппа ("c58B2"; mAb 73). Эти шесть пептидных доменов, которые содержат эпитоп, связанный с антителом (остатки 18-23 (ISWGN; SEQ ID NO: 3), остатки 64-69 (IPSMTE; SEQ ID NO: 4), остатки 96-101 (MTGAYS; SEQ ID NO: 5), остатки 124-131 (QSRSPMDT; SEQ ID NO: 6), остатки 152-159 (AQHQAEF; SEQ ID NO: 7) и остатки 184-187 (LLSH; SEQ ID NO: 8)), расположены вблизи границы доменов D1 и D2 внеклеточного домена ILT3. Аминокислотная последовательность человеческого внеклеточного домена с C-концевой His-меткой представлена в SEQ ID NO: 1.

На фиг. 3B показан первый вид и второй вид модели поверхностной структуры внеклеточного домена человеческого ILT3. Темная область модели соответствует расположению шести пептидных доменов, включающих человеческий эпитоп ILT3-His, связанный с c58B8 (mAb 73).

На фиг. 3C представлена ленточная диаграмма, иллюстрирующая расположение эпитопа на внеклеточном домене ILT3: ISWGN (SEQ ID NO: 3), IPSMTE (SEQ ID NO: 4), MTGAYS (SEQ ID NO: 5), QSRSPMDT (SEQ ID NO: 6), AQHQAEF (SEQ ID NO: 7) и LLSH (SEQ ID NO: 8).

На фиг. 3D показана тепловая карта различий в мечении дейтерием для аминокислотных остатков внеклеточного домена человеческого ILT3, которые связаны с антителом ZM4.1.

На фиг. 3E показана тепловая карта различий в мечении дейтерием для аминокислотных остатков внеклеточного домена человеческого ILT3, которые связаны с антителом DX446.

На фиг. 3F показана тепловая карта различий в мечении дейтерием для аминокислотных остатков внеклеточного домена человеческого ILT3, которые связаны с антителом DX439.

На фиг. 3G показана тепловая карта различий в мечении дейтерием для аминокислотных остатков внеклеточного домена человеческого ILT3, которые связаны с антителом 9B11.

На фиг. 4 показаны концентрации свободного c52B8 (mAb 73) в крови после введения множества доз гуманизированным моделям с опухолью (Panc08.13 и SK-MEL-5). Концентрации свободного c52B8 показаны кружками и квадратами. Пунктирными линиями показаны смоделированные встречающиеся ранее уровни антител после внутривенного введения ударной дозы 1, 3, 10 или 30 мг/кг гуманизированного IgG4 мышам C57BL/6J.

На фиг. 5A показан функциональный анализ дендритных человеческих клеток (DC), указывающий на то, что химерные анти-ILT3 антитела, в которых V_H и V_L p52B8, связанные с Fc IgG4 (c52B8; mAb 73), Fc IgG1 (mAb 78) или Fc IgG1 (N297A) (mAb 76), обладают сравнимой способностью активировать дендритные клетки (ДК). Незрелые человеческие ДК были получены и дифференцированы в дендритные CD11c⁺-клетки под действием GM-CSF (1000 Ед/мл) и IL-4 (1000 Ед/мл) в течение 5 дней. Эти клетки обрабатывали IL-10, LPS (компонентом грамотрицательной бактериальной клеточной стенки и лигандом TLR4 (Raetz et al. Ann. Rev. Biochem. 71:635-700 (2002)) и различными концентрациями указанных антител в течение 42 ч. Данные представлены как среднее ± ср. кв. ош. для двух экспериментальных повторностей. Этот эксперимент является репрезентативным для четырех независимых исследований. Контрольные IgG не оказывали какого-либо влияния (не показано).

На фиг. 5B и 5C показано, что гуманизированное 52B8 (партия 26AVY; mAb 46) не отличается от c52B8 (mAb 73) в функциональном анализе человеческих ДК, проводимом с использованием ДК от двух различных здоровых людей-доноров. Данные представлены как среднее ± ср. кв. ош. для двух экспериментальных повторностей. Представленные данные являются репрезентативными для трех независимых исследований, проводимых с использованием этих двух доноров.

На фиг. 6A и 6B показано, что анти-ILT3 антитело c52B8 (mAb 73) и гуманизированное анти-ILT3 антитело 52B8 (mAb 46; партия 26AVY) снижают супрессорную активность миелоидных супрессорных клеток (MDSC). Анализ на подавление Т-клеток проводили в отношении Т-клетки:MDSC = 4:1. Данные представлены здесь как среднее ± ср. кв. ош. для трех экспериментальных повторностей на стадии анализа Т-клеток. Описанный здесь эксперимент является репрезентативным для двух независимых исследований с использованием МКПК, взятых от одних и тех же двух доноров с качественно сходными резуль-

татами.

На фиг. 7 показано, что с52B8 ингибирует рост опухолей SK-MEL-5 у мышей NSG с человеческой SKG-MEL-5, имеющих подкожные опухоли SK-MEL-5. Животных произвольно распределяли по группам обработки исходя из объема опухоли на 21-й день после имплантации, и подкожно вводили дозу 20 мг/кг с52B8 или контрольного изотипа один раз в неделю, начиная с 21-го дня. Данные, показанные на верхней панели, представляют собой среднее $\pm$ ср. кв. ош. (девять на группу). Кривые роста опухолей у отдельных животных показаны на средней и нижней панелях. Масса тела снижалась в одинаковой степени как для контрольной группы, так и для 52B8-группы. Это исследование является репрезентативным для трех независимых экспериментов.

На фиг. 8A-8D показано влияние с52B8 на рост опухоли и иммунную активацию у модели NSG человеческой SK-MEL-5. На фиг. 8A показана кривая роста опухоли; на фиг. 8B показана CyTOF-количественная оценка TIL, взятых через 7 дней после введения второй дозы: % CD4⁺-Т-регуляторных клеток и уровни экспрессии CD69 на CD4⁺-Т-клетках; на фиг. 8C показаны уровни sHLA-G в человеческой плазме, собранной в конце исследования; на фиг. 8D показан ИГХ-анализ инфильтрации человеческих CD3⁺-Т-клеток в опухоли, т.е. для четырех опухолей для каждой группы.

На фиг. 9A-9D показано влияние комбинации с52B8 и пембролизумаба у мышей NSG с человеческой Panc08.13. На фиг. 9A показана кривая роста опухоли; на фиг. 9B показана CyTOF-количественная оценка % Treg и уровней экспрессии CD69 на CD4⁺-Т-клетках опухолей, взятых в конце исследования; на фиг. 9C показаны уровни sHLA-G в плазме в конечных пробах крови; на фиг. 9D показаны уровни IFN γ и IL-8 в плазме в конечных пробах крови, количественно оцененные с использованием 10-плексного MSD (Meso Scale Discovery).

На фиг. 10 показано, что гуманизированное анти-ILT3 антитело 52B8 (mAb 46) снижает супрессорную активность MDSC до степени, сравнимой с химерным анти-ILT3 антителом с52B8 (mAb 73) в анализе на подавление MDSC/Т-клеток в отношении Т-клетки:MDSC = 4:1.

На фиг. 11 показан эффект комбинации гуманизированного анти-ILT3-антитела 52B8 (mAb 46) и пембролизумаба в анализе на подавление MDSC/Т-клеток в отношении Т-клетки:MDSC = 4:1 или 8:1 с использованием клеток MDSC, взятых у человека-донора D001003835.

На фиг. 12 показан эффект комбинации гуманизированного анти-ILT3-антитела 52B8 (mAb 46) и пембролизумаба в анализе на подавление MDSC/Т-клеток в отношении Т-клетки : MDSC=8:1 с использованием клеток MDSC, взятых у человека-донора D001003180.

На фиг. 13 показан эффект комбинации гуманизированного анти-ILT3-антитела 52B8 (mAb 46) и пембролизумаба в анализе на подавление MDSC/Т-клеток в отношении Т-клетки:MDSC = 4:1 с использованием клеток MDSC, взятых у человека-донора D001003507.

На фиг. 14 показан эффект комбинации гуманизированного анти-ILT3-антитела 52B8 (mAb 46) и пембролизумаба в анализе на подавление MDSC/Т-клеток в отношении Т-клетки MDSC = 8:1 с использованием клеток MDSC, взятых у человека-донора D001003428.

На фиг. 15 показан эффект комбинации гуманизированного анти-ILT3-антитела 52B8 (mAb 46) и пембролизумаба в смешанной лимфоцитарной реакции IL-10-поляризованных дендритных клеток, происходящих от человеческих моноцитов и аллогенных CD8⁺-Т-клеток, инкубированных в течение четырех дней с последующим измерением уровня интерферона гамма (IFN γ) в супернатанте культуры, как результата считывания показаний активации Т-клеток.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к специально отобраным моноклональным антителам, специфичным к человеческому иммуноглобулин-подобному транскрипту 3 (ILT3), т.е. ингибирующему рецептору, экспрессируемому на поверхности миелоидных иммунных клеток.

Определения.

Используемый здесь термин "иммуноглобулин-подобный транскрипт 3" (сокращенно обозначаемый здесь как "ILT3", а также известный как LIR-5, LILRB4 или CD85k), если это не оговорено особо, означает член семейства человеческих ILT3, который селективно экспрессируется миелоидными антигенпрезентирующими клетками (АПК), такими как моноциты, макрофаги и дендритные клетки, например дендритные клетки, происходящие от моноцитов и дифференцированные в присутствии IL-10 или витамина D₃.

Используемый здесь термин "антитело" означает полноразмерный иммуноглобулин, включая его рекомбинантно продуцируемые формы, и охватывает любую форму антитела, которая обладает желаемой биологической активностью. Таким образом, он используется в самом широком смысле и конкретно охватывает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), гуманизированные антитела, полностью человеческие антитела, бипаратопные антитела, гуманизированные антитела с верблужьей тяжелой цепью и химерные не-человеческие/человеческие антитела. "Родительские антитела" представляют собой антитела, полученные путем воздействия анти-

гена на иммунную систему до модификации антител для предполагаемого применения, такой как гуманизация нечеловеческого антитела для его использования в качестве терапевтического человеческого антитела.

В одном варианте осуществления изобретения "антитело" означает гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), связанные дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области или вариабельного домена тяжелой цепи (сокращенно обозначенного здесь как V_H) и константной области или константного домена тяжелой цепи. В некоторых природных антителах IgG, IgD и IgA константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . В некоторых природных антителах каждая легкая цепь состоит из вариабельной области или вариабельного домена легкой цепи (сокращенно обозначенного здесь как V_L) и константной области или константного домена легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L . Человеческий V_H включает шесть членов семейства: V_{H1} , V_{H2} , V_{H3} , V_{H4} , V_{H5} и V_{H6} , а семейство человеческих V_L включает 16 членов: V_{L1} , V_{L2} , V_{L3} , V_{L4} , V_{L5} , V_{L6} , V_{L7} , V_{L8} , V_{L9} и V_{L10} . Каждый из этих членов семейства может быть дополнительно подразделен на конкретные подтипы.

V_H - и V_L -области могут быть дополнительно подразделены на гипервариабельности области, называемые комплементарность-определяющими областями (CDR), между которыми расположены более консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех областей CDR и четырех областей FR, расположенных в направлении от амино- до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяев, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторские клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Соответствие аминокислот каждому домену обычно определяют, как описано в Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978), Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat, et al., (1977), J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, et al., (1987), J. Mol. Biol. 196:901-917 или Chothia, et al., (1989), Nature, 342:878-883.

В целом, хотя антитело содержит шесть CDR, три на V_H и три на V_L , однако специалистам известно, что в большинстве случаев область CDR3 тяжелой цепи является основной детерминантой специфичности антитела, и примеры получения специфических антител на основе CDR3 одной тяжелой цепи известны специалистам (например, Beiboer et al., J. Mol. Biol. 296:833-849 (2000); Klimka et al., British J. Cancer, 83:252-260 (2000); Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:8910-8915 (1998); Xu et al., Immunity, 13:37-45 (2000). См. Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (определение областей CDR антитела по последовательности); см. также Chothia and Lesk (1987), J. Mol. Biol. 196:901-917 (определение областей CDR антитела по структуре).

Следующие общие правила, показанные в табл. 1, могут быть использованы для идентификации CDR в последовательности антител. Существуют редкие примеры, когда эти фактически постоянные признаки не встречаются; однако остатки Cys являются наиболее консервативным признаком.

Таблица 1

<i>CDR1 легкой цепи</i>	
Начало	Приблизительно аминокислотный остаток 24
Остаток перед:	Обычно Cys
Остаток после:	Обычно Trp. Обычно Trp-Tyr-Gln, но также и Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln или Trp-Tyr-Leu
Длина	10-17 аминокислотных остатков

<i>CDR2 легкой цепи</i>	
Начало	Обычно 16 аминокислотных остатков после конца CDR1
Остатки перед:	Обычно Ile-Tyr, но также и Val-Tyr, Ile-Lys или Ile-Phe
Длина	Обычно семь аминокислотных остатков
<i>CDR3 легкой цепи</i>	
Начало	Обычно 33 аминокислотных остатка после конца CDR2
Остаток перед:	Обычно Cys
Остатки после:	Обычно Phe-Gly-Xaa-Gly (SEQ ID NO:221)
Длина	7-11 аминокислотных остатков
<i>CDR1 тяжелой цепи</i>	
Начало	Приблизительно аминокислотный остаток 26 (обычно четыре аминокислотных остатка после Cys) [нумерация по Чотию/AbM]; нумерация по Кэбату начинается через пять аминокислотных остатков
Остатки перед:	Обычно Cys-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:222)
Остатки после:	Обычно Trp. Обычно Trp-Val, но также и Trp-Ile или Trp-Ala
Длина	10-12 аминокислотных остатков [определение AbM]; нумерация по Чотию, за исключением последних четырех аминокислотных остатков.
<i>CDR2 тяжелой цепи</i>	
Начало	Обычно 15 аминокислотных остатка после конца CDR1 тяжелой цепи (нумерация по Кэбату/AbM)
Остатки перед:	Обычно Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (SEQ ID NO:223), но с различными модификациями
Остатки после:	Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala
Длина	Нумерация по Кэбату для 16-19 аминокислотных остатков; нумерация AbM (и последние по Чотию) заканчивается за семь аминокислотных остатков
<i>CDR3 тяжелой цепи</i>	
Начало	Обычно 33 аминокислотных остатка после конца CDR2 тяжелой цепи (обычно два аминокислотных остатка после Cys)
Остатки перед:	Обычно Cys-Xaa-Xaa (как правило Cys-Ala-Arg)
Остатки после:	Обычно Trp-Gly-Xaa-Gly (SEQ ID NO:224)
Длина	3-25 аминокислотных остатков

В общих чертах, основное структурное звено антитела включает тетрамер. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну легкую цепь (приблизительно 25 кДа) и одну тяжелую цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область приблизительно из 100-110 или более аминокислот, ответственную, главным образом, за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть тяжелой цепи может определять константную область, ответственную, главным образом, за эффекторную функцию антитела. Обычно человеческие легкие цепи классифицируются как легкие цепи каппа и лямбда. Кроме того, человеческие тяжелые цепи обычно классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon и определяют изотип антитела, например, IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. В легких и тяжелых цепях вариабельные и константные области соединены областью "J", состоящей приблизительно из 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает область "D", состоящую приблизительно из 10 или более аминокислот. В общих чертах, см. Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989).

Тяжелая цепь антитела может содержать, а может и не содержать концевой лизиновый остаток (K) или концевые глициновый и лизиновый остатки (GK). Таким образом, в конкретных вариантах описанные здесь анти-ILT3-антитела, содержащие показанную здесь аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи, в которой отсутствует концевой лизин, но которая заканчивается глици-

новым остатком, дополнительно включают варианты, в которых также отсутствует концевой глициновый остаток. Это обусловлено тем, что концевой лизин, а иногда и глицин и лизин вместе могут расщепляться во время экспрессии антитела или отщепляться при введении в организм человека без какого-либо видимого неблагоприятного влияния на эффективность, стабильность или иммуногенность антитела. В некоторых случаях молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь, может, вероятно, не содержать кодоны, кодирующие концевой лизин, или кодоны, кодирующие концевой лизин и глицин.

Используемый здесь термин "антигенсвязывающий фрагмент" означает фрагменты антител, т.е. фрагменты антител, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связанным с полноразмерным антителом, например фрагменты, которые сохраняют одну или более областей CDR. Примерами антигенсвязывающих фрагментов являются, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диантитела; молекулы одноцепочечных антител, например scFv; нанокантата и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемый здесь "Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи и C_H1 и переменных областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи. "Fab-фрагмент" может быть продуктом расщепления антител папаином.

Используемый здесь Fab'-фрагмент содержит одну легкую цепь и часть или фрагмент одной тяжелой цепи, которая содержит домен V_H и домен C_H1, а также область между доменами C_H1 и C_H2, в результате чего межцепевая дисульфидная связь может образовываться между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов с образованием молекулы F(ab')₂.

Используемый здесь фрагмент F(ab')₂ содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие домен V_H и часть константной области между доменами C_H1 и C_H2, в результате чего межцепевая дисульфидная связь может образовываться между двумя тяжелыми цепями. Таким образом, фрагмент F(ab')₂ состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе посредством дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями. Фрагмент F(ab')₂ может быть продуктом расщепления антитела пепсином.

Используемая здесь область Fv включает переменные области как тяжелой, так и легкой цепей, но не содержит константных областей.

Эти и другие потенциальные конструкции описаны в Chan & Carter (2010), Nat. Rev. Immunol. 10:301. Эти фрагменты антител получают стандартными методами, известными специалистам в данной области, и скринируют на возможность их использования по такому же механизму, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части могут быть получены методами рекомбинантных ДНК или ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

Используемая здесь область "Fc" содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащих домены C_H1 и C_H3 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями доменов C_H3.

Используемый здесь термин "диантело" означает небольшой фрагмент антитела с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), связанный с переменным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H-V_L или V_L-V_H). Благодаря линкеру, который является слишком коротким для спаривания двух доменов в одной цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Диантитела более подробно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161; и Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448. Общий обзор вариантов сконструированных антител см. Holliger and Hudson (2005), Nat. Biotechnol. 23:1126-1136.

Используемый здесь термин "биспецифическое антитело" означает искусственное гибридное антитело, имеющее две различные пары тяжелой/легкой цепи и, таким образом, два различных сайта связывания. Так, например, биспецифическое антитело может содержать первую пару тяжелой/легкой цепи, содержащую одну тяжелую и одну легкую цепь первого антитела, содержащего по меньшей мере шесть CDR раскрытого здесь анти-ILT3-антитела, или варианты, где одна или более из шести CDR имеют одну, две или три аминокислотных замены, добавления, делеции или их комбинации вместе со второй парой тяжелой/легкой цепи, содержащей одну тяжелую и одну легкую цепь второго антитела, обладающего специфичностью к представляющему интерес антигену, не являющемуся ILT3. Биспецифические антитела могут быть получены различными способами, включая слияние гибридом или связывание фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai, et al. (1990), Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, Kostelny et al., (1992), J. Immunol. 148:1547-1553. Кроме того, биспецифические антитела могут быть получены в форме "диантител" (Holliger, et al. (1993), PNAS USA, 90:6444-6448) или в виде "Янусинов" (Trautnecker, et al. (1991), EMBO J. 10:3655-3659 и Trautnecker, et al. (1992), Int. J. Cancer Suppl. 7:51-52).

Используемые здесь "выделенные" антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по меньшей мере частично не содержат других биологических молекул клеток или клеточных культур, в которых они продуцируются. Такие биологические молекулы включают нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы или другие материалы, такие как клеточный дебрис и среда для роста. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут, кроме того, по меньшей мере частично не содержать компонентов экспрессионной системы, таких как биологические молекулы клеток-хозяев или среды для их роста.

Обычно, термин "выделенный" не означает полное отсутствие таких биологических молекул или отсутствие воды, буферов или солей или компонентов фармацевтической композиции, которая включает антитела или их фрагменты.

Используемый здесь термин "моноклональное антитело" означает популяцию по существу гомогенных антител, т.е. молекулы антитела, составляющие эту популяцию, имеют идентичные аминокислотные последовательности, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. В противоположность этому, обычные (поликлональные) препараты антител, как правило, включают множество различных антител, имеющих различные аминокислотные последовательности в своих вариабельных доменах, которые часто являются специфичными к различным эпитопам.

Термин "моноклональный" указывает на характер антитела, полученного, по существу, из гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как обязательное условие для получения антитела каким-либо конкретным способом. Так, например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены гибридомным методом, впервые описанным Kohler et al. (1975), *Nature*, 256:495, либо они могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567).

"Моноклональные антитела" также могут быть также выделены из фаговых библиотек антител любыми методами, описанными, например, Clackson et al. (1991), *Nature*, 352:624-628 и Marks et al. (1991), *J. Mol. Biol.* 222:581-597. См. также Presta (2005), *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731.

Используемое здесь "химерное антитело" представляет собой антитело, имеющее вариабельный домен от первого антитела и константный домен от второго антитела, где (i) первое и второе антитела происходят от различных видов (патент США № 4816567 и Morrison, et al., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855) или (ii) первое и второе антитела происходят от различных изотипов, например вариабельный домен происходит от антитела IgG1, а константные домены происходят от антитела IgG4. В одном аспекте изобретения вариабельные домены получают из нечеловеческого антитела, такого как мышинное антитело ("родительское антитело"), а последовательности константного домена получают из человеческого антитела. В дополнительном аспекте изобретения вариабельные домены представляют собой гуманизированные вариабельные домены мышинного антитела и константные домены человеческого антитела.

Используемый здесь термин "гуманизированное антитело" означает формы антител, которые содержат последовательности человеческих антител и нечеловеческих (например, мышинных, крысиных) антител. Вообще говоря, гуманизированное антитело будет содержать все или по меньшей мере один, а обычно два вариабельных домена, в которых гипервариабельные петли соответствуют петлям у нечеловеческого иммуноглобулина, и все, или по существу все, каркасные (FR) области происходят от последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может содержать, но необязательно, по меньшей мере часть константной области человеческого иммуноглобулина (Fc).

"Гуманизация" (также называемая изменением формы или CDR-прививкой) в настоящее время представляет собой хорошо разработанную технологию снижения иммуногенности моноклональных антител (mAb) из ксеногенных источников (обычно грызунов) и улучшения эффекторных функций (ADCC, активации комплемента, связывания с Clq). Сконструированное mAb получают методами молекулярной биологии, однако простая CDR-прививка гипервариабельных областей грызунов (CDR) к человеческим каркасным областям часто приводит к потере аффинности связывания и/или специфичности исходного mAb. Для гуманизации антитела в конструкцию гуманизированного антитела вводят модификации, такие как консервативные аминокислотные замены остатков CDR и обратные замены остатков mAb грызунов в каркасных человеческих областях (обратные мутации). Положения могут быть детектированы или идентифицированы путем сравнения последовательностей для проведения структурного анализа или анализа гомологичной модели трехмерной структуры вариабельных областей. В последнее время в процессе созревания аффинности используются фаговые библиотеки для замены аминокислот в выбранных положениях. Аналогичным образом, многие подходы были использованы для выбора наиболее подходящих человеческих каркасных областей для присоединения к CDR грызунов. По мере увеличения серий баз данных известных параметров для структур антител эти методы все больше совершенствуются и уточняются. Могут быть использованы консенсусные последовательности или последовательности зародышевой линии из одного антитела или фрагментов каркасных последовательностей в каждой вариабельной области легкой или тяжелой цепи из нескольких различных человеческих mAb. Другой метод гуманизации предназначен для модификации только поверхностных остатков последовательности грызунов с наиболее часто встречающимися остатками, обнаруженными в человеческих mAb, и эти методы называются "облицовкой" или "отделкой". В большинстве случаев человеческое или гуманизированное антитело является, по существу, неиммуногенным для человека.

Используемый здесь термин "нечеловеческие аминокислотные последовательности", если он относится к антителам или иммуноглобулинам, означает аминокислотную последовательность, которая обладает свойствами аминокислотной последовательности млекопитающего, не являющегося человеком. Этот термин не включает аминокислотные последовательности антител или иммуноглобулинов, полу-

ченные из библиотеки полностью человеческих антител, где разнообразие в такой библиотеке создается *in silico* (см., например, патент США № 8877688 или 8691730).

Используемый здесь термин "эффекторные функции" означает биологические активности, характерные для Fc-области антитела, где указанные активности варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примерами эффекторных функций антител являются связывание с C1q и комплементзависимая цитотоксичность (CDC); связывание с Fc-рецептором; антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; подавление рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора) и активация В-клеток.

Используемый здесь термин "консервативно модифицированные варианты" или "консервативная замена" означает замены аминокислот другими аминокислотами, имеющими сходные свойства (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформацию и жесткость остова и т.п.), где такие модификации часто могут быть созданы без изменения биологической активности белка. Специалистам в данной области известно, что обычно одиночные аминокислотные замены в неосновных областях полипептида существенно не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987), *Molecular Biology of the Gene*, Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Кроме того, замены структурно или функционально сходных аминокислот с меньшей вероятностью будут нарушать биологическую активность. Репрезентативные консервативные замены представлены в табл. 2.

Таблица 2

Исходный остаток	Консервативная замена	Исходный остаток	Консервативная замена
Ala (A)	Gly; Ser	Leu (L)	Ile; Val
Arg (R)	Lys; His	Lys (K)	Arg; His
Asn (N)	Gln; His	Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Asp (D)	Glu; Asn	Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Cys (C)	Ser; Ala	Pro (P)	Ala
Gln (Q)	Asn	Ser (S)	Thr
Glu (E)	Asp; Gln	Thr (T)	Ser
Gly (G)	Ala	Trp (W)	Tyr; Phe
His (H)	Asn; Gln	Tyr (Y)	Trp; Phe
Ile (I)	Leu; Val	Val (V)	Ile; Leu

Используемый здесь термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" означает сайт на антигене (например, ILT3), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы внутри белковых антигенов могут быть образованы из смежных аминокислот (обычно линейный эпитоп) или из несмежных аминокислот, расположенных в юкта-положении благодаря третичной укладке белка (обычно конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно, но не всегда, сохраняются под воздействием денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные посредством третичной укладки, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Непрерывный линейный эпитоп содержит пептидный домен на антигене, включающий по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот. Несмежный конформационный эпитоп содержит один или более пептидных доменов или областей на антигене, связанном с антителом, где между этими доменами и областями расположены одна или более аминокислотных или пептидных доменов, не связанных с антителом, где каждый домен независимо содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот. Способы определения эпитопов, связанных с данным антителом (т.е. картирование эпитопа), хорошо известны специалистам в данной области и включают, например, иммуноблот-анализы и иммунопреципитацию, где перекрывающиеся или смежные пептиды (например, от ILT3) тестируют на способность реагировать с данным антителом (например, с антителом против ILT3). Методы определения пространственной конформации эпитопов включают известные методы и описанные здесь методы, например рентгеновскую кристаллографию, двумерный ядерный магнитный резонанс и HDX-MS (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)).

Термин "картирование эпитопа" относится к способу идентификации молекулярных детерминант на антигене, участвующих в распознавании антитела-антигена, с применением известных и описанных здесь методов, например рентгеновской кристаллографии, двумерного ядерного магнитного резонанса и масс-спектропии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS).

Термин "связывается с одним и тем же эпитопом", если он относится к двум или более антителам, означает, что антитела связываются с одним и тем же сегментом аминокислотных остатков или комбинациями сегментов аминокислот, как было определено данным способом. Методы определения связыва-

ния антител с "тем же эпитопом на ILT3" с использованием описанных здесь антител включают, например, методы картирования эпитопов, такие как рентгеноструктурный анализ комплексов "антиген:антитело", которые обеспечивают атомное разрешение эпитопа, и HDX-MS. Другие методы включают мониторинг связывания антитела с фрагментами антигена (например, с протеолитическими фрагментами) или с мутированными вариациями антигена, где потеря связывания из-за модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто указывает на наличие эпитопного компонента (см., например, аланин-сканирующий мутагенез - Cunningham & Wells (1985), *Science*, 244:1081). Кроме того, для картирования эпитопов могут быть также применены вычислительные комбинаторные методы. Эти методы основаны на способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов из комбинаторных пептидных библиотек фагового представления.

Антитела, которые "конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью, такой как ILT3", означают антитела, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью, т.е. с ILT3. Способность двух антител конкурировать друг с другом за связывание с мишенью, т.е. как и в какой степени одно антитело ингибирует связывание другого антитела с мишенью, можно определить с применением известных экспериментов по конкурентному связыванию. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело конкурирует за связывание и ингибирует связывание другого антитела с мишенью по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Уровни ингибирования или конкурентного связывания могут отличаться в зависимости от того, какое антитело является "блокирующим антителом" (т.е. охлажденное антитело, которое сначала инкубируют с мишенью). Анализы на конкурентное связывание могут быть проведены, как описано, например, Ed. Harlow and David Lane, *Cold Spring Harb Protoc*; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 или в главе 11 публикации "Using Antibodies" by Ed. Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA, 1999. Конкурирующие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или с соседними эпитопами (о чем, например, свидетельствует стерическое затруднение).

Другие анализы на конкурентное связывание включают твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ЕІА), сэндвич-анализ на конкурентное связывание (см. Stahli et al., *Methods in Enzymology*, 9:242 (1983)); твердофазный прямой ЕІА на основе биотина-авидина (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный прямой анализ с использованием метки; твердофазный прямой сэндвич-анализ с использованием метки; (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный прямой РІА с использованием метки 1-125 (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой ЕІА на основе биотина-авидина (Cheung et al., *Virology*, 176:546 (1990)) и прямой РІА с использованием метки (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

Используемый здесь термин "специфически связывается", если он относится к антигену или к молекуле, такой как человеческий ILT3, означает преимущественную ассоциацию антитела или другого лиганда, полностью или частично, с человеческим ILT3, а не с другими молекулами, в частности с молекулами, присутствующими в человеческой крови или в сыворотке. Антитела обычно специфически связываются с их когнатным антигеном с высокой аффинностью, выражаемой как константа диссоциации (K_D) 10^{-7} - 10^{-11} М или менее. На неспецифическое связывание обычно указывает любая K_D , превышающая приблизительно 10^{-6} М. Используемый здесь термин "антитело, которое специфически связывается" или "связывается специфически" с человеческим ILT3, означает антитело, которое связывается с человеческим ILT3 с высокой аффинностью, на что указывает K_D 10^{-7} М или менее, а в конкретных вариантах K_D 10^{-8} М или менее или 5×10^{-9} М или менее или K_D от 10^{-8} до 10^{-11} М или менее, но не связывается на детектируемом уровне с близкородственными белками, такими как человеческий ILT5, человеческий ILT7, человеческий ILT8 и человеческий ILT11, как определено в клеточном ELISA или в анализе Вiasore с использованием 10 мкг/мл антитела.

Используемый здесь антиген является "по существу идентичным" данному антигену, если его аминокислотная последовательность в высокой степени идентична аминокислотной последовательности данного антигена, например если его аминокислотная последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% или более идентична аминокислотной последовательности данного антигена. Так, например, антитело, которое специфически связывается с человеческим ILT3, может также перекрестно реагировать с ILT3, происходящим от некоторых видов приматов, не являющихся человеком (например, макака-резуса или собакоподобной обезьяны).

Используемый здесь термин "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" означает геномную ДНК или РНК, мРНК, кДНК или синтетическую ДНК или любые их комбинации, которые не связаны с полноразмерным полинуклеотидом или его частью, где указанный выделенный полинуклеотид встречается в природе или связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе. В целях раскрытия настоящего изобретения следует отметить, что "молекула нуклеиновой кислоты, содержащая" конкретную нуклеотидную последовательность, не охватывает интактные хромосомы. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, "содержащие" указанные последовательности нуклеиновой кислоты, могут включать, помимо указанных последовательностей, последовательности, кодирующие до 10 или даже до 20 или более

других белков или их частей или фрагментов, или они могут включать функционально присоединенные регуляторные последовательности, которые регулируют экспрессию кодирующей области указанных последовательностей нуклеиновой кислоты и/или они могут включать векторные последовательности.

Используемый здесь термин "лечить" или "лечение" означает введение терапевтического агента, такого как композиция, содержащая любые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, внутрь или местно индивидууму или пациенту, страдающему одним или более симптомами заболевания, или индивидууму или пациенту с подозрением на такое заболевание, против которого данный агент обладает терапевтической или профилактической активностью. Обычно агент вводят в количестве, эффективном для ослабления одного или более симптомов заболевания у индивидуума или группы индивидуумов, подвергаемых лечению, независимо от клинически детектируемой степени индуцирования регрессии или ингибирования прогрессирования такого(их) симптома(ов). Количество терапевтического средства, которое является эффективным для ослабления любого конкретного симптома заболевания, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как тяжесть заболевания, возраст и вес пациента, а также способность лекарственного средства вырабатывать нужный ответ у индивидуума. Ослабление симптома заболевания может быть определено любым клиническим методом оценки, обычно применяемым врачом или другим квалифицированным медицинским персоналом для оценки степени тяжести или прогрессирования этого симптома. Этот термин также включает отсрочку развития симптомов, связанных с данным расстройством, и/или снижение тяжести симптомов такого расстройства. Эти термины также включают ослабление уже существующих неконтролируемых или нежелательных симптомов, предотвращение появления дополнительных симптомов и снижение или предотвращение основных причин появления таких симптомов. Таким образом, эти термины означают, что полезный эффект был достигнут у человека или животного с расстройством, заболеванием или симптомом или с вероятностью развития такого расстройства, заболевания или симптома.

Используемый здесь термин "лечение", если он применяется в медицине или ветеринарии, относится к терапевтическому лечению, а также к диагностике. Термин "лечение", если он применяется в медицине или ветеринарии, охватывает контактирование антител или антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению с человеком или животным.

Используемый здесь термин "терапевтически эффективное количество" означает количество конкретного вещества, достаточное для достижения желаемого эффекта у индивидуума, подвергаемого лечению. Так, например, таким количеством может быть количество, необходимое для ингибирования активации ILT3, или количество, необходимое для повышения чувствительности к пембролизумабу при совместном введении с пембролизумабом.

Используемый здесь термин "PD-1" означает белок запрограммированной гибели 1 (PD-1), ингибирующий член расширенного семейства регуляторов Т-клеток CD28/CTLA-4 (Okazaki et al. (2002), *Curr. Opin. Immunol.* 14:391779-82; Bennett et al. (2003), *J. Immunol.* 170:711-8). Другие члены семейства CD28 включают CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. Ген PD-1 кодирует трансмембранный белок 55 кДа типа I (Agata et al. (1996), *Int. Immunol.* 8:765-72). Были идентифицированы два лиганда для PD-1, PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC), которые, как было показано, ингибируют активацию Т-клеток при связывании с PD-1 (Freeman et al. (2000), *J. Exp. Med.* 192:1027-34; Carter et al. (2002), *Eur. J. Immunol.* 32:634-43). PD-1 известен как иммуоингибирующий белок, который негативно регулирует сигналы TCR (Ishida, Y. et al. (1992), *EMBO J.* 11:3887-3895; Blank, C. et al. (Epub 2006 Dec. 29), *Immunol. Immunother.* 56(5):739-745). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 может действовать как иммунная контрольная точка, которая может приводить, например, к уменьшению числа опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, к уменьшению степени пролиферации, опосредованной Т-клеточными рецепторами, и/или к "ускользанию" раковых клеток от иммунного ответа (Dong et al. (2003), *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al., (2005), *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al. (2004), *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). Подавление иммунного ответа можно устранить путем ингибирования локального взаимодействия PD-1 с PD-L1 или PD-L2; где указанный эффект также является аддитивным при блокировании взаимодействия PD-1 с PD-L2 (Iwai et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:12293-7; Brown et al. (2003), *J. Immunol.* 170:1257-66).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

Настоящее изобретение относится к выделенным химерным, гуманизированным и человеческим антителам и к их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с ILT3 и не обнаруживают детектируемого связывания с близкородственными белками (например, с ILT5, ILT7, ILT8 и ILT11), как было определено в клеточном ELISA или в анализе Biacore с использованием 10 мкг/мл антитела. Анти-ILT3 антитела повышают активность антигенпрезентирующих клеток и дендритных клеток, снижают активность репрессоров моноцитов и повышают степень примирования Т-клеток. Таким образом, настоящее изобретение также включает применение анти-ILT3 антител в монотерапии для лечения рака и их применение в комбинации с антителами против PD-1 или против PD-L1 для терапии рака первой линии, второй линии или третьей линии.

Анти-ILT3 антитело включает любое антитело с раскрытой здесь аминокислотной последовательностью и включает любое антитело, которое содержит (i) по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять

или шесть CDR антитела с раскрытой здесь аминокислотной последовательностью или которое (ii) не имеет раскрытой здесь аминокислотной последовательности CDR, но которое связывается с таким же эпитопом на ILT3, с которым связывается антитело с раскрытой здесь аминокислотной последовательностью, и которое может модулировать передачу сигнала рецептора ILT3 таким образом, что антитело повышает активность антигенпрезентирующих клеток и дендритных клеток, снижает активность репрессоров моноцитов и повышает степень примирования Т-клеток. В конкретных аспектах изобретения антитело не обнаруживает детектируемого связывания с человеческим ILT5, человеческим ILT7, человеческим ILT8 и с человеческим ILT11, как было определено в клеточном ELISA или в анализе Biacore с использованием 10 мкг/мл антитела. Этот термин, в частности, исключает антитела, содержащие по меньшей мере одну CDR антитела ZM4.1 или антитела 9B11 или любых других антител, раскрытых в патентах США № 7777008 и 8901281 или в публикациях США № 2009/0202544, 2015/0110714, 2015/0139986 и 2017/0267759 и в публикациях международных заявок WO 2013/043569, WO 2013/181438, WO 2014/116846, WO 2016/049641, WO 2016/127427, WO 2018/089300 и WO 2018/148494.

Антигенсвязывающий фрагмент анти-ILT3-антитела и т.п. включают любой белок или пептид, содержащий молекулу, которая содержит (i) по меньшей мере часть анти-ILT3-антитела с раскрытой здесь аминокислотной последовательностью; (ii) по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR антитела с раскрытой здесь последовательностью или (iii) не имеет раскрытой здесь аминокислотной последовательности CDR, но которая связывается с таким же эпитопом на ILT3, с которым связывается анти-ILT3 антитело с раскрытой здесь аминокислотной последовательностью, и которая может модулировать передачу сигнала рецептора ILT3 таким образом, что антигенсвязывающий фрагмент повышает активность антигенпрезентирующих клеток и дендритных клеток, снижает активность репрессоров моноцитов и повышает степень примирования Т-клеток. В конкретных аспектах изобретения антигенсвязывающий фрагмент не обнаруживает детектируемого связывания с человеческим ILT5, человеческим ILT7, человеческим ILT8 и с человеческим ILT11, как было определено в клеточном ELISA или в анализе Biacore с использованием 10 мкг/мл антигенсвязывающего фрагмента анти-ILT3 антитела. Этот термин, в частности, исключает антигенсвязывающие фрагменты, содержащие по меньшей мере одну CDR антитела ZM4.1 или антитела 9B11 или любых других антител, раскрытых в патентах США № 7777008 и 8901281 или в публикациях США № 2009/0202544, 2015/0110714, 2015/0139986 и 2017/0267759 и в публикациях международных заявок WO 2013/043569, WO 2013/181438, WO 2014/116846, WO 2016/049641, WO 2016/127427, WO 2018/089300 и WO 2018/148494.

В дополнительном варианте осуществления изобретения анти-ILT3 антитело включает любое антитело, которое содержит (i) по меньшей мере H3-CDR3 антитела с раскрытой здесь аминокислотной последовательностью или которое (ii) не имеет раскрытой здесь аминокислотной последовательности H3-CDR3, но которое связывается с таким же эпитопом на ILT3, с которым связывается антитело с раскрытой здесь аминокислотной последовательностью, и которое может модулировать передачу сигнала рецептора ILT3 таким образом, что антитело повышает активность антигенпрезентирующих клеток и дендритных клеток, снижает активность репрессоров моноцитов и повышает степень примирования Т-клеток. В конкретных аспектах изобретения антитело не обнаруживает детектируемого связывания с человеческим ILT5, человеческим ILT7, человеческим ILT8 и с человеческим ILT11, как было определено в клеточном ELISA или в анализе Biacore с использованием 10 мкг/мл антитела. Этот термин, в частности, исключает антитела, содержащие по меньшей мере одну CDR антитела ZM4.1 или антитела 9B11 или любых других антител, раскрытых в патентах США № 7777008 и 8901281 или в публикациях США № 2009/0202544, 2015/0110714, 2015/0139986 и 2017/0267759 и в публикациях международных заявок WO 2013/043569, WO 2013/181438, WO 2014/116846, WO 2016/049641, WO 2016/127427, WO 2018/089300 и WO 2018/148494.

Антигенсвязывающий фрагмент анти-ILT3-антитела и т.п. включают любой белок или пептид, содержащий молекулу, которая включает (i) по меньшей мере часть анти-ILT3-антитела с раскрытой здесь аминокислотной последовательностью, (ii) по меньшей мере HC-CDR3 антитела с раскрытой здесь последовательностью или (iii) не имеет раскрытой здесь аминокислотной последовательности HC-CDR3, но которая связывается с таким же эпитопом на ILT3, с которым связывается анти-ILT3 антитело с раскрытой здесь аминокислотной последовательностью, и которая может модулировать передачу сигнала рецептора ILT3 таким образом, что антигенсвязывающий фрагмент повышает активность антигенпрезентирующих клеток и дендритных клеток, снижает активность репрессоров моноцитов и повышает степень примирования Т-клеток. В конкретных аспектах изобретения антигенсвязывающий фрагмент не обнаруживает детектируемого связывания с человеческим ILT5, человеческим ILT7, человеческим ILT8 и с человеческим ILT11, как было определено в клеточном ELISA или в анализе Biacore с использованием 10 мкг/мл антигенсвязывающего фрагмента анти-ILT3 антитела. Этот термин, в частности, исключает антигенсвязывающие фрагменты, содержащие по меньшей мере одну CDR антитела ZM4.1 или антитела 9B11 или любых других антител, раскрытых в патентах США № 7777008 и 8901281 или в публикациях США № 2009/0202544, 2015/0110714, 2015/0139986 и 2017/0267759 и в публикациях международных заявок WO 2013/043569, WO 2013/181438, WO 2014/116846, WO 2016/049641, WO 2016/127427,

WO 2018/089300 и WO 2018/148494.

В конкретных вариантах осуществления изобретения анти-ILT3 антитело представляет собой человеческое или гуманизированное анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или химерное анти-ILT3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат HC-CDR3 раскрытой здесь молекулы анти-ILT3-антитела, или H3-CDR3, представленную в табл. 3.

В конкретных вариантах осуществления изобретения анти-ILT3 антитело представляет собой человеческое или гуманизированное анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или химерное анти-ILT3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые содержат HC-CDR1, HC-CDR2, HC-CDR3, LC-CDR1 LC-CDR2 и LC-CDR3 молекулы анти-ILT3 антитела, раскрытой в описании или в табл. 3.

Таблица 3

mAb	HC-CDR1	SeqNo.	HC-CDR2	SeqNo.	HC-CDR3	SeqNo.
52B	NYGMS	17	TISGGGDYTN	20	RLWFRSLYYAM	23
8			YPDSVRG		DY	
40A	SYSIN	47	RFWYDEGIAY	48	DRDTVGITGWF	49
6			NLTLES		AY	
16B	NYCVN	55	RFWFDEGKAY	56	DRDTVGITGWF	57
1			NLTLES		AY	
11D	TYWIE	63	EILPGNGNTHF	64	RRLGRGPFDY	65
1			NENFKD			
17H	NFDMA	71	SITYDGGSTSY	72	VESIATISTYFDY	73
12			RDSVKG			
37C	SYCVN	79	RFWYDEGKV	80	DRDTMGITGWF	81
8			YNLTLES		AY	
1G1	TYWIQ	87	EILPGSGTTNY	88	RLGRGPFDY	89
2			NENFKG			
20E4	SYSVN	95	RFWYDGGTA	96	DRDTMGITGWF	97
			YNSTLES		AY	

24A 4	SYCVN	103	RFWYDEGKV YNLTLES	104	DRDTLGITGWFA Y	105
mAb	LC-CDR1		LC-CDR2		LC-CDR3	
52B 8	RASEKVD SFGQSFH	41	LTSNLDS	43	QQNNEDPYT	44
40A 6	KASQSVG VNVD	50	GSANRHT	51	LQYGSVPYT	52
16B 1	KASQSVG INVD	58	GSANRHT	59	LQYGSVPYT	60
11D 1	KASQDIN EYIG	66	YTSTLQS	67	LQYANPLPT	68
17H 12	RASQSVS MSRYDLH	74	RASDLAS	75	QQTRKSPPT	76
37C 8	KASQSVG INVD	82	GSANRHT	83	LQYGSVPYT	84
1G1 2	EASQDIN KHID	90	YASILQP	91	LQYDNLLPT	92
20E4	KASQSVG VNVD	98	GSANRHT	99	LQYGSVPYT	100
24A 4	KASQSVG INVD	106	GSANRHT	107	LQYGSVPYT	108

В конкретных вариантах осуществления изобретения анти-ILT3 антитело представляет собой человеческое или гуманизированное анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или химерное анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые в каждом случае содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), имеющий гипервариабельную область тяжелой цепи (HC-CDR) 3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 и 105, или аминокислотную последовательность, которая имеет 3, 2 или 1 различие с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 и 105. В другом варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом на человеческом ILT3, где эпитоп содержит по меньшей мере одну аминокислоту из одной или более аминокислотных последовательностей, представленных в группе, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В другом варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с эпитопом на человеческом ILT3, где эпитоп содержит аминокислотные последовательности, входящие в группу, состоящую из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В конкретных вариантах осуществления изобретения анти-ILT3 антитело представляет собой раскрытое здесь гуманизированное или химерное антитело против ILT3. В конкретных вариантах осуществления изобретения анти-ILT3 антитело представляет собой человеческое или гуманизированное анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или химерное анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с тем же эпитопом, с которым связывается раскрытое здесь анти-ILT3 антитело, или которое конкурирует за связывание с раскрытым здесь анти-ILT3 антителом, и это антитело содержит менее, чем три CDR или не содержит ни одной CDR раскрытого здесь анти-ILT3 антитела.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, включающему (i) по меньшей мере шесть гипервариабельных областей (CDR) антитела против иммуноглобулин-подобного транскрипта 3 (ILT3) или (ii) по меньшей мере шесть CDR анти-ILT3 антитела, где одна или более из шести CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или комбинации, где шесть CDR анти-ILT3-антитела включают CDR1 тяжелой цепи (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, 47, 55, 63, 71, 79, 87, 95 или 103; HC-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 или 104; HC-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 или

105; CDR1 легкой цепи (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 98 или 106; LC-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, 51, 59, 67, 75, 83, 91, 99 или 107; HLC-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, 60, 68, 76, 84, 92, 100 или 108; и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с человеческим ILT3 или ILT3 макак-резуса или с человеческим ILT3 и ILT3 макак-резуса. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему шесть CDR анти-ILT3 антитела, включая CDR1 тяжелой цепи (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; HC-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, 20 или 21; HC-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, 24, 25 или 26; CDR1 легкой цепи (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 или 42; LC-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; и LC-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему шесть CDR анти-ILT3 антитела, имеющего CDR1 тяжелой цепи (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; HC-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; HC-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; CDR1 легкой цепи (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; LC-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; и LC-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), имеющий каркасную область, выбранную из группы, состоящей из семейства человеческих V_H1 , V_H2 , V_H3 , V_H4 , V_H5 и V_H6 и их вариантов, имеющих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций; и (b) вариабельный домен легкой цепи (V_L), имеющий каркасную область, выбранную из семейства человеческих V_L1 , V_L2 , V_L3 , V_L4 , V_L5 , V_L6 , V_L7 , V_L8 , V_L9 и V_L10 и их вариантов, имеющих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело содержит константный домен тяжелой цепи (HC) человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или его вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело содержит константный домен человеческой легкой цепи каппа или лямбда или их вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного домена человеческой легкой цепи каппа или лямбда.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, где антитело содержит (i) вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), имеющий каркасную последовательность, выбранную из семейства человеческих V_H3 , и вариабельный домен человеческой легкой цепи (V_L), имеющий каркасную последовательность, выбранную из семейства человеческих V_L1 , V_L3 и V_L4 ; (ii) константный домен человеческой тяжелой цепи (HC) IgG1 или IgG4 или его вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного изотипа IgG1 или IgG4; и (iii) константный домен человеческой легкой цепи каппа или лямбда или его вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного домена человеческой легкой цепи каппа или лямбда. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными модификациями/заменами.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) и вариабельный домен легкой цепи (V_L), имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 соответственно; SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46 соответственно; SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54 соответственно; SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62 соответственно; SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70 соответственно; SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78 соответственно; SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86 соответственно; SEQ ID NO: 93 и SEQ ID NO: 94 соответственно или SEQ ID NO: 101 и SEQ ID NO: 102 соответственно.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 или 125, и вариабельный домен легкой цепи (V_L), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140 или 141.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118, и вариабельный домен легкой цепи (V_L), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, где антитело содержит константный домен тяжелой цепи (HC), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 или 13 и варианты SEQ ID NO: 9, 11, 12 или 13, в которых HC не содержит С-концевого лизина или глицина-лизина.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело содержит константный домен легкой цепи (LC), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело содержит тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, 143, 144, 148, 149, 150, 167, 168, 169, 170, 174, 175, 176, 177, 178, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 191, 192 или 193 и варианты HC, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, 144, 148, 149, 150, 167, 168, 169, 170, 174 или 175, в которых HC не содержит С-концевого лизина или глицина-лизина.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело содержит легкую цепь (LC), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165 или 166.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело содержит тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, 143, 144, 148, 149, 150, 167, 168, 169, 170, 174, 175, 176, 177, 178, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 191, 192 или 193, и легкую цепь (LC), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165 или 166 и варианты HC, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, 144, 148, 149, 150, 167, 168, 169, 170, 174 или 175, в которых HC не содержит С-концевого лизина или глицина-лизина.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к антителу, выбранному из антигенов, представленных в табл. 4.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело содержит тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, и варианты, в которых HC не содержит С-концевого лизина или глицина-лизина.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к вышеуказанному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело содержит константный домен человеческой тяжелой цепи (HC) IgG1, IgG2 или IgG4 или его вариант, включающий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного изоформа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и варианты, в которых HC не содержит С-концевого лизина или глицина-лизина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения различные константные домены могут быть присоединены к областям V_L и V_H содержащим описанные здесь CDR. В конкретных вариантах осуществления изобретения области V_H , содержащие описанные здесь CDR, могут быть присоединены к константному домену человеческой тяжелой цепи (HC) IgG1, IgG2 или IgG4 или его варианту, содержащему 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного изоформа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или дикого типа, и вариантам, в которых HC не содержит С-концевого лизина или глицина-лизина.

В конкретных вариантах осуществления изобретения анти-ILT3 антитело (или антигенсвязывающий фрагмент) имеет измененную эффекторную функцию и может содержать константный домен тяжелой цепи, отличающийся от константного домена нативного человеческого IgG1 (дикого типа), например, человеческий IgG1, который имеет мутации, отменяющие или минимизирующие одну или более эффекторных функций, включая способность связываться с комплементом, человеческим IgG4 или с гибридом человеческий IgG1/человеческий IgG4, и его варианты, в которых HC не имеет С-концевого лизина или глицина-лизина.

Хотя нативные человеческие антитела IgG1 имеют длительное время полужизни и обладают эф-

факторными функциями, такими как активация комплемента и антителозависимая клеточная цитотоксичность, однако такие активности могут оказаться нежелательными для всех применений антитела. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения желательно, чтобы константный домен тяжелой цепи или Fc имел минимальную или пониженную эффекторную функцию ("без эффектора"). В этих случаях вариабельный домен HC анти-ILT3-антитела может быть присоединен к константному домену человеческого IgG4, который, как известно, по существу, не обладает эффекторной функцией, или к константному домену IgG1, который был мутирован так, чтобы он сообщал отсутствие эффекторной функции. Эти молекулы, не обладающие эффекторной функцией, связываются с человеческими FcγRIIIA, FcγRIIA и FcγRI на минимальном или пониженном уровне по сравнению с полипептидом, содержащим Fc-область IgG дикого типа, где аффинность к каждому человеческому FcγRIIIA, FcγRIIA и FcγRI была в 1,15-100 раз ниже по сравнению с аффинностью полипептида, содержащего константный домен IgG дикого типа, и где антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), индуцированная указанной молекулой, составляет 0-20% от ADCC, индуцируемой полипептидом, содержащим константный домен человеческого IgG1 дикого типа.

Поэтому, в своих конкретных вариантах, настоящее изобретение включает химерные или гуманизированные анти-ILT3-антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат константный домен человеческого IgG4. В другом варианте осуществления изобретения константный домен человеческого IgG4 может быть модифицирован так, чтобы он отличался от нативного константного домена (дикого типа) человеческого IgG4 (per. No. Swiss-Pat № P01861.1) в положении, соответствующем положению 228 в системе EU, и в положении 241 в системе Кабата, где нативный серин в положении 108 (Ser108) константного домена HC заменен пролином (Pro), см., например, SEQ ID NO: 9. Эта модификация предотвращает возможное образование межцепевой дисульфидной связи между цистеином в положении 106 (Cys106) и цистеином в положении 109 (Cys109), которые соответствуют положениям Cys226 и Cys229 в системе EU и положениям Cys239 и Cys242 в системе Кабата, что может препятствовать правильному образованию внутрицепевой дисульфидной связи. См. (Angal et al. *Mol. Immunol.* 30:105 (1993); см. также Schuurman et al., *Mol. Immunol.* 38:1-8, (2001); SEQ ID NO: 14 и 41). В конкретных вариантах осуществления изобретения константный домен человеческого IgG4 может дополнительно включать, помимо замены S228P, замену L235E.

В другом варианте осуществления изобретения химерное или гуманизированное анти-ILT3 антитело может быть присоединено к модифицированному константному домену человеческого IgG1, который был модифицирован так, чтобы он не обладал эффекторной функцией. В одном варианте осуществления изобретения HC человеческого IgG1 может включать замены остатков HC человеческого IgG2 в положениях 233-236 и остатков HC IgG4 в положениях 327, 330 и 331 для значительного снижения ADCC и CDC (Armour et al., *Eur. J. Immunol.* 29(8):26, 13-24 (1999); Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276(9):659-1604 (2001)). В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело содержит константный домен тяжелой цепи (HC) человеческого IgG1 или его вариант, включающий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинации по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного IgG, а поэтому такое антитело обладает пониженной или минимальной эффекторной функцией. В конкретных аспектах изобретения, IgG1 был модифицирован так, чтобы он включал, или состоял из них, мутации L234A, L235A и D265S, и чтобы Fc не обладал эффекторной функцией. Другие мутации, которые могут быть использованы для получения Fc IgG1 с отсутствием эффекторной функции, можно найти в патенте США № 8969526.

В другом варианте осуществления изобретения HC человеческого IgG1 модифицируют так, чтобы в ней отсутствовало N-гликозилирование аспарагинового остатка (Asn) приблизительно в положении 297 HC. Консенсусная последовательность для N-гликозилирования представляет собой Asn-Xaa-Ser/Thr (где Xaa представляет собой любую аминокислоту, кроме Pro); а в IgG1 консенсусной последовательностью N-гликозилирования является Asn-Ser-Thr. Такая модификация может быть достигнута путем замены кодона Asn в положении 297 в молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей HC, на кодон другой аминокислоты, например, кодон для Gln. Альтернативно, кодон для Ser может быть заменен кодоном для Pro либо кодон для Thr может быть заменен любым кодоном, кроме кодона для Ser, например N297A или N297D. Такие модифицированные молекулы IgG1 имеют почти недетектируемую, или вообще недетектируемую эффекторную функцию. Альтернативно, все три кодона являются модифицированными.

В другом варианте осуществления изобретения константный домен человеческого IgG1 модифицируют так, чтобы он включал одну или более аминокислотных замен, выбранных из E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, D265S и P331S, где остатки пронумерованы в соответствии с нумерацией EU по Кабату и где указанный полипептид обладает пониженной аффинностью к человеческому FcγRIIIA, и/или FcγRIIA, и/или FcγRI по сравнению с полипептидом, содержащим область константного домена IgG дикого типа. В конкретных вариантах осуществления изобретения константный домен человеческого IgG содержит замены L234A, L235A и D265S, как показано, например, в SEQ ID NO: 4. В конкретных вариантах осуществления изобретения константный домен человеческого IgG1 содержит ами-

нокислотную замену в положении Pro329 и по меньшей мере одну дополнительную аминокислотную замену E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, D265S и P331S. Эти и другие замены раскрываются в WO 94/28027, WO 2004/099249; WO 2012/130831, в патентах США № 9708406; 8969526; 9296815; Son-dermann et al. Nature, 406, 267-273 (20 Jul. 2000)).

В одном варианте осуществления изобретения анти-ILT3-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают варианты, в которых одна или более из шести CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и полную тетрамерную структуру, имеющую две легкие цепи и две тяжелые цепи, включая константные области. Вариабельные области каждой пары легкая цепь/тяжелая цепь образуют сайт связывания антитела. Таким образом, обычно интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением биспецифических антител, два сайта связывания обычно являются одинаковыми.

В своих конкретных вариантах настоящее изобретение относится к анти-ILT3 антителам, представленным в табл. 4. За исключением антител, которые содержат замену триптофанового остатка в положении 101 V_H, раскрытые здесь антитела связываются с человеческим ILT3.

Таблица 4

mAb No.	Описание	SEQ ID NO:	
		Тяжелая цепь	Легкая цепь
1	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1/VL1) IgG4 S228P/Каппа	142	151
2	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1/VL2) IgG4 S228P/Каппа	142	152
3	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1/VL3) IgG4 S228P/Каппа	142	153
4	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1/VL4) IgG4 S228P/Каппа	142	154
5	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH2/VL1) IgG4 S228P/Каппа	148	151
6	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH2/VL2) IgG4 S228P/Каппа	148	152
7	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH2/VL3) IgG4 S228P/Каппа	148	153
8	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH2/VL4) IgG4 S228P/Каппа	148	154
9	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1	143	151

	M64V/VL1) IgG4 S228P/Каппа		
10	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL2) IgG4 S228P/Каппа	143	152
11	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL3) IgG4 S228P/Каппа	143	153
12	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL4) IgG4 S228P/Каппа	143	154
13	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH2 M64V/VL1) IgG4 S228P/Каппа	149	151
14	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH2 M64V/VL2) IgG4 S228P/Каппа	149	152
15	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH2 M64V/VL3) IgG4 S228P/Каппа	149	153
16	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH2 M64V/VL4) IgG4 S228P/Каппа	149	154
17	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH1 M64L/VL1) IgG4 S228P/Каппа	144	151
18	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH1 M64L/VL2) IgG4 S228P/Каппа	144	152
19	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH1 M64L/VL3) IgG4 S228P/Каппа	144	153
20	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH1 M64L/VL4) IgG4 S228P/Каппа	144	155
21	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH2 M64L/VL1) IgG4 S228P/Каппа	150	151
22	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH2 M64L/VL2) IgG4 S228P/Каппа	150	152
23	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH2 M64L/VL3) IgG4 S228P/Каппа	150	153
24	Гуманизованное анти-IL T3 mAb (52B8 VH2 M64L/VL4) IgG4 S228P/Каппа	150	154
25	Гуманизованное анти-IL T3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL2) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	169	152
26	Гуманизованное анти-IL T3 mAb ((52B8 VH1	169	155

	M64V/VL5) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа		
27	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL6) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	169	156
28	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL7) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	169	157
29	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL8) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	169	158
30	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5) IgG4 S228P/Каппа	143	155
31	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL6) IgG4 S228P/Каппа	143	156
32	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL7) IgG4 S228P/Каппа	143	157
33	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL8) IgG4 S228P/Каппа	143	158
34	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL2) IgG4 S228P/Каппа	145	152
35	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL2) IgG4 S228P/Каппа	146	152
36	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Q/VL2) IgG4 S228P/Каппа	147	152
37	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V W101F/VL2) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	145	152
38	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V W101Y/VL2) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	146	152
39	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V W101Q/VL2) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	147	152
40	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL2 S35A) IgG4 S228P/Каппа	143	159
41	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL2 S35N) IgG4 S228P/Каппа	143	160
42	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL2 N34Q) IgG4 S228P/Каппа	143	161
43	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1	143	162

	M64V/VL2 N34D) IgG4 S228P/Каппа		
44	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5 S35A) IgG4 S228P/Каппа	143	163
45	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5 S35N) IgG4 S228P/Каппа	143	164
46	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5 N34Q) IgG4 S228P/Каппа	143	165
47	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5 N34D) IgG4 S228P/Каппа	143	166
48	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL5) IgG4 S228P/Каппа	145	155
49	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL5) IgG4 S228P/Каппа	146	155
50	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Q/VL5) IgG4 S228P/Каппа	147	155
51	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL5 S35A) IgG4 S228P/Каппа	145	163
52	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL5 S35N) IgG4 S228P/Каппа	145	164
53	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL5 N34Q) IgG4 S228P/Каппа	145	165
54	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL5 N34D) IgG4 S228P/Каппа	145	166
55	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL5 S35A) IgG4 S228P/Каппа	146	163
56	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL5 S35N) IgG4 S228P/Каппа	146	164
57	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL5 N34Q) IgG4 S228P/Каппа	146	165
58	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL5 N34D) IgG4 S228P/Каппа	146	166
59	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Q/VL5 S35A) IgG4 S228P/Каппа	147	163
60	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V	147	164

	W101Q/VL5 S35N) IgG4 S228P/Каппа		
61	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Q/VL5 N34Q) IgG4 S228P/Каппа	147	165
62	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Q/VL5 N34D) IgG4 S228P/Каппа	147	166
63	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL1 N34Q) IgG1 N297A/Каппа	210	126
64	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL2 IgG1 N297A/Каппа	210	127
65	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL2 N34Q) IgG1 N297A/Каппа	210	161
66	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL3 N34Q) IgG1 N297A/Каппа	210	128
67	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL4 N34Q) IgG1 N297A/Каппа	210	129
68	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5 IgG1 N297A/Каппа	210	130
69	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5 N34Q) IgG1 N297A/Каппа	210	165
70	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL6 N34Q) IgG1 N297A/Каппа	210	131
71	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL7 N34Q) IgG1 N297A/Каппа	210	132
72	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL8 N34Q) IgG1 N297A/Каппа	210	133
73	Мышиный VH химерного анти-ILT3 52B8/человеческий IgG4 (S228P):мышинный VL/человеческая каппа	113	116
74	Мышиный VH M64V химерного анти-ILT3 52B8/человеческий IgG4 (S228P):мышинный VL/человеческая каппа	114	116
75	Мышиный VH M64L химерного анти-ILT3 52B8/человеческий IgG4 (S228P):мышинный VL/человеческая каппа	115	116

76	Мышиный VH химерного анти-ILT3 52B8/человеческий IgG1 (N297A):мышинный VL/человеческая каппа	Остатки 1-122 SEQ ID NO:113 и SEQ ID NO: 211	116
77	Мышиный VH M64L химерного анти-ILT3 52B8/человеческий IgG1 (N297A):мышинный VL/человеческая каппа	Остатки 1-122 SEQ ID NO:113 и SEQ ID NO: 211	116
78	Мышиный VH химерного анти-ILT3 52B8/человеческий IgG1:мышинный VL/человеческая каппа	Остатки 1-122 SEQ ID NO:113 и SEQ ID NO: 11	116
79	Мышиный VH M64V химерного анти-ILT3 52B8/человеческий IgG1 (S228P):мышинный VL/человеческая каппа	Остатки 1-122 SEQ ID NO:113 и SEQ ID NO: 11	116
80	Крысиный VH химерного анти-ILT3 40A6 /человеческий IgG4 (S228P):крысиный VL/человеческая каппа	194	195
81	Крысиный VH химерного анти-ILT3 16B1 /человеческий IgG4 (S228P):крысиный VL/человеческая каппа	196	197
82	Мышиный VH химерного анти-ILT3 11D1/человеческий IgG4 (S228P):мышинный VL/человеческая каппа	198	199
83	Крысиный VH химерного анти-ILT3 17H12 /человеческий IgG4 (S228P):крысиный VL/человеческая каппа	200	201
84	Крысиный VH химерного анти-ILT3 37C8/человеческий IgG4 (S228P):крысиный VL/человеческая каппа	202	203
85	Мышиный VH химерного анти-ILT3 1G12 /человеческий IgG4 (S228P):мышинный VL/человеческая каппа	203	205

86	Крысиный VH химерного анти-ILТ3 20Е4/человеческий IgG4 (S228P):крысиный VL/человеческая каппа	206	207
87	Крысиный VH химерного анти-ILТ3 24А4 /человеческий IgG4 (S228P):крысиный VL/человеческая каппа	208	209
88	Крысиный VH химерного анти-ILТ3 40А6 /человеческий IgG1 (N297А):крысиный VL/человеческая каппа	212	195
89	Крысиный VH химерного анти-ILТ3 16В1 /человеческий IgG1 (N297А):крысиный VL/человеческая каппа	213	197
90	Мышиный VH химерного анти-ILТ3 11D1 /человеческий IgG1 (N297А):мышинный VL/человеческая каппа	214	199
91	Крысиный VH химерного анти-ILТ3 17Н12/человеческий IgG1 (N297А):крысиный VL/человеческая каппа	215	201
92	Крысиный VH химерного анти-ILТ3 37С8 /человеческий IgG1 (N297А):крысиный VL/человеческая каппа	216	203
93	Мышиный VH химерного анти-ILТ3 1G12 /человеческий IgG1 (N297А):мышинный VL/человеческая каппа	217	205
94	Крысиный VH химерного анти-ILТ3 20Е4 /человеческий IgG1 (N297А):крысиный VL/человеческая каппа	218	207
95	Крысиный VH химерного анти-ILТ3 24А4 /человеческий IgG1 (N297А):крысиный VL/человеческая каппа	219	209
96	Крысиный VH химерного анти-ILТ3 40А6 /человеческий IgG1 (N297А):крысиный VL/человеческая каппа	220	195

Картирование эпитопа с помощью масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS), как описано в Примере 4, показало, что раскрытые здесь анти-ILТ3-антитела связываются с эпитопом на внеклеточном домене поблизости от границы между доменами D1 и D2 внеклеточного домена ILТ3. Эпитоп, идентифицированный с помощью HDX-MS, показал, что эпитоп, связанный с раскрытыми здесь анти-ILТ3-антителами, содержит, или состоит из нее, по меньшей мере одну аминокислоту в одной или более аминокислотных последовательностях пептидного домена, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В другом варианте осуществления изобретения эпитоп содержит, или состоит из них, одну или более аминокислотных последовательностей пептидного домена, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп содержит, или состоит из нее, по меньшей мере одну аминокислоту в каждой из аминокислотных последовательностей пептидного домена, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8 и идентифицированных с помощью HDX-MS. В конкретных вариантах осуществления изобретения эпитоп содержит, или состоит из них, одну или более аминокислотных последовательностей пептидного домена, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В конкретных вариантах осуществления изобретения эпитоп содержит, или состоит из них, пептидные домены, представленные в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к химерному, гуманизированному или че-

ловеческому антителу или антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с эпитопом на ILT3, где эпитоп содержит, или состоит из нее, по меньшей мере одну аминокислоту в одном или более пептидных доменах, содержащих аминокислотные последовательности, представленные аминокислотными последовательностями в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, как было определено с помощью масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS).

В другом своем варианте настоящее изобретение также относится к химерному, гуманизированному или человеческому антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с эпитопом на ILT3, где эпитоп содержит, или состоит из них, аминокислоты в пептидных доменах, представленных в одной или более SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп содержит, или состоит из нее, по меньшей мере одну аминокислоту в каждом из пептидных доменов, идентифицированных на тепловой карте, определенной с помощью HDX-MS и показанной на фиг. 3A.

Настоящее изобретение также относится к химерному, гуманизированному или человеческому антителу или антигенсвязывающему фрагменту, которые перекрестно блокируют связывание антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 16, с эпитопом на ILT3. В другом варианте осуществления изобретения эпитоп содержит, или состоит из нее, по меньшей мере одну аминокислоту в одном или более пептидных доменах, включающих, или состоящих из них, аминокислотные последовательности, представленные аминокислотными последовательностями в SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, как определено с помощью масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS). В другом варианте осуществления изобретения эпитоп содержит, или состоит из них, аминокислоты в пептидных доменах, представленных в одной или более из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп содержит, или состоит из нее, по меньшей мере одну аминокислоту в каждом из пептидных доменов, идентифицированных с помощью HDX-MS.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с ILT3, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с молекулой, отличающейся от ILT3, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере аминокислотную последовательность HC-CDR3, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 и 105, или имеющей аминокислотную последовательность, которая имеет 3, 2 или 1 отличие от аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 и 105, и где первое антитело связывается с эпитопом ILT3, содержащим аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, а второе антитело связывается молекулой, отличающейся от ILT3, и к способам их применения.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с ILT3, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с молекулой, отличающейся от ILT3, где первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере шесть CDR анти-ILT3-антитела или его вариантов, где одна или более из CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и где первое антитело связывается с эпитопом ILT3, содержащим аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, а второе антитело связывается с молекулой, отличающейся от ILT3, и к способам их применения.

Настоящее изобретение также относится к бипаратопным антителам (антителам, обладающим специфичностью связывания с различными эпитопами на одном и том же антигене), имеющим первую пару тяжелой/легкой цепи первого антитела, которое содержит по меньшей мере HC-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 и 105, или аминокислотную последовательность, имеющую 3, 2 или 1 отличие от аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97 и 105, где первая пара тяжелой/легкой цепи связывается с эпитопом ILT3, содержащим аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, и где второе антитело связывается с молекулой, отличающейся от ILT3, а вторая пара тяжелой/легкой цепи второго антитела обладает специфичностью к эпитопу для анти-ILT3 антитела, который отличается от эпитопа, распознаваемого первой парой тяжелой/легкой цепи.

Настоящее изобретение также относится к бипаратопным антителам (антителам, обладающим специфичностью связывания с различными эпитопами на одном и том же антигене), имеющим первую пару тяжелой/легкой цепи первого антитела, которое содержит по меньшей мере шесть CDR анти-ILT3 антител или их вариантов, где одна или более CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации, где первое антитело связывается с эпитопом ILT3, содержащим аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, где первая пара тяжелой/легкой цепи связывается с эпитопом ILT3, содержащим аминокислоты в последовательностях SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и

8, и где второе антитело связывается с молекулой, отличающейся от ILT3, а вторая пара тяжелой/легкой цепи второго антитела обладает специфичностью к эпитопу для анти-ILT3 антитела, который отличается от эпитопа, распознаваемого первой парой тяжелой/легкой цепи.

Фармацевтические композиции и их введение.

Для приготовления фармацевтических или стерильных композиций антител против ILT3 или их антигенсвязывающих фрагментов антитело или его антигенсвязывающие фрагменты смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984) и постоянно обновляющиеся публикации в Интернете в соответствии с Конвенцией Фармакопеи США (USP) 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852-1790, USA.

Композиции терапевтических и диагностических агентов могут быть получены путем смешивания с подходящими носителями, наполнителями или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов или суспензий (см., например, Hardman, et al. (2001), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000), Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

В другом варианте осуществления изобретения композицию, содержащую раскрытое здесь антитело или его фрагмент, вводят индивидууму в соответствии с руководством, приведенном в "Справочнике врача" 2017 (Thomson Healthcare; 75-е изд. (1 ноября 2002 г.)). Способы введения молекул антител известны специалистам в данной области и описаны ниже. Подходящие дозы используемых молекул будут зависеть от возраста и массы тела индивидуума и конкретно используемого лекарственного средства. Дозы и терапевтические схемы введения анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть определены специалистом в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят путем инъекции (например, подкожно или внутривенно) в дозе приблизительно от 1 до 30 мг/кг, например, приблизительно от 5 до 25 мг/кг, приблизительно от 10 до 20 мг/кг, приблизительно от 1 до 5 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 3 или 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг или приблизительно 40 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно 1-3 мг/кг или приблизительно 3-10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно 0,5-2, 2-4, 2-5, 5-15 или 5-20 мг/кг. Схема введения доз может варьироваться, например, от одного раза в неделю до одного раза через каждые 2, 3 или 4 недели. В одном варианте осуществления изобретения анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно от 10 до 20 мг/кг каждую неделю.

Схема введения может варьироваться. Подходящими способами введения предпочтительно являются парентеральное или подкожное введение. Другие способы введения могут включать пероральное введение, введение через слизистую, интрадермальное введение, прямое внутривенное введение, внутривенное введение, интраназальное введение, введение путем ингаляции, введение путем инфузии или внутриартериальное введение.

В конкретных вариантах осуществления изобретения анти-ILT3-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть введены инвазивным путем, таким как инъекция. В других вариантах осуществления изобретения анти-ILT3-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или их фармацевтические композиции могут быть введены внутривенно, подкожно, внутриартериально или путем ингаляции, т.е. доставки с помощью аэрозоля. Введение неинвазивными способами (например, перорально; т.е. в виде драже, капсул или таблеток) также входит в объем настоящего изобретения.

Композиции могут быть введены с помощью медицинских устройств, известных специалистам. Так, например, фармацевтическая композиция согласно изобретению может быть введена путем инъекции с помощью иглы для подкожных инъекций, включая, например, предварительно заполненный шприц или автоинжектор.

Раскрытые здесь фармацевтические композиции могут быть также введены с помощью безыгольных устройств для подкожных инъекций, таких как устройства, раскрытые в патентах США №. 6620135; 6096002; 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556.

Раскрытые здесь фармацевтические композиции могут быть также введены путем инфузии. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей в форме для введения фармацевтических композиций описаны в патенте США № 4487603, в котором раскрывается имплантируемый микроинфузионный насос для введения доз лекарственного средства с регулируемой скоростью; в патенте США № 4447233, в котором раскрывается медицинский инфузионный насос для доставки лекарственного средства с точной скоростью инфузии; в патенте США № 4447224, в котором раскрывается имплантируемое инфузионное

устройство с переменным потоком для непрерывной доставки лекарственного средства; в патенте США № 4439196, в котором раскрывается осмотическая система доставки лекарственного средства, имеющая многокамерные отделения. Многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули хорошо известны специалистам в данной области.

Схемы введения доз зависят от нескольких факторов, включая скорость метаболизма терапевтического антитела в сыворотке или ткани, тяжесть симптомов, иммуногенность терапевтического антитела и доступность клеток-мишеней в биологическом матриксе. Предпочтительно схема введения обеспечивает доставку терапевтического антитела в количестве, достаточном для достижения положительной динамики подлежащего лечению патологического состояния с одновременной минимизацией нежелательных побочных эффектов. В соответствии с этим количество доставляемого биологического препарата отчасти зависит от конкретного терапевтического антитела и тяжести состояния, подлежащего лечению. Руководство по выбору подходящих доз терапевтических антител можно найти в литературе (см., например, Wawrzynczak (1996), *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, et al. (2003), *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom et al. (1999), *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon et al. (2001), *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000), *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh et al. (2003), *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky et al. (2000,) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

Схемы введения доз корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Так, например, может быть введена одна ударная доза, может быть введено несколько дробных доз в течение определенного периода времени либо доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно приготавливать парентеральные композиции в унифицированной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозировки. Используемый здесь термин "унифицированная лекарственная форма" означает физически дискретные единицы, подходящие в качестве унитарных доз для индивидуумов, подлежащих лечению, где каждая такая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в комбинации с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация унифицированных лекарственных форм, описанных в настоящем документе, определяется и непосредственно зависит от (а) уникальных свойств антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и конкретно достигаемого терапевтического эффекта и (b) ограничений по компаундированию таких активных молекул для предотвращения гиперчувствительности у индивидуумов (см., например, Yang, et al. (2003), *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold, et al. (2002), *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu, et al. (1999), *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji, et al. (20003), *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144).

Применение раскрытых здесь анти-ILT3-антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

Раскрытые здесь анти-ILT3-антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые являются специфичными к родственному ILT, могут быть использованы для специфического обнаружения человеческого ILT3 (например, в биологическом образце, таком как сыворотка или плазма) с помощью обычного иммуноанализа, такого как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (РИА) или иммуногистохимический анализ ткани. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу детектирования человеческого ILT3 в биологическом образце, включающему контактирование биологического образца с раскрытым здесь анти-ILT3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и детектирование раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного с человеческим ILT3 или несвязанного анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в целях обнаружения человеческого ILT3 в биологическом образце. Анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент прямо или опосредовано метят детектируемым веществом для облегчения обнаружения раскрытого здесь связанного или несвязанного анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Подходящими детектируемыми веществами являются различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества и радиоактивные вещества. Примерами подходящих ферментов являются пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, β -галактозидаза или ацетилхолинэстераза; примерами подходящих комплексов простетической группы являются стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примерами подходящих флуоресцентных веществ являются умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; примером люминесцентного вещества является люминол; а примерами подходящих радиоактивных веществ являются ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S и ^3H .

В качестве альтернативы мечению анти-ILT3-антитела или антигенсвязывающего фрагмента человеческий ILT3 может быть проанализирован в биологических жидкостях с помощью конкурентного иммуноанализа с использованием стандартов ILT3, меченных детектируемым веществом, и немеченного раскрытого здесь антитела против человеческого ILT3 или его антигенсвязывающего фрагмента. В этом анализе биологический образец, меченные стандарты ILT3 и анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент объединяют и определяют количество меченого стандарта ILT3, связанного с раскры-

тым здесь немеченным анти-ILT3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Количество человеческого ILT3 в биологическом образце обратно пропорционально количеству меченого стандарта ILT3, связанного с анти-ILT3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Раскрытое здесь анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть также использованы для детектирования ILT3, происходящего от видов, не являющихся человеком, в частности ILT3 приматов (например, собакоподобных обезьян или макак-резусов).

Методы стимуляции иммунных ответов *in vivo*.

Раскрытые здесь анти-ILT3-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть использованы в качестве иммуностимулирующих композиций, например, отдельно или как часть вакцинной или комбинированной терапии, для стимуляции активации В-клеток и/или Т-клеток, например активации Th1-клеток или Th2-клеток у индивидуума. То есть, раскрытое здесь анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут служить в качестве адъювантов, используемых в комбинации с представляющим интерес антигеном для усиления иммунного ответа на этот представляющий интерес антиген *in vivo*. Так, например, для стимуляции гуморального или клеточного иммунного ответа на представляющий интерес антиген (например, для вакцинации) антиген и раскрытое здесь анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть введены совместно (например, совместно, в одно и то же время, в одной и той же композиции или в отдельных композициях, или последовательно так, чтобы происходило усиление иммунного ответа). Представляющий интерес антиген и раскрытое здесь анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть приготовлены вместе в одной фармацевтической композиции или в отдельных композициях. В одном варианте осуществления изобретения представляющий интерес антиген и раскрытое здесь анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят индивидууму одновременно. Альтернативно, в определенных случаях может оказаться желательным сначала введение антигена, а затем раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или наоборот (например, в случае антигена, который по своей природе индуцирует Th1-ответ, может оказаться желательным введение сначала только антигена для стимуляции Th1-ответа, а затем введение раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента отдельно или вместе с бустер-дозой антигена для переключения иммунного ответа на Th2-ответ). В предпочтительных вариантах осуществления изобретения раскрытое здесь анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят во время примирования антигеном, т.е. во время первого введения антигена. Так, например, это может быть осуществлено на день -3, -2, -1, 0, +1, +2, +3. Особенно предпочтительным днем введения раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента является день -1.

В одном варианте осуществления изобретения раскрытое здесь анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят вместе с представляющим интерес антигеном. Представляющим интерес антигеном является антиген, против которого желательно вырабатывание иммунного ответа. Так, например, представляющим интерес антигеном является антиген, способный стимулировать иммунную защиту у индивидуума от заражения инфекционным агентом, от которого происходит этот антиген. Также рассматривается введение раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для усиления иммунных ответов без введения антигена.

Таким образом, репрезентативными представляющими интерес антигенами являются антигены, полученные из инфекционных агентов, где иммунный ответ, направленный против антигена, служит для предотвращения или лечения заболевания, вызываемого этим агентом. Такими антигенами являются, но не ограничиваются ими, вирусные, бактериальные, грибковые или паразитарные белки и любые другие белки, гликопротеины, липопротеины, гликолипиды и т.п. Представляющими интерес антигенами также являются антигены, которые дают благоприятный эффект у индивидуума с риском развития опухоли или у индивидуума с диагностированной опухолью. Предпочтительным индивидуумом является млекопитающее, а особенно предпочтительно человек.

Типичные представляющие интерес антигены могут быть классифицированы следующим образом: белковые антигены, такие как церулоплазмин и сывороточный альбумин; бактериальные антигены, такие как тейхоевые кислоты, жгутиковые антигены, капсулярные полисахариды и внеклеточные бактериальные продукты и токсины; гликопротеины и гликолипиды; вирусы, такие как вирусы животных, растений и бактерий; конъюгированные и синтетические антигены, такие как конъюгаты белок/гаптен, молекулы, экспрессируемые преимущественно опухолями, а не нормальной тканью; синтетические полипептиды и нуклеиновые кислоты, такие как рибонуклеиновая кислота и дезоксирибонуклеиновая кислота. Используемый здесь термин "инфекционный агент" включает любой агент, который экспрессирует антиген, вызывающий клеточный иммунный ответ у хозяина. Неограничивающими примерами вирусных антигенов, которые могут считаться полезными, являются, но не ограничиваются ими, нуклеопротеин (NP) вируса гриппа и белки Gag ВИЧ. Другие гетерологичные антигены включают, но не ограничиваются ими, белок Env ВИЧ или его составные части gp120 и gp41, белок Nef ВИЧ и белок Pol ВИЧ, обратную транскриптазу и протеазу. Кроме того, могут быть использованы и другие вирусные антигены, такие как антигены вируса Эбола (EBOV), такие как, например, NP EBOV или гликопротеин (GP), либо полноразмерные, либо GP-делетированные в области молекулы муцина (Yang et al., Nat. Med. 6:886 (2000)), антигены на-

туральной оспы, вирус гепатита А, В или С, человеческий риновирус, такой как вирус типа 2 или типа 14, вирус простого герпеса, полиовирус типа 2 или 3, вирус ящура (FMDV), вирус бешенства, ротавирус, вирус гриппа, коксакивирус, вирус папилломы человека (HPV), например, вирус папилломы типа 16, его белок Е7 и фрагменты, содержащие белок Е7 или его эпитопы; и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Представляющие интерес антигены необязательно должны быть ограничены антигенами вирусного происхождения. Могут быть включены также и паразитарные антигены, такие как, например, малярийные антигены, грибковые антигены, бактериальные антигены и опухолевые антигены. Примерами антигенов, происходящих от бактерий, являются антигены, происходящие от *Bordetella pertussis* (например, белок Р69 и антигены нитевидного гемагглютинаина (FHA), холерные вибрионы, антигены *Bacillus anthracis* и антигены *E. coli*, такие как субъединица термолabile токсина В *E. coli* (LT-B), антигены K88 *E. coli* и энтеротоксигенные антигены *E. coli*. Другими примерами антигенов являются антигены глутатион- S-трансферазы P28 *Schistosoma mansoni* (антигены P28) и антигены трематод, микоплазмы, круглых червей, ленточных червей, паразитов *Chlamydia trachomatis* и малярийных паразитов, например паразитов рода *Plasmodium* или *Babesia*, например *Plasmodium falciparum*, и пептид-кодирующие иммуногенные эпитопы вышеупомянутых антигенов.

Используемый здесь термин "ассоциированный с опухолью антиген" означает антиген, который влияет на рост опухоли или метастазирование в организме хозяина. Ассоциированный с опухолью антиген может представлять собой антиген, экспрессируемый опухолевой клеткой либо он может представлять собой антиген, который экспрессируется неопухолевой клеткой, но при такой экспрессии он способствует росту или метастазированию опухолевых клеток. Типы опухолевых антигенов и ассоциированных с опухолями антигенов включают любой известный или ранее неизвестный опухолевый антиген, включая, но не ограничиваясь ими, антиген bcr/abl при лейкозе, антигены HPV E6 и E7 онкогенного вируса, ассоциированного с раком шейки матки, антигены MAGE1 и MZ2-E в меланоме или ассоциированные с меланомой и антигены MVC-1 и HER-2 в раковой опухоли молочной железы или ассоциированные с такой опухолью.

Инфекция, заболевание или расстройство, которые можно лечить или предотвращать путем введения композиции, содержащей раскрытое здесь анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включают любую инфекцию, заболевание или расстройство, где иммунный ответ у хозяина предотвращает такие инфекции, заболевания или расстройства. Заболевания, расстройства или инфекции, которые можно лечить или предотвращать путем введения композиции, содержащей раскрытое здесь анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включают, но не ограничиваются ими, любые инфекции, заболевания или расстройства, вызванные, или ассоциированные с ними, грибами, паразитами, вирусами или бактериями; заболевания, расстройства или инфекции, вызванные различными агентами или ассоциированные с агентами, используемыми при биотерроризме, а также листериозом, вирусом Эбола, ОРВИ, натуральной оспой, гепатитом А, гепатитом В, гепатитом С; заболевания и расстройства, вызванные человеческим риновирусом, вирусом ВИЧ и СПИДом, вирусом герпеса, полиовирусом, вирусом ящура и вирусом бешенства; заболевания или расстройства, вызванные или ассоциированные с ними, ротавирусом, вирусом гриппа, коксаки вирусом, вирусом папилломы человека, SIV, малярией, раком, например опухолями; и заболевания или расстройства, вызванные или ассоциированные с ними, *Bordetella pertussis*, холерными вибрионами, *Bacillus anthracis*, *E. coli*, трематодами, микоплазмой, круглыми червями, ленточными червями, *Chlamydia trachomatis* и малярийными паразитами и т.п.

Иммунные ответы на опухолевые клетки.

Регуляторные Т-клетки играют важную роль в поддержании иммунологической аутоотолерантности благодаря подавлению иммунных ответов против аутоиммунных заболеваний и рака. В соответствии с этим в одном варианте осуществления изобретения усиление иммунного ответа может оказаться эффективным для усиления иммунного ответа при раке. Следовательно, раскрытые здесь анти-ILT3-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть использованы при лечении злокачественных новообразований для ингибирования роста опухоли или метастазирования. Раскрытые здесь анти-ILT3-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть введены системно или местно в участок опухоли.

В одном варианте осуществления изобретения модуляция функции человеческого ILT3 может быть эффективной для индуцирования иммунитета против опухоли. ILT3-связывающая молекула может быть введена пациенту, имеющему опухолевые клетки (например, саркому, меланому, лимфому, лейкоз, нейробластому, карциному) для предотвращения опухоли-специфической толерантности у индивидуума.

Используемый здесь термин "новообразование" определяется ростом злокачественной опухоли или патологическими состояниями, характеризующимися доброкачественными, гиперпролиферативными и гиперпластическими клетками. Общее значение используемого в медицине термина "неоплазия" включает "рост новых клеток", который приводит к потере способности к нормальной регуляции роста, например, к росту опухолевых клеток.

Используемые здесь термины "гиперпролиферативный", "гиперпластический", "злокачественный" и "неопластический" являются синонимами и относятся к клеткам в аномальном состоянии или в состоянии, характеризующемся быстрой пролиферацией или неоплазией. Эти термины включают все типы ги-

перпролиферативного роста, гиперпластического роста, роста раковых клеток или онкогенных процессов, метастатических тканей или злокачественно трансформированных клеток, тканей или органов, независимо от их гистопатологического типа или стадии инвазивности. "Гиперплазия" означает клетки, подвергающиеся аномально высокой скорости роста. Однако используемые здесь термины "неоплазия" и "гиперплазия" могут быть использованы как синонимы, поскольку в контексте настоящего изобретения они относятся в основном к клеткам с аномальной скоростью роста. Неоплазия и гиперплазия включают "опухоли", которые могут быть доброкачественными, предраковыми или злокачественными.

Термины "неоплазия", "гиперплазия" и "опухоль" часто называют "раком", что является общим названием более чем для 100 заболеваний, которые характеризуются неконтролируемым аномальным ростом клеток. Примерами рака являются, но не ограничиваются ими, рак молочной железы; рак толстой кишки; немелкоклеточный рак легких, рак головы и шеи; рак прямой и ободочной кишки; рак легких; рак предстательной железы; рак яичника; рак почек; меланома; рак желудочно-кишечного тракта (например, рак поджелудочной железы и желудка) и остеогенная саркома.

В одном варианте осуществления изобретения рак выбран из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, меланомы, рака молочной железы, рака легких, рака головы и шеи, рака бронхов, рака прямой и ободочной кишки, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака головного мозга или центральной нервной системы (например, глиобластомы), рака периферической нервной системы, рака пищевода, рака шейки матки, рака матки или эндометрия, рака ротовой полости или глотки, рака печени, рака почек, рака яичек, рака желчных путей, рака тонкой кишки или аппендикса, рака слюнных желез, рака щитовидной железы, рака надпочечников, остеосаркомы, хондросаркомы или рака кровеносных тканей.

Иммунные ответы на инфекционные агенты.

Повышенная регуляция иммунных ответов может происходить в форме усиления уже существующего иммунного ответа или индуцирования первичного иммунного ответа. Так, например, усиление иммунного ответа посредством модуляции ИЛТЗ может оказаться полезным в случаях вирусной инфекции. Поскольку раскрытые здесь анти-ИЛТЗ-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут усиливать иммунные ответы, то они могут быть терапевтически ценными в тех случаях, когда желательно более быстрое или тщательное удаление патогенных агентов, например бактерий и вирусов.

Используемый здесь термин "вирусная инфекция" охватывает инфекции микроорганизмами, включая, но не ограничиваясь ими, ВИЧ (например, ВИЧ-1 и ВИЧ-2), вирусы герпеса человека, цитомегаловирус (особенно человеческий), ротавирус, вирус Эпштейна-Барра, вирус ветряной оспы, вирусы гепатита, такие как вирус гепатита В, вирус гепатита А, вирус гепатита С и вирус гепатита Е; парамиксовирусы: респираторно-синцитиальный вирус, вирус парагриппа, вирус кори, вирус паротита, вирусы папилломы человека (например, HPV6, 11, 16, 18 и т.п.), флавивирусы (например, вирус желтой лихорадки, вирус денге, вирус клещевого энцефалита, вирус японского энцефалита) или вирус гриппа.

Используемый здесь термин "бактериальные инфекции" охватывает инфекции различными бактериальными организмами, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии. Примерами являются, но не ограничиваются ими, *Neisseria* spp., включая *N. gonorrhea* and *N. meningitidis*, *Streptococcus* spp., включая *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mutans*; *Haemophilus* spp., включая *H. influenzae* типа В, нетипированный *H. influenzae*, *H. ducreyi*; *Moraxella* spp., включая *M. catarrhalis*, также известный как *Branhamella catarrhalis*; *Bordetella* spp., включая *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium* spp., включая *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella* spp., включая *L. pneumophila*; *Escherichia* spp., включая энтеротоксические *E. coli*, энтерогеморрагические *E. coli*, энтеропатогенные *E. coli*; *Vibrio* spp., включая *V. cholera*, *Shigella* spp., включая *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia* spp., включая *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Campylobacter* spp., включая *C. jejuni* and *C. coli*; *Salmonella* spp., including *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria* spp., включая *L. monocytogenes*; *Helicobacter* spp., включая *H. pylori*; *Pseudomonas* spp., включая *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., включая *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus* spp., включая *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium* spp., включая *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile*; *Bacillus* spp., включая *B. anthracis*; *Corynebacterium* spp., включая *C. diphtheriae*; *Borrelia* spp., включая *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersonii*, *B. hermsii*; *Ehrlichia* spp., включая *E. equi* и агент, вызывающий человеческий гранулоцитарный эрлихиоз; *Rickettsia* spp., включая *R. rickettsii*; *Chlamydia* spp., включая *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*; *Leptospira* spp., включая *L. interrogans*; *Treponema* spp., включая *T. pallidum*, *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*. Предпочтительными бактериями являются, но не ограничиваются ими, *Listeria*, *mycobacteria*, *mycobacteria* (например, *tuberculosis*), *Anthrax*, *Salmonella* и *Listeria monocytogenes*.

В другом варианте осуществления изобретения Т-клетки могут быть взяты у пациента и подвергнуты контактированию *in vitro* с раскрытым здесь анти-ИЛТЗ антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, необязательно, вместе с активирующим сигналом (например, антигеном плюс АПК или поликлональным антителом) и повторно введены пациенту.

Раскрытые здесь анти-ИЛТЗ-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть также использованы в профилактических целях в вакцинах против различных патогенов. Иммунитет против па-

тогена, например вируса, может быть индуцирован путем вакцинации вирусным белком вместе с раскрытым здесь анти-ILТЗ антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Альтернативно, для вакцинации может быть использован экспрессионный вектор, который кодирует гены патогенного антигена и раскрытого здесь для анти-ILТЗ-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, например экспрессионный вектор на основе осповакцины, сконструированный для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок, и нуклеиновой кислоты, кодирующей раскрытое здесь анти-ILТЗ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Патогенами, подходящими для получения вакцин, могут быть, например, вирус гепатита В; вирус гепатита С; вирус Эпштейна-Барра; цитомегаловирус; ВИЧ-1; ВИЧ-2; бактерии, вызывающие туберкулез; патогены, вызывающие малярию и шистосомоз.

Настоящее изобретение также охватывает раскрытое здесь анти-ILТЗ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с диагностическим или терапевтическим агентом. Раскрытое здесь анти-ILТЗ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть использованы в диагностических целях, например, для мониторинга развития или прогрессирования опухоли в процессе процедуры клинического тестирования, например, для определения эффективности данной схемы лечения. Детектирование может упрощено благодаря связыванию антитела с детектируемым веществом. Примерами детектируемых веществ являются различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, биолюминесцентные вещества, радиоактивные вещества, позитрон-излучающие металлы, применяемые в различных методах позитронно-эмиссионной томографии, и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов. Детектируемое вещество может быть связано или конъюгировано либо непосредственно со связывающей молекулой, либо опосредованно, через промежуточное вещество (такое как, например, линкер, известный специалистам в данной области), с применением методов, известных специалистам. В патенте США № 4741900 раскрываются ионы металлов, которые могут быть конъюгированы со связывающими молекулами. Примерами подходящих ферментов являются пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; примерами подходящих комплексов простетической группы являются стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примерами подходящих флуоресцентных веществ являются умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, данзилхлорид или фикоэритрин; примером люминесцентного вещества является люминол; примерами биолюминесцентных веществ являются люцифераза, люциферин и экворин; а примерами подходящих радиоактивных веществ являются ^{125}I , ^{131}I и ^{99}Tc .

Кроме того, раскрытое здесь анти-ILТЗ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин, например, с цитостатическим или цитотоксическим агентом, с терапевтическим агентом или ионом радиоактивного металла, например с альфа-излучателями, такими как, например, ^{213}Bi . Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который оказывает негативное воздействие на клетки. Примерами являются паклитаксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидийбромид, эметин, митомидин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи. Терапевтическими агентами являются, но не ограничиваются ими, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлоретамин, хлорамбуцилтиотепа, мелфалан, кармустин (DSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дибромманнит, стрептозоцин, митомидин С и цис-дихлордиамин-платина (II) (DDP), цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (прежнее название дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (прежнее название актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС) и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Настоящее изобретение также относится к способам лечения, которые включают введение раскрытого здесь анти-ILТЗ-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента животному, предпочтительно млекопитающему, а наиболее предпочтительно человеку, т.е. пациенту для лечения, обнаружения и/или профилактики одного или более из раскрытых здесь заболеваний, расстройств или состояний. Терапевтическими соединениями согласно изобретению являются, но не ограничиваются ими, раскрытое здесь анти-ILТЗ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Раскрытое здесь анти-ILТЗ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть использованы для лечения, диагностики, ингибирования или профилактики заболеваний, расстройств или состояний, ассоциированных с aberrантной активностью ILТЗ, включая, но не ограничиваясь ими, любое одно или более раскрытых здесь заболеваний, расстройств или состояний.

Раскрытое здесь анти-ILТЗ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть преимущественно использованы в комбинации с другими моноклональными или химерными связывающими молекулами или с лимфокинами или гемопоэтическими факторами роста (такими как, например, IL-2, IL-3 и IL-7), например, служащими для увеличения числа или повышения активности эффекторных клеток, которые взаимодействуют со связывающими молекулами.

Раскрытое здесь анти-ILТЗ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть введены

отдельно или в комбинации с терапией других типов, например иммуностимулирующей терапией или терапией, предназначенной для регуляции пролиферации активированных иммунных клеток-мишеней (например, раковых клеток или патогенов). Типичными способами лечения являются, например, лучевая терапия, химиотерапия, гормональная терапия, иммунотерапия и введение противоопухолевых агентов, антибиотиков и иммуноглобулина.

Раскрытое здесь анти-ILТ3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть введены человеку в терапевтических целях. Кроме того, раскрытое здесь анти-ILТ3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть введены млекопитающему, не являющемуся человеком и экспрессирующему ILТ3, с которым перекрестно реагирует связывающаяся молекула (например, у приматов), для использования в ветеринарии, или животному с моделью человеческого заболевания.

Комбинации.

Анти-ILТ3 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут быть использованы в неконъюгированных формах или в формах, конъюгированных со вторым агентом, например с цитотоксическим лекарственным средством, радиоизотопом или белком, например белковым токсином или вирусным белком. Этот способ включает введение анти-ILТ3-антител или их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению отдельно или в виде конъюгата с цитотоксическим лекарственным средством, индивидууму, нуждающемуся в таком лечении. Анти-ILТ3 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут быть использованы для доставки различных терапевтических агентов, например цитотоксической молекулы, например терапевтического лекарственного средства, радиоизотопа, молекул растительного, грибкового или бактериального происхождения или биологических белков (например, белковых токсинов) или частиц (например, рекомбинантных вирусных частиц, например, посредством белка оболочки вируса), или их смесей.

Дополнительные комбинированные терапии.

Анти-ILТ3 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут быть использованы в комбинации с другими видами терапии. Так, например, комбинированная терапия может включать введение композиции, содержащей анти-ILТ3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, приготовленные и/или вводимые вместе с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, например с одним или более противораковыми, цитотоксическими или цитостатическими агентами, агентами для гормональной терапии, вакцинами и/или другими видами иммунотерапии. В других вариантах осуществления изобретения анти-ILТ3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с другими способами лечения, включая хирургическое вмешательство, облучение, криохирургию и/или термотерапию. В такой комбинированной терапии могут быть преимущественно использованы более низкие дозы вводимых терапевтических агентов во избежание возможных токсических эффектов или осложнений, ассоциированных с различными монотерапиями.

Термин "в комбинации с" не означает, что терапия или терапевтические агенты должны вводиться одновременно и/или должны быть приготовлены для их совместной доставки, хотя эти способы доставки входят в объем настоящего изобретения. Анти-ILТ3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть введены до, во время или после проведения одной или более других дополнительных терапий или введения терапевтических агентов. Введение анти-ILТ3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и другого агента или другая схема терапевтического лечения могут быть проведены в любом порядке. Обычно, каждый агент вводят в дозе и/или в соответствии с временным графиком, установленным для этого агента. Кроме того, следует отметить, что дополнительный терапевтический агент, используемый в этой комбинации, может быть введен вместе с другими агентами в одной композиции или по отдельности в различных композициях. Вообще говоря, предполагается, что дополнительные терапевтические агенты, используемые в комбинации, должны быть введены на уровнях, не превышающих уровни их использования по отдельности. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни, используемые в комбинации, будут ниже, чем уровни, используемые отдельно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрытое здесь анти-ILТ3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с одним или более ингибиторами контрольной точки или антагонистами рецептора запрограммированной гибели 1 (PD-1) или с его лигандами PD-L1 и PD-L2. Ингибитор или антагонист могут представлять собой антитело, антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, гибридный белок или олигопептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против PD-1 выбрано из ниволумаба (OPDIVO®, Bristol Myers Squibb, New York, New York), пембролизумаба (KEYTRUDA®, Merck Sharp & Dohme Corp, Kenilworth, NJ USA), цетиблиумаба (Regeneron, Tarrytown, NY) или пидилизумаба (CT-011). В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1 представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или PD-1-связывающую часть PD-L1 или PD-L2, присоединенную к константной области (например, Fc-области последовательности иммуноглобулина)). В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-1 представляет собой AMP-224. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор PD-L1 представляет собой антитело против PD-L1, такое как дурвалумаб (IMFINZI®, Astrazeneca, Wilmington, DE), атезолизумаб (TECENTRIQ®, Roche, Zurich, CH) или авелумаб

(BAVENCIO®, EMD Serono, Billerica, MA). В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист, связывающийся с анти-PD-L1 антителом, выбран из YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C или MDX-1105.

MDX-1105, также известный как BMS-936559, представляет собой анти-PD-L1 антитело, описанное в WO 2007/005874. Антитело YW243.55.S70 представляет собой анти-PD-L1 антитело, описанное в WO 2010/077634 (последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей представлены в SEQ ID NO: 20 и 21 соответственно).

Ниволумаб, также известный как OPDIVO®, MDX-1106-04, ONO-4538 или BMS-936558, является полностью человеческим антителом IgG4 против PD-1, описанным в WO 2006/121168 и в патенте США № 8008449.

Пембролизумаб, также известный как KEYTRUDA®, ламбролизумаб, MK-3475 или SCH-900475, представляют собой гуманизированное антитело против PD-1, описанное в патенте США № 8354509 и в WO 2009/114335 и раскрытое, например, Hamid et al., New England J. Med. 369(2):134-144 (2013). Тяжелые и легкие цепи пембролизумаба представлены аминокислотными последовательностями в SEQ ID NO: 225 и 226 соответственно.

Пидилизумаб, также известный как CT-011 (Cure Tech), представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1, которое связывается с PD-1. Пидилизумаб и другие гуманизированные моноклональные антитела против PD-1 раскрыты в WO 2009/101611. Другие анти-PD-1-антитела включают, среди прочих, AMP 514 (Amplimmune), например анти-PD-1-антитела, раскрытые в патенте США № 8609089; в публикации США № 2010028330 и в публикации США № 20120114649.

AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; например, раскрытый в WO 2010/027827 и WO 2011/066342) представляет собой растворимый гибридный рецептор Fc PD-L2, который блокирует взаимодействие между PD-1 и B7-H1.

MDPL3280A (Genentech/Roche) представляет собой Fc-оптимизированное моноклональное человеческое антитело IgG1, которое связывается с PD-L1. MDPL3280A и другие человеческие моноклональные антитела против PD-L1 раскрыты в патенте США № 7943743 и в публикации США № 20120039906.

Другими связывающимися анти-PD-L1 агентами являются YW243.55.S70 (вариабельные области тяжелой и легкой цепи показаны в SEQ ID NO: 20 и 21 в WO 2010/077634) и MDX-1105 (также обозначаемый BMS-936559). Эти и другие связывающиеся анти-PD-L1 агенты раскрыты в WO 2007/005874.

Наборы.

Кроме того, настоящее изобретение относится к наборам, содержащим один или более компонентов, которые включают, но не ограничиваются ими, анти-ILТ3-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, обсуждаемые здесь в связи с одним или более дополнительными компонентами, включая, но не ограничиваясь ими, дополнительный терапевтический агент, обсуждаемый в настоящем документе. Антитело или его фрагмент и/или терапевтический агент могут быть приготовлены в виде чистой композиции или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем в фармацевтической композиции.

В одном варианте осуществления изобретения набор включает анти-ILТ3-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или их фармацевтическую композицию в одном контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом сосуде) и дополнительный терапевтический агент в другом контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом сосуде).

В другом варианте осуществления изобретения набор включает комбинацию анти-ILТ3-антител или их антигенсвязывающих фрагментов или их фармацевтическую композицию в комбинации с одним или более терапевтическими агентами, приготовленными вместе, необязательно, в фармацевтической композиции, в одном общем контейнере.

Если набор включает фармацевтическую композицию для парентерального введения индивидууму, то такой набор может включать устройство для осуществления такого введения. Так, например, набор может включать одну или более игл для подкожных инъекций или другие устройства для инъекций, обсуждаемые выше. Таким образом, настоящее изобретение включает набор, содержащий устройство для инъекций и анти-ILТ3-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, например, где устройство для инъекций включает антитело или его фрагмент или где антитело или его фрагмент находятся в отдельном сосуде.

Набор может включать вкладыш в упаковку, где имеется информация о фармацевтических композициях и лекарственных формах, содержащихся в наборе. Обычно такая информация помогает пациентам и врачам эффективно и безопасно использовать фармацевтические композиции и лекарственные формы, содержащиеся в этом наборе. Так, например, во вкладыше может содержаться информация, касающаяся комбинации согласно изобретению, а именно, фармакокинетические и фармакодинамические данные, данные клинических исследований, параметры эффективности, показания и применение, противопоказания, предупреждения, меры предосторожности, побочные эффекты, передозировка, правильная дозировка и способ введения, форма выпуска, надлежащие условия хранения, ссылки на юридическое лицо, информация о производителе/дистрибьюторе и патентная информация.

Способы получения антител и их антигенсвязывающих фрагментов.

Раскрытые здесь анти-ILТ3-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть также получены рекомбинантным методом. В этом варианте осуществления изобретения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы антитела, могут быть встроены в вектор (плазмиду или вирус) и трансфицированы или трансформированы в клетку-хозяина, где они могут экспрессироваться и секретироваться. Существует несколько способов получения рекомбинантных антител, которые известны специалистам в данной области.

В своих конкретных аспектах настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HC и LC, где HC содержит по меньшей мере HC-CDR3 раскрытого здесь анти-ILТ3-антитела или его варианта, где HC-CDR3 имеет одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации. В других вариантах осуществления изобретения каркасная область вариационной области HC и/или LC включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В своих конкретных аспектах настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HC и LC, где HC содержит HC-CDR1, 2 и 3 раскрытого здесь анти-ILТ3-антитела или его варианта, где одна или более HC-CDR1, 2 и 3 имеет одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и где LC содержит LC-CDR1, 2 и 3 раскрытого здесь анти-ILТ3-антитела или его варианта, где одна или более из HC-CDR1, 2 и 3 имеют одну, две или три аминокислотных замены, добавления, делеции или их комбинации. В других вариантах осуществления изобретения каркасная область вариационной области HC и/или LC включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В своих конкретных аспектах настоящее изобретение относится к первому экспрессионному вектору, включающему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую HC, содержащую по меньшей мере HC-CDR раскрытого здесь анти-ILТ3-антитела или его варианта, где одна или более из трех CDR HC имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область вариационной области HC содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций, и ко второму экспрессионному вектору, включающему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую LC, содержащую по меньшей мере CDR LC раскрытого здесь анти-ILТ3-антитела или его варианта, где одна или более из трех LC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область вариационной области LC содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В своих конкретных аспектах настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим V_H и V_L , где V_H содержит по меньшей мере HC-CDR3 раскрытого здесь анти-ILТ3-антитела или его варианта, где HC-CDR3 имеет одну, две или три аминокислотных замены, добавления, делеции или их комбинации. В других вариантах осуществления изобретения каркасная область вариационной области V_H и/или V_L содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В своих конкретных аспектах, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим V_H и V_L , где HC содержит HC-CDR1, 2 и 3 раскрытого здесь анти-ILТ3-антитела или его варианта, где одна или более HC-CDR1, 2 и 3 имеет одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации, и где V_L содержит LC-CDR1, 2 и 3 раскрытого здесь анти-ILТ3-антитела или его варианта, где одна или более HC-CDR1, 2 и 3 имеют одну, две или три аминокислотных замены, добавления, делеции или их комбинации. В других вариантах осуществления изобретения каркасная область вариационной области V_H и/или V_L содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В своих конкретных аспектах, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим V_H , содержащий по меньшей мере HC-CDR раскрытого здесь анти-ILТ3-антитела или его варианта, где одна или более из трех HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область вариационной области V_H и V_L содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций; и к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим V_L , содержащий по меньшей мере LC-CDR раскрытого здесь анти-ILТ3-антитела или его варианта, где одна или более из трех LC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область вариационной области V_H и/или V_L содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии раскрытых здесь антител или их фрагментов, хорошо известны специалистам в данной области и включают множество иммortalизированных клеточных линий, имеющихся в Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC). Такими клеточными линиями являются, *inter alia*, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки NS0, SP2, клетки HeLa, клетки почек детеныша хомячка (BHK), клетки почек обезьяны (COS), клетки человеческой гепатоцеллюлярной карциномы (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3,

клетки почек человеческого эмбриона 293 (HEK-293) и ряд других клеточных линий. Особенно предпочтительные клеточные линии могут быть выбраны путем выявления клеточных линий, имеющих высокие уровни экспрессии. Другими клеточными линиями, которые могут быть использованы, являются клеточные линии насекомых, такие как клетки Sf9, клетки амфибий, бактериальные клетки, клетки растений, клетки нитчатых грибов (например, *Trichoderma reesei*) и клетки дрожжей (например, *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris*). В конкретных аспектах изобретения клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку-хозяина, такую как *E. coli*.

При введении рекомбинантных экспрессионных векторов, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть или фрагмент, легкую цепь и/или антигенсвязывающий фрагмент, в клетки-хозяева, антитела продуцируются в результате культивирования клеток-хозяев в условиях и в течение определенного периода времени, достаточных для экспрессии антитела в клетках-хозяевах, или более предпочтительно в результате секреции антитела в культуральную среду, в которой культивируют эти клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды и дополнительно очищены или обработаны для получения антител согласно изобретению.

В конкретных аспектах изобретения, клетки-хозяева трансфицируют экспрессионным вектором, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HC и LC, где HC содержит по меньшей мере HC-CDR3 раскрытого здесь анти-ILТЗ-антитела или его варианта, где HC-CDR3 имеет одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации. В других вариантах осуществления изобретения каркасная область вариабельной области HC и/или LC включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В конкретных аспектах изобретения клетки-хозяева трансфицируют экспрессионным вектором, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HC и LC, где HC содержит HC-CDR1, 2 и 3 раскрытого здесь анти-ILТЗ-антитела или его варианта, где одна или более HC-CDR1, 2 и 3 имеет одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и где LC содержит LC-CDR1, 2 и 3 раскрытого здесь анти-ILТЗ-антитела или его варианта, где одна или более из HC-CDR1, 2 и 3 имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации. В других вариантах осуществления изобретения каркасная область вариабельной области HC и/или LC включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В конкретных аспектах изобретения клетки-хозяева трансфицируют первым экспрессионным вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую HC, содержащую по меньшей мере HC-CDR раскрытого здесь анти-ILТЗ-антитела или его варианта, где одна или более из трех HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область вариабельной области HC содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций, и вторым экспрессионным вектором, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую LC, содержащую по меньшей мере LC-CDR раскрытого здесь анти-ILТЗ-антитела или его варианта, где одна или более из трех LC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область вариабельной области LC содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В конкретных аспектах изобретения клетки-хозяева трансфицируют экспрессионным вектором, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие V_H и V_L , где V_H содержит по меньшей мере HC-CDR3 раскрытого здесь анти-ILТЗ-антитела или его варианта, где HC-CDR3 имеет одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации. В других вариантах осуществления изобретения каркасная область вариабельной области V_H и/или V_L содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В конкретных аспектах изобретения клетки-хозяева трансфицируют экспрессионным вектором, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие V_H и V_L , где V_H содержит HC-CDR1, 2 и 3 раскрытого здесь анти-ILТЗ-антитела или его варианта, где одна или более HC-CDR1, 2 и 3 имеет одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и где V_L включает LC-CDR1, 2 и 3 раскрытого здесь анти-ILТЗ-антитела или его варианта осуществления, где одна или более HC-CDR1, 2 и 3 имеет одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации. В других вариантах осуществления изобретения каркасная область вариабельной области V_H и/или V_L содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В конкретных аспектах изобретения клетки-хозяева трансфицируют первым экспрессионным вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую V_H , содержащий по меньшей мере HC-CDR раскрытого здесь анти-ILТЗ-антитела или его варианта, где одна или более из трех HC-CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область вариабельной области V_H содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций, и вторым экспрессионным вектором, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую V_L , содержащий по меньшей мере LC-CDR раскрытого здесь анти-ILТЗ-антитела или его варианта, где одна или более из трех LC-CDR имеют одну, две или три ами-

нокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область вариательной области V_L содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

В конкретных вариантах осуществления изобретения HC и LC или V_H и V_L экспрессируются в виде гибридного белка, где N-конец HC и LC присоединены к лидерной последовательности для облегчения транспорта антитела по секреторному пути. Примерами лидерных последовательностей, которые могут быть использованы, являются MSVPTQVLGLLLLWLTDARC (SEQ ID NO: 12) или MEWSWVFLFSLVTTGVHS (SEQ ID NO: 11).

Настоящее изобретение также относится к плазмидному или вирусному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую раскрытое здесь анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Настоящее изобретение также относится к плазмидному или вирусному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую HC раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где одна или более из трех CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область вариательной области HC включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую LC раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где одна или более из трех CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область вариательной области LC включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

Настоящее изобретение также относится к плазмидному или вирусному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую HC раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и к плазмидному или вирусному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую LC раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей плазмидный или вирусный вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую HC раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где одна или более из трех CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеций или их комбинации и/или где каркасная область вариательной области HC включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций, и плазмидный или вирусный вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую LC раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где одна или более из трех CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область вариательной области LC включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина CHO или HEK-293.

Настоящее изобретение также относится к плазмидному или вирусному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую раскрытое здесь анти-ILT3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Настоящее изобретение также относится к плазмидному или вирусному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую V_H раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где одна или более из трех CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область V_H включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций; и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую V_L раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где одна или более из трех CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область LC включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

Настоящее изобретение также относится к плазмидному или вирусному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую V_H раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и к плазмидному или вирусному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую V_L раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей плазмидный или вирусный вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую V_H раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где одна или более из трех CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область V_H включает

0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций, и плазмидный или вирусный вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую V_L раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта раскрытого здесь анти-ILT3-антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где одна или более из трех CDR имеют одну, две или три аминокислотные замены, добавления, делеции или их комбинации и/или где каркасная область V_L включает 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина СНО или НЕК-293.

Анти-ILT3 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть выделены из культуральной среды с применением стандартных методов очистки белка. Кроме того, экспрессия антител согласно изобретению (или других их частей) из клеточных линий-производителей может быть усилена с применением ряда известных методов. Так, например, общим подходом для усиления экспрессии в определенных условиях является система экспрессии гена глутамин-синтетазы (система GS).

Вообще говоря, гликопротеины, продуцируемые в конкретной клеточной линии или у трансгенного животного, будут иметь паттерн гликозилирования, характерный для гликопротеинов, продуцируемых в клеточной линии или у трансгенного животного (см., например, Croset et al., *J. Biotechnol.* 161:336-348 (2012)). Следовательно, конкретный паттерн гликозилирования антитела будет зависеть от конкретной клеточной линии или трансгенного животного, используемого для продуцирования антитела. Однако, все антитела, кодируемые описанными здесь молекулами нуклеиновой кислоты или содержащие описанные здесь аминокислотные последовательности, входят в объем настоящего изобретения, независимо от паттерна гликозилирования антител.

Нижеследующие примеры приводятся для лучшего понимания настоящего изобретения.

Общие методы.

Стандартные методы молекулярной биологии описаны Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001), *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993), *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Стандартные методы также можно найти у Ausbel, et al. (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, где описано клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1); клонирование в клетках млекопитающих и в дрожжах (том 2); экспрессия гликоконъюгатов и белков (том 3) и биоинформатика (том 4).

Методы очистки белка, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию, описаны в литературе (Coligan, et al. (2000), *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, получение гибридных белков, гликозилирование белков описаны в литературе (см., например, Coligan, et al. (2000), *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausbel, et al. (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, p. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001), *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; p. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001), *BioDirectory*, Piscataway, N.J., p. 384-391). Получение, очистка и фрагментация поликлональных и моноклональных антител описаны в литературе (Coligan, et al. (2001), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999), *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, см. выше). Также описаны стандартные методы характеристики взаимодействий лиганда/рецептора (см., например, Coligan, et al. (2001), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Могут быть получены моноклональные, поликлональные и гуманизированные антитела (см., например, Sheperd and Dean (eds.) (2000), *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann and Dubel (eds.) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, New York; Harlow and Lane (1988), *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 139-243; Carpenter, et al. (2000), *J. Immunol.* 165:6205; He, et al. (1998), *J. Immunol.* 160:1029; Tang et al. (1999), *J. Biol. Chem.* 274:27371-27378; Baca et al. (1997), *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Chothia et al. (1989), *Nature* 342:877-883; Foote and Winter (1992), *J. Mol. Biol.* 224:487-499; патент США № 6329511).

В качестве альтернативы гуманизации применяются библиотеки человеческих антител, представленные на фаге, или библиотеки человеческих антител у трансгенных мышей (Vaughan et al. (1996), *Nature Biotechnol.* 14:309-314; Barbas (1995), *Nature Medicine*, 1:837-839; Mendez et al. (1997), *Nature Genetics*, 15:146-156; Hoogenboom and Chames (2000), *Immunol. Today*, 21:371-377; Barbas et al. (2001), *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Kay et al. (1996), *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin et al. (1999), *Nature Biotechnol.* 17:397-399).

Антитела могут быть конъюгированы, например, с небольшими молекулами лекарственного средства, ферментами, липосомами, полиэтиленгликолем (ПЭГ). Антитела могут быть использованы для терапии, диагностики, в наборах или для других целей, и такими антителами являются антитела, связанные, например, с красителями, радиоизотопами, ферментами или металлами, например с коллоидным

золотом (см., например, Le Doussal et al. (1991), *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini et al. (1998), *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing and Bishop (1999), *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts et al. (2002), *J. Immunol.* 168:883-889).

Методы проточной цитометрии, включая клеточный сортинг с активацией флуоресценции (FACS) являются известными (см., например, Owens, et al. (1994), *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001), *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003), *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Флуоресцентные реагенты, подходящие для модификации нуклеиновых кислот, включая нуклеиново-кислотные праймеры и зонды, полипептиды и антитела, для их использования, например, в качестве диагностических реагентов описаны в литературе (*Molecular Probes* (2003), Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003), Catalogue, St. Louis, MO).

Стандартные методы гистологического анализа иммунной системы описаны в литературе (см., например, Muller-Harmelink (ed.) (1986), *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, et al. (2000), *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, et al. (2002), *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY).

Пакеты программного обеспечения и базы данных для определения, например, антигенных фрагментов, лидерных последовательностей, укладки белков, функциональных доменов, сайтов гликозилирования и выравнивания последовательностей описаны в литературе (см., например, GenBank, VECTOR NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DECYPHER® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, et al. (2000), *Bioinformatics*, 16:741-742; Menne, et al. (2000), *Bioinformatics Applications Note*, 16:741-742; Wren, et al. (2002), *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983), *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986), *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

Определение чистоты: эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (ЭХ-ВЭЖХ) или (ЭХ) проводили в системе ACQUITY® UPLC® класса H. Используемая колонка представляла собой колонку для ЭХ-ВЭЖХ белка ACQUITY® UPLC® (Часть № 186005225, 1,7 мкм, 200 Å, 4,6×150 мм) от Waters (Milford, MA). Используемая температура колонки составляла 25°C, а образец 10 мкл впрыскивали в количестве 1 мг/мл при системной скорости потока 0,5 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 100 мМ фосфата натрия, 200 мМ хлорида натрия и 0,02% азида натрия, pH 7,0. Данные количественно определяли на 214 и 280 нм и анализировали с использованием компьютерной программы Empower 3. Была использована стандартная смесь белков для ЭХ ВЕН200 (Часть No. 186006518) от Waters (Milford, MA), и эту смесь впрыскивали в количестве 10 мкг, после чего оценивали уровень разрешения по USP, теоретические пластины и контактирование по концам.

В способе NANO-DSF™ (торговый знак модифицированного метода дифференциальной сканирующей флуориметрии для определения стабильности белка с использованием внутренней флуоресценции триптофана или тирозина) среднюю точку на температурной кривой теплового разворачивания белка, T_m и среднюю точку на кривой теплового агрегирования, Tagg, определяли с помощью NANO-DSF™ с применением дифференциального сканирующего флуориметра PROMETHEUS™ NT.48 (Nanotemper Technologies), регулируемого с помощью компьютерной программы PR THERMCONTROL™ v2.0.4. Мощность возбуждения составляла 40%, а температура повышалась с 20 до 95°C со скоростью 1°C/мин. T_m и Tagg измеряли автоматически. Образцы получали путем разведения до 1 мг/мл в 20 мМ ацетатно-натриевого буфера, pH 5,5 и подвергали капиллярному воздействию в стеклянном капилляре PROMETHEUS™ (PR-L002).

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF): cIEF проводили в системе iCE3 от Protein Simple (San Jose, CA) с использованием компьютерной программы iCE CFR™ 4.1.1 для управления устройством и анализа данных. Используемая здесь кассета для cIEF была покрыта Fc (Protein Simple, 101701) и была приготовлена в соответствии с инструкцией производителя. Приготавливали 200 мкл образца, состоящего из 40 мкг анализа и 1% об/об PHARMALYTE® 3-10, 0,5% об./об. PHARMALYTE® 8-10,5, 0,5% об./об. Pharmalyte 5-8 (GE Healthcare), 37,5% об./об. 8,0 М мочевины (Sigma-Aldrich), 35% об/об 1% PHARMALYTE® и 1 мкл каждого из маркеров pI 5,85 и 9,22 (Protein Simple). Образцы впрыскивали в течение 60 секунд. Параметры изоэлектрического фокусирования составляли 1500 В в течение 1 мин и 3000 В в течение 8 мин, pI измеряли автоматически с использованием внутренних маркеров pI, служащих в качестве стандарта калибровки в двух точках. Откалиброванные данные были дополнительно проанализированы и количественно определены путем преобразования в формат Empower и проанализированы с использованием Empower 3.

Пример 1.

Гибридомный клон 52B8 идентифицировали путем стандартной иммунизации мышей и крыс и гибридомного отбора. Обычно мышей или крыс Balb/C иммунизировали рекомбинантным человеческим белком ILT3-HIS путем стандартной четырехнедельной иммунизации в подушечку лапы для продуцирования гипериммунного ответа. Электрослияние общих лимфоцитов из дренирующих лимфоузлов с использованием миеломного партнера по слиянию Р3 приводило к получению иммортализованных гибри-

дом. Супернатант гибридомы подвергали скринингу с помощью первичного клеточного ELISA-анализа на связывание с использованием клеток CHO с человеческим ILT3. Второй скрининг на родительских клетках CHO, клетках CHO-ILT3 SNP, клетках CHO с ILT3 макака-резуса, CHO-ILT5, CHO-ILT8 и CHO-ILT11 проводили в клеточном формате ELISA (см. Пример 2). Субклонирование путем лимитирующего разведения осуществляли на ILT3-специфических гибридомных клетках и гибридомных клетках, позитивных по ILT3 макака-резуса. Субклоны были размножены для получения очищенного белка в целях проведения дополнительных тестов с помощью анализов Biacore и функционального скрининга. В табл. 5 показаны 10 гибридомных клонов, продуцирующих антитела, которые связывались вместе и обладали высокой аффинностью к человеческому ILT3, как было определено с помощью клеточного ELISA и Biacore, описанных в Примерах 2 и 4 соответственно.

Таблица 5

Клон	Родительские виды	cELISA - человеческий ILT3 EC50 (нг/мл)	cELISA - ILT3 макака-резуса EC50 (нг/мл)	Kd Biacore (M) - ILT3_H	Kd Biacore (M) - ILT3_MM
LB181.52A8.1A1	Мышь	18,4	25	$8,55 \times 10^{-10}$	$1,3 \times 10^{-8}$
LB181.52B8.1B1	Мышь	15,5	23,2	$6,58 \times 10^{-10}$	$2,44 \times 10^{-8}$
LB182.11D1.1A1	Мышь	50,5	Не связывалось	$1,41 \times 10^{-08}$	Не связывалось
LB182.1G12.1B1	Мышь	39,2	Не связывалось	$1,69 \times 10^{-08}$	Не связывалось
LB184.16B1.1D2	Крыса	64,9	67,9	$9,57 \times 10^{-11}$	$2,59 \times 10^{-10}$
LB184.20E4.1E1.1D1	Крыса	2	18	$6,99 \times 10^{-9}$	$1,8 \times 10^{-8}$
LB184.24A4.1A1	Крыса	21,4	23,1	$2,05 \times 10^{-11}$	$1,26 \times 10^{-10}$
LB184.37C8.1A3.1B1	Крыса	7,7	9,5	$1,18 \times 10^{-11}$	$1,5 \times 10^{-10}$
LB184.40A6.1C1	Крыса	17,9	25,9	$1,79 \times 10^{-09}$	$9,46 \times 10^{-10}$
LB190.17H12.1A1	Крыса	139,2	Не связывалось	$5,92 \times 10^{-10}$	Не связывалось
H=человек MM=макака-резус (<i>Macaca mulatta</i>)					

В табл. 6 показаны аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи для mAb, полученных из вышеуказанных клонов.

Таблица 6

mAb No.	Описание	SEQ ID NO:	
		Варибельный домен тяжелой цепи	Варибельный домен легкой цепи
p52B8	Мышиное анти-ILT3 mAb 52B8 IgG2a/Каппа	15	16
p40A6	Крысиное анти-ILT3 mAb 40A6 IgG2a/Каппа	45	46
p16B1	Крысиное анти-ILT3 mAb 16B1 IgG2a/Каппа	53	54
p49C6	Мышиное анти-ILT3 mAb 49C6 IgG2a/Каппа	Не секвенировали	Не секвенировали
p11D1	Мышиное анти-ILT3 mAb 11D1 IgG2b/Каппа	61	62
p17H12	Крысиное анти-ILT3 mAb 17H12 IgG1/Каппа	69	70
p37C8	Крысиное анти-ILT3 mAb 37C8 IgG2a/Каппа	77	78
p1G12	Мышиное анти-ILT3 mAb 1G12 IgG2a/Каппа	85	86
p20E4	Крысиное анти-ILT3 mAb 20E4 IgG2a/Каппа	93	94
p24A4	Крысиное анти-ILT3 mAb 24A4 IgG2a/Каппа	101	102

Для направленного отбора главного антитела, антитела были дополнительно проанализированы и повторно оценены с помощью серии биофункциональных, биофизических и физико-химических анализов. И наконец, антитела были протестированы *in vivo* в биологическом исследовании для подтверждения регрессии опухоли у гуманизированных мышей, зараженных человеческой меланомой SKMEL5.

Пример 2.

Селективность различных анти-ILT3-антител.

Клеточный ELISA (cELISA) проводили для иллюстрации селективности различных родительских анти-ILT3 антител, представленных в табл. 5, и гуманизированного моноклонального анти-ILT3-антитела 9B1, раскрытого в патенте США № 7777008 как антитела, имеющего аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 (легкая цепь) и SEQ ID NO: 34 (тяжелая цепь).

Мышиные антитела против человеческого ILT3 тестировали на связывание с человеческим ILT3 и на перекрестную реактивность с ILT3 макака-резуса, с человеческим ILT5, с человеческим ILT7, с человеческим ILT8 и с человеческим ILT11, экспрессирующимися в клетках CHO-K1, с помощью ELISA в клеточном формате. Клетки CHO-K1 высевали в 96-луночные планшеты для культивирования ткани в 50 мкл DMEM/F12, 10% BCS и гентамицина (среда CHO-K1). Клетки высевали либо при плотности 2×10^4 клеток/лунку за два дня до анализа, либо при плотности 4×10^4 клеток/лунку за один день до анализа. Среду удаляли из лунок перед добавлением тестируемых образцов. Очищенное антитело серийно разводили в среде CHO-K1 и добавляли в планшеты с CHO-K1. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 30-60 мин и планшеты три раза промывали PBS/0,5% Твином-20 с использованием программы для промывки клеток на устройстве для промывки планшетов Biotek EL405×Select CW. Связывание детектировали с использованием ПХ-конъюгированного второго козьего антитела против мышиных IgG (Southern Biotech cat # 1031-05), добавленного при разведении 1:2000 в среде с CHO-K1, и инкубировали при комнатной температуре в течение 30-60 мин. Планшеты для анализа промывали, как описан выше, и проявляли ТМВ, а затем реакцию прекращали добавлением терминирующего раствора ТМВ (KPL cat # 50-85-06). Затем определяли оптическую плотность на 450-620 нм. Мышиный IgG1 (MIgG1) служил в качестве контроля.

Результаты представлены на фиг. 1A-1E. На этих фигурах показано, что репрезентативные антитела, происходящие от клонов p40B5, p49C6 и p52B8, были специфичными к ILT3 и перекрестно не реаги-

ровали или не связывались с ILT5, ILT7, ILT8 и ILT11. Антитела, происходящие от клонов p49C6 и p52B8, как и антитела от других клонов, были способны связываться с ILT3 макак-резуса. Клон p52B8 был выбран для характеристики *in vivo* исходя из (1) его высокой аффинности к человеческому ILT3, (2) отсутствия связывания с другими членами семейства ILT и (3) перекрестной реактивности с ILT3 макак-резуса.

Пример 3.

Последовательности переменного домена тяжелой цепи (V_H) и легкой цепи (V_L) родительского мышиноного 52B8 сравнивали с последовательностями зародышевой линии человека. Были выбраны человеческие каркасные последовательности, в высокой степени гомологичные каркасным последовательностям мышиноного антитела.

Мышиный домен V_H мышиноного клона mAb 52B8 против человеческого ILT3 давал высокую оценку по сравнению с человеческой тяжелой цепью зародышевой линии 3-07 в подгруппе III и JH4 для J-области. Исходя из структуры были введены две замены в каркасной области (R87K и A97G) для поддержания связывания, эквивалентного связыванию с родительским антителом. Мышиный домен V_L антитела давал высокую оценку по сравнению с человеческой легкой цепью зародышевой линии 1-02 в подгруппе I каппа. CDR мышиноного 52B8 были сконструированы на последовательности переменной области легкой цепи 1-02 и JK2 для J-области. Исходя из структуры было введено три замены в каркасной области (M4L, S64A и G72R).

Для получения гуманизированных вариантов гуманизированную последовательность V_H клонировали в вектор, кодирующий константный домен тяжелой цепи человеческого IgG4 S228P, а гуманизированный домен V_L клонировали в вектор, кодирующий константный домен легкой цепи каппа. Всего было получено два гуманизированных V_H (V_{H1} и V_{H2}) и восемь гуманизированных V_L . Анализ последовательности *in silico* и структурный анализ мышиноного 52B8 выявили шесть потенциальных "горячих точек" на молекуле: два потенциальных сайта окисления в V_H -CDR2 (M64) и в V_H -CDR3 (W101), один потенциальный сайт изомеризации в V_H -CDR2 (D62), один потенциальный сайт дезамидирования в V_L -CDR1 (N34), два потенциальных сайта изомеризации в V_L -CDR1 (D30) и V_L -CDR2 (D59). M64 был модифицирован до V64 или L64, который сохранял нужные физико-химические свойства и связывание/функциональность.

На фиг. 2A представлена таблица, иллюстрирующая характеристику данных по аффинности связывания, изоэлектрической точке, чистоте видов мономеров и по измерениям термостабильности для полученных гуманизированных вариантов. Анализ Biacore был проведен для измерения аффинности связывания, cIEF использовали для измерения pI, чистоту определяли с помощью ЭХ-ВЭЖХ, T_m и T_{gg} определяли с помощью NANO-DSFTM. На фиг. 2B показана взаимосвязь между ЭХ-чистотой и температурой плавления различных вариантов гуманизированной легкой цепи. Данные представлены в виде значений, полученных для каждого из восьми вариантов гуманизированной легкой цепи, которые указывали на то, что V_{L5} имеет самую высокую чистоту и термостабильность. На основании данных, представленных на фиг. 2A и 2B, V_{L5} отбирали для легкой цепи.

Начальные исследования были проведены на гуманизированной V_{H1} M64V/ V_{L5} , полученной в транзистентных клетках CHO. В условиях принудительного дезамидирования, включающих инкубирование при 50°C и создание высокого уровня pH-стресса, проводимые на неструктурированном гуманизированном V_{H1} M64V/ V_{L5} 52B8, было выявлено, что дезамидирование LC N34 в V_L -CDR1 (4,0 и 7,2% соответственно) и окисление W101 в HC-CDR3 при 1х световом стрессе составляло 15,4%. Замена N34 на Q34 сохраняла аффинность связывания с ILT3 человека и макак-резуса, как было оценено с помощью ППР-анализа Biacore, и функциональную активность, оцененную с помощью анализа на продуцирование TNF α дендритными клетками (ДК), однако замена остатка W101 приводила к значительной потере связывания, как было определено с помощью ППР-анализа Biacore.

В целом, гуманизированное 52B8 представляло собой анти-ILT3 mAb (52B8, V_{H1} , M64V/ V_{L5} , N34Q, IgG4 S228P/каппа), содержащее одну замену в каркасной области в V_L (M4L) и одну замену в каркасной области в V_H (A97G).

Пример 4.

Кинетику связывания и аффинность клонов антитела против человеческого ILT3 для His-меченого рекомбинантного белка ILT3 человека или макак-резуса измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы Biacore T200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Буфер HBS-EP+ (BR-1006-69) использовали в качестве рабочего буфера. Антитело против человеческого Fc (набор для захвата человеческого Fc, BR100839, GE Healthcare) иммобилизовали посредством химического связывания с амином во всех четырех проточных кюветах на сенсорном чипе CM5 серии S (BR100530 или 29149603, GE Healthcare) в соответствии с инструкциями производителя. Проточную кювету 1 использовали в качестве эталона для вычитания фона и не использовали для захвата. Антитела против человеческого ILT3, перечисленные выше (разведенные до 1 мкг/мл в буфере HBS-EP+), инъецировали на поверхности для захвата античеловеческого Fc в проточных кюветах 2, 3 и 4 при 10 мкл/мл в течение 10 с, что давало уровни захвата антител в пределах 60-70 RU в шести точках, а двукратные серийные

разведения белка ILT3-His человека или макак-резуса в пределах от 20 до 0,31 нМ и 0,0 (HBS-EP+) инъецировали в концентрации 50 мкл/мл по сравнению с эталонной поверхностью и поверхностью захваченного антитела в течение 180 с ассоциации, а затем 600 с диссоциации. После каждого цикла впрыска все четыре проточные кюветы регенерировали путем 30-секундного впрыска 3 М раствора $MgCl_2$ при скорости потока 10 мкл/мин. Сенсорограммы с вычитанием контроля были построены по данным Ленгмюровской модели связывания 1:1 с помощью компьютерной программы Biacore T200 (версия 2.0) для определения констант скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) и константы равновесной диссоциации $KD (=k_d/k_a)$.

В табл. 7 систематизированы данные кинетики связывания и аффинности связывания антител против человеческого ILT3 с рекомбинантным ILT3 человека или макак-резуса.

Таблица 7

mAb No.	Описание	cELISA - (человеческий ILT3-CHO) EC50 (мкг/мл)	cELISA - (ILT3-CHO макак-резуса) EC50 (мкг/мл)	KD Biacore (человеческого ILT3-His) (нМ)	KD Biacore (ILT3-His макак-резуса) (нМ)	Чистота по ЭХ (% главного пика)	pI
63	Мышиный VH химерного анти-ILT3 52B8/человеческий IgG4	0,064	0,091	0,46	9,5	95,9	н.о.

	(S228P): мышинный VL/человеческ ая каппа						
64	Мышиный VH M64V химерного анти-ILТ3 52B8/человече ский IgG4 (S228P): мышинный VL/человеческ ая каппа	0,075	0,096	0,44	9,2	95,3	н.о.
65	Мышиный VH M64L химерного анти-ILТ3 52B8/человече ский IgG4 (S228P): мышинный VL/человеческ ая каппа	0,086	0.137	0,41	9,3	93,5	н.о.
1	Гуманизованно е анти-ILТ3 mAb (52B8 VH1/VL1) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	0,99	25	93,1	н.о.
2	Гуманизованно е анти-ILТ3 mAb (52B8 VH1/VL2) IgG4 S228P/каппа	0,7	0,109	1,1	20	96,2	н.о.

3	Гуманизованно е анти-ILТ3 mAb (52B8 VH1/VL3) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	1,1	26	90	н.о.
4	Гуманизованно е анти-ILТ3 mAb (52B8 VH1/VL4) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	1,4	29	93,3	н.о.
5	Гуманизованно е анти-ILТ3 mAb (52B8 VH2/VL1) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	0,94	25	93,1	н.о.
6	Гуманизованно е анти-ILТ3 mAb (52B8 VH2/VL2) IgG4 S228P/каппа	0,1	0,118	1,1	21	96,6	н.о.
7	Гуманизованно е анти-ILТ3 mAb (52B8 VH2/VL3) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	0,96	26	89,6	6,3 3
8	Гуманизованно е анти-ILТ3 mAb (52B8 VH2/VL4) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	1,3	27	92,8	н.о.
9	Гуманизованно е анти-ILТ3 mAb (52B8 VH1	н.о.	н.о.	0,94	26	92,1	н.о.

	M64V/VL1) IgG4 S228P/каппа						
10	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL2) IgG4 S228P/каппа	0,085	0,148	1,1	22	95,1	н.о.
11	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL3) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	1,1	27	89,6	н.о.
12	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL4) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	1,5	29	92,4	н.о.
13	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH2 M64V/VL1) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	0,94	25	85,9	н.о.
14	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8	0,077	0,126	1	22	92,8	н.о.

	VH2 M64V/VL2) IgG4 S228P/каппа						
15	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH2 M64V/VL3) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	1	26	88,7	н.о.
16	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH2 M64V/VL4) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	1,4	29	93	н.о.
17	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64L/VL1) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	0,87	24	90,2	н.о.
18	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64L/VL2) IgG4 S228P/каппа	0,079	0,137	1	22	92,2	н.о.
19	Гуманизованно е анти-ILT3	н.о.	н.о.	0,99	26	87,4	н.о.

	mAb (52B8 VH1 M64L/VL3) IgG4 S228P/каппа						
20	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64L/VL4) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	1,3	29	90,8	н.о.
21	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH2 M64L/VL1) IgG4 S228P/каппа	0,079	0,112	0,88	27	91,2	н.о.
22	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH2 M64L/VL2) IgG4 S228P/каппа	0,057	0,081	0,97	21	96,8	н.о.
23	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH2 M64L/VL3) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	0,96	24	88,5	н.о.
24	Гуманизованно	н.о.	н.о.	1,2	27	91,9	н.о.

	е анти-ILT3 mAb (52B8 VH2 M64L/VL4) IgG4 S228P/каппа						
25	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL2) L234A L235A D265S) IgG1/каппа	н.о.	н.о.	0,74	8,7	94,9	7,7 6
26	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL5) L234A L235A D265S) IgG1/каппа	н.о.	н.о.	0,61	4,9	96,05	8,6 2
27	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL6) L234A L235A D265S) IgG1/каппа	н.о.	н.о.	0,92	10	90,17	8,8 4
28	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1	н.о.	н.о.	0,57	5,6	94,4	8,8

	M64V/VL7) L234A L235A D265S) IgG1/каппа						
29	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL8) L234A L235A D265S) IgG1/каппа	н.о.	н.о.	0,56	5,7	94,14	8,8 5
30	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	0,60	4,8	98,22	7,2 1
31	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL6) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	0,88	10	91,74	7,4 5
32	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL7) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	0,53	5,6	97,79	7,4 5
33	Гуманизованно	н.о.	н.о.	0,54	5,6	97,29	7,4

	е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL8) IgG4 S228P/каппа						5
34	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL2) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
35	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL2) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
36	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Q/VL2) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
37	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V W101F/VL2) L234A L235A D265S)	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

	IgG1/каппа						
38	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V W101Y/VL2) L234A L235A D265S) IgG1/каппа	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
39	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V W101Q/VL2) L234A L235A D265S) IgG1/каппа	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
40	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL2 S35A) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
41	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL2 S35N) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
42	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

	VH1 M64V/VL2 N34Q) IgG4 S228P/каппа						
43	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL2 N34D) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
44	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5 S35A) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	2,6	34	н.о.	н.о.
45	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5 S35N) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	4,7	НВ (без связыва ния)	н.о.	н.о.
46	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5 N34Q) IgG4 S228P/каппа	0,088	0,12	0,77	15	97,9	7,1
47	Гуманизованно е анти-ILT3	н.о.	н.о.	3,8	115	н.о.	н.о.

	mAb (52B8 VH1 M64V/VL5 N34D) IgG4 S228P/каппа						
48	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL5) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
49	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL5) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
50	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Q/VL5) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
51	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL5 S35A) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	NB (без связывания)	NB (без связыва ния)	н.о.	н.о.
52	Гуманизованно	н.о.	н.о.	NB (без	NB (без	н.о.	н.о.

	е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL5 S35N) IgG4 S228P/каппа			связывания)	связыва ния)		
53	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL5 N34Q) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	35	NB (без связыва ния)	н.о.	н.о.
54	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101F/VL5 N34D) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	NB (без связывания)	NB (без связыва ния)	н.о.	н.о.
55	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL5 S35A) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	NB (без связывания)	NB (без связыва ния)	н.о.	н.о.
56	Гуманизованно е анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL5 S35N) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	NB (без связывания)	NB (без связыва ния)	н.о.	н.о.

57	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL5 N34Q) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	NB (без связывания)	NB (без связывания)	н.о.	н.о.
58	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Y/VL5 N34D) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	NB (без связывания)	NB (без связывания)	н.о.	н.о.
59	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Q/VL5 S35A) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	NB (без связывания)	NB (без связывания)	н.о.	н.о.
60	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Q/VL5 S35N) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	NB (без связывания)	NB (без связывания)	н.о.	н.о.
61	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Q/VL5 N34Q) IgG4	н.о.	н.о.	NB (без связывания)	NB (без связывания)	н.о.	н.о.

	S228P/каппа						
62	Гуманизированное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V W101Q/VL5 N34D) IgG4 S228P/каппа	н.о.	н.о.	NB (без связывания)	NB (без связывания)	н.о.	н.о.
p52B8	Экстракт гибридомы клона 52B8	15,5	23,2	0,658	24,4	98	н.о.
p40A6	Экстракт гибридомы клона 40A6	17,9	25,9	0,713	0,995	н.о.	н.о.
p16B1	Экстракт гибридомы клона 16B1	н.о.	н.о.	0,096	0,259	98,1	н.о.
p49C6	Экстракт гибридомы клона 49C6 (не секвенировали)	13,8	19,8	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
p11D1	Экстракт гибридомы клона 11D1	50,46	2028	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
p17H12	Экстракт гибридомы клона 17H12	139,2	NB	н.о.	н.о.	95,7	н.о.
p37C8	Clone 37C8 Hybridoma extract	7,719	9,478	0,012	0,145	98,4	н.о.
p1G12	Экстракт гибридомы клона 1G12 t	39,2	NB	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
p20E4	Экстракт	1,992	18,04	6,99	18,2	98,5	н.о.
	гибридомы клона 20E4						
p24A4	Экстракт гибридомы клона 24A4	21,4	21,3	0,021	0,126	н.о.	н.о.

Пример 5.

Эпитопное картирование химерного мышиного V_H анти-ILT3 52B8/человеческого IgG4 (S228P): мышиного V_L/человеческой каппа ("c58B8"; mAb 73), связывающихся с человеческим ILT3 с помощью масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX)

Области контактирования антитела с внеклеточным доменом человеческого ILT3 определяли с помощью анализа методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS). HDX-MS позволяет определять включение дейтерия в амидный остов белка, и изменения в сайте такого включения, на которые влияет обработка растворителем в положении водорода. Сравнение уровней обмена дейтерия в образцах, содержащих только антиген, и в образцах, связанных с антителами, было проведено для идентификации областей внеклеточного домена ILT3, которые могут контактировать с антителом.

Внеклеточный домен человеческого ILT3 с С-концевой меткой His (человеческий ILT3-His) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Внеклеточный домен His-меченного человеческого ILT3-His предварительно инкубировали с анти-телом c58B8 (mAb 73), т.е. с мышинным V_H M64V химерного анти-ILT3 52B8/человеческого IgG4 (S228P):мышинного V_L/человеческой каппа, содержащим HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, и LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, перед инкубированием в дейтериевом буфере. Человеческий ILT3-His и антитело подвергали буферному обмену на PBS при pH 7,4 с использованием центрифужных колонок 3k MWCO. Человеческий ILT3-His (80 пмоль/мкл) смешивали с равным объемом антитела (40 пмоль/мкл) или, в качестве несвязанного контроля, с PBS при pH 7,4. Образцы, связанные с антителами, и несвязанный контроль инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа перед началом эксперимента по мечению.

Для мечения образцов дейтерием, 2 мкл образца смешивали с 25 мкл PBS в оксиде дейтерия, pH 7,6. Временные точки мечения составляли 30, 300, 3000, 6000 или 12000 с. По истечении установленного времени 25 мкл смеси для мечения добавляли к 30 мкл холодного буфера для гашения (8 М мочевины, 150 мМ TCEP). Гашеный образец инкубировали при 1,5°C в течение 2 мин. Затем 53 мкл впрыскивали в охлаждающую камеру колонки, где образец пропускали через колонку с пепсином/протеазой XIII, и полученные пептиды загружали в колонку для захвата. Через 3 мин запускали аналитический градиент и включали масс-спектрометр. Полностью дейтерированный образец получали путем инкубирования 2 мкл человеческого ILT3-His со 108 мкл дейтерированного денатурирующего буфера (4 М мочевины, 150 мМ TCEP в 99,5% оксида дейтерия). Образец инкубировали при 37°C в течение ночи. Затем 55 мкл непосредственно впрыскивали в камеру колонки и проводили сбор данных.

Данные ЖХ-МС/МС были получены для немеченого образца и проанализированы перед мечением дейтерием для подтверждения успешного расщепления белков и составления списка пептидов. Поиск в базе данных проводили с использованием программы Proteome Discoverer 1.4 и алгоритма поиска SEQUEST HT (ThermoFisher Scientific). Используемой базой данных белков является база данных последовательностей человеческого ILT3-His, объединенная с базой данных для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

После мечения, 55 мкл аликвот образца наносили на колонку NovaBioAssays с пепсином/протеазой XIII с последующей хроматографией на предохранительной колонке Waters CSH C18 Guard и аналитической колонке Waters CSH C18 1×50 мм в загрузочном буфере, содержащем 2% ацетонитрила, 0,1% TFA. Включение дейтерия во внеклеточный домен человеческого ILT3-His измеряли с помощью масс-спектрометрии. Буфер для гашения: 8М мочевины, 150 мМ TCEP; буфер для мечения: PBS, pH 7,6; контрольный буфер: PBS, pH 7,4. Масс-спектрометр представляет собой Thermo Scientific ORBITRAP-ELITE™. Для измерения образцов, меченных дейтерием, масс-спектрометр был настроен на получение данных общего сканирования МС на орбитальной ловушке с разрешающей способностью 120000, со счетчиком ионов мишеней IE6 и с максимальным временем инъекции ионов 500 мс. Для сбора данных МС/МС в целях идентификации пептидов масс-спектрометр был настроен на получение одного полного спектра сканирования при разрешающей способности 120000, с последующим анализом десяти спектров МС/МС, зависящих от данных, в ионной ловушке.

Используемая система жидкостной хроматографии представляла собой Waters NANOACQUITY® для аналитического колоночного градиента и изократического насоса Waters 515 для расщепления и загрузки образца. Для расщепления и загрузки образца в качестве буфера использовали 2% ацетонитрил и 0,1% трифторуксусную кислоту при скорости потока 100 мкл/мин. Для аналитического градиента буферы представляли собой буфер (А) 0,1% муравьиной кислоты в воде и буфер (В) 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Градиент составлял 40 мкл/мин от 2 до 36% В за 10 мин, с последующей промывкой 80% В в течение 1,5 мин и повторным уравниванием при 2% В в течение 3 мин. Затем колонку промывали путем циклического изменения градиента между 2 и 80% В, три раза по 1 мин для каждой стадии с последующим конечным уравниванием при 2% В в течение 5 мин. Колонка для захвата представляла собой предохранительную колонку Waters VANGUARD™ C18 BEH 1,7 мкм, а аналитическая колонка представляла собой колонку Waters C18 BEH300, 1,7 мкм, 1×50 мм.

Обработку образцов для мечения дейтерием проводили с использованием системы Leptec H/DX PAL™. Поддон для мечения образцов устанавливали на температуру 25°C, поддон для гашения устанавливали на 1,5°C, а ловушку и камеру в аналитической колонке устанавливали на 1,5°C. Колонку с иммобилизованным пепсином (колонку с пепсином/протеазой XIII NBA2014002, 2,1×30 мм, NovaBioAssay) держали за пределами камеры колонки при комнатной температуре.

Тепловая карта различий в мечении дейтерием для аминокислотных остатков человеческого ILT3-His, связанных с антителом, представлена на фиг. 3А. Масс-спектрометрия HDX показала, что раскрытое здесь антитело и антитела других семейств, которые перекрестно конкурируют с данным антителом, связываются с эпитопом, содержащим, или состоящим из нее, по меньшей мере одну аминокислоту в одном или более аминокислотных остатках 18-23 (ISWGNS; SEQ ID NO: 3), 64-69 (IPSMTE; SEQ ID NO: 4), 96-101 (MTGAYS; SEQ ID NO: 5), 124-131 (QSRSPMDT; SEQ ID NO: 6),

152-159 (AQQHQAEEF; SEQ ID NO: 7) и 184-187 (LLSH; SEQ ID NO: 8) ILT3. На фиг. 3В показаны первый вид и второй вид трехмерной модели поверхностной структуры внеклеточного домена человеческого ILT3 с указанными защищенными аминокислотными остатками. Эти защищенные аминокислотные остатки содержат расщепленный или несмежный эпитоп, который охватывает границу между доменами D1 и D2 внеклеточного домена. На фиг. 3С представлена ленточная диаграмма, иллюстрирующая расположение эпитопа на внеклеточном домене человеческого ILT3. Остатки, показанные черным цветом, были защищены от мечения антителом. Остатки белого цвета не обнаруживали каких-либо изменений в мечении, а для остатков темно-серого цвета данные не были получены. Различия в мечении дейтерием для каждого остатка усредняли и картировали по кристаллической структуре ILT3 (Cheng et al., "Crystal structure of leukocyte Ig-like receptor LILRB4 (ILT3/LIR-5/CD85k): a myeloid inhibitory receptor involved in immune tolerance", J. Biol. Chem. 286:18013-25 (2011)).

Подобные эксперименты по картированию с помощью HDX были предварительно проведены с использованием антител ZM4.1, DX439, DX446 и 9B11. Антитело ZM4.1 является коммерчески доступным и поставляется ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA или BioLegend, San Diego, CA. Антитела DX439 и DX446 были раскрыты в WO2018089300, а антитело 9B11 было раскрыто в патенте США No. 7777008. Из этих антител только антитело ZM4.1, как было обнаружено, связывалось с эпитопом, который частично перекрывался с эпитопом, связанным с антителами согласно изобретению, однако, экспериментальные исследования согласно изобретению показали, что антитело ZM4.1 не блокирует перекрестное связывание антител согласно изобретению. На фиг. 3D-3G показаны тепловые карты связывания антител ZM4.1, DX439, DX446 и 9B11 с человеческим ILT3.

Пример 6.

Фармакокинетика химерного мышиного V_H анти-ILT3 52B8/человеческого IgG4 (S228P):мышиного V_L /человеческой каппа ("c58B8"; mAb 73) у мышей NSG.

Фармакокинетику химерного мышиного V_H анти-ILT3 52B8/человеческого IgG4 (S228P):мышиного V_L /человеческой каппа ("c58B8"; mAb 73) оценивали у мышей NSG с моделью человеческого Panc08.13 и у мышей CD34⁺-NSG с моделью человеческой SK-MEL-5.

SK-MEL-5 представляет собой линию, происходящую от человеческой меланомы, которая может расти как подкожная опухоль. Panc08.13 представляет собой опухолевую линию, происходящую от человеческой карциномы поджелудочной железы. Было показано, что модель NSG с человеческой Panc08.13 является чувствительной к лечению пембролизумабом и ипилимумабом. Модель SK-MEL-5 имеет стойкий и разнообразный миелоидный инфильтрат в опухоли по сравнению с моделью Panc08.13. Обе эти модели продемонстрировали повышенный уровень экспрессии ILT3 на человеческих миелоидных CD14⁺-клетках в опухоли и в селезенке.

Для количественного определения антитела в плазме гуманизированных мышей проводили иммуноанализ на захват мишени на основе ЭХЛ. Этот анализ был проведен с использованием биотинилированного рекомбинантного ILT3 в качестве реагента для захвата и sulfoTAG-меченого мышиного анти-huIgG (Fc-специфического) антитела от Southern Biotech (cat # 1190-01) в качестве детектирующего реагента. Калибраторы и QC получали в чистой плазме C57BL/6 и 100-кратно разводили при тестировании на планшете. Этот анализ был проведен для качественной оценки, а анализ LLOQ был проведен при 40 нг/мл с MRD 100.

Мышам NSG с моделью человеческой Panc08.13 вводили 20 мг/кг антитела в присутствии и в отсутствие пембролизумаба (5 мг/кг) путем еженедельной IP-инъекции сначала трех доз и четвертой дозы через две недели после введения трех доз. Пробы крови брали до введения третьей дозы (C_{min}) и через 24 ч после введения третьей дозы (C_{max}). Были также взяты конечные пробы крови на 5 и 6 день после четвертой дозы. Мышам CD34⁺-NSG с моделью человеческой SK-MEL-5 вводили антитело в дозе 2 и 20 мг/кг еженедельно путем IP-инъекции. Пробы крови брали до введения третьей дозы (C_{min}) и через 24 ч после введения третьей дозы (C_{max}). Были также взяты конечные пробы крови на 3 и 7 день после третьей дозы. Концентрации свободного (несвязанного) антитела определяли с помощью анализа на захват антигена.

Фармакокинетические параметры получали исходя из исторических данных для антител IgG4 (введение ударной i.v.-дозы 1, 3, 10, 30 мг/кг гуманизированного антитела IgG4 мышам C57BL/6J) с использованием Phoenix NLME. ФК-профили исследуемой дозы антитела имитировали на основе полученных фармакокинетических параметров.

ФК-анализ исторических данных для антитела IgG4 показал линейную зависимость между AUC и исследуемой дозой (см. фиг. 4). Если допустить, что линейный ФК-профиль наблюдался для всех различных тестируемых доз c52B8, то не наблюдалось каких-либо различий между мышами различных видов в отношении быстрого поглощения и 100% биодоступности после IP-введения антитела, а поэтому, ФК-профили исследуемой дозы c52B8 имитировали на основе исторических данных для антитела IgG4. Результаты показали, что смоделированный профиль при 20 мг/кг у мышей NSG с моделью человеческой Panc08.13 и у мышей CD34⁺-NSG с моделью человеческой SK-MEL-5 соответствовал наблюдаемым концентрациям c52B8.

Пример 7.

Моноклональные анти-ILТ3-антитела активируют дендритные клетки и снижают супрессорную активность миелоидных клеток-супрессоров (MDSC).

Человеческие МКПК, выделенные из свежих лейкоцитов, замораживали, оттаивали и CD14⁺-моноциты очищали путем негативного отбора. Очищенные клетки культивировали в течение 5 дней с GM-CSF (1000 ед./мл) и IL4 (1000 ед./мл). Эти незрелые ДК затем снова культивировали в течение 42 ч с добавлением IL-10 (50 нг/мл) и LPS (1 мкг/мл) в присутствии или в отсутствии анти-ILТ3 антитела. TNFα измеряли в супернатанте культуры.

Эксперименты по титрованию показали, что с52В8 вызывал дозозависимое увеличение уровня секреции TNFα в культуральной среде при добавлении на стадии поляризации, тогда как контрольный IgG4 не обладал такой способностью (контроль представляет собой вариант коммерчески доступного антитела против RSV, торговый знак Synagis) (фиг. 5А). Концентрация антитела, необходимая для достижения полумаксимального увеличения уровней TNFα (EC₅₀), составляла приблизительно 1,9 нг/мл. Это значение не отличалось от значений для химерных вариантов, в которых V_H и V_L p58В8 были присоединены к Fc с каркасной областью человеческого IgG1 (mAb 78) или каркасной областью человеческого IgG1 с мутацией N297A (mAb 76). Эти данные показали, что в этом анализе связывание с Fc-рецептором не играет никакой роли в функциональной активности. Независимость от связывания с Fc-рецептором ограничивает вероятность того, что механизм активации в этом анализе будет заключаться в активации ДК посредством распознавания других ДК в культуре, "декорированных" антителом, и такой механизм будет представлять собой механизм, не ассоциированный с ILТ3.

На фиг. 5В и 5С показано, что не было обнаружено каких-либо значимых различий в функциональной активности между с52В8 (mAb 73) и гуманизированным анти-ILТ3 mAb (52В8 V_H1 M64V/V_L5 N34Q) IgG4 S228P/Каппа (mAb 46) у двух доноров. Как уже было показано, если антитело с52В8 было добавлено во время поляризации ДК, но не во время примирования Т-клеток, то ДК обладали лучшей способностью активировать Т-клетки для пролиферации, по аналогии с ДК, которые не были устойчивы к IL10. Если антитело с52В8 добавляли во время примирования Т-клеток, но не во время поляризации ДК, то Т-клетки обладали лучшей способностью реагировать на последующую повторную стимуляцию. После гуманизации варианты, которые сохраняли связывание, сравнимое с химерными вариантами, были протестированы в том же самом анализе, и было обнаружено, что они являются активными без каких-либо значимых различий. Эти данные показали, что результат, полученный с использованием с52В8, представляет собой репрезентативный результат, который был получен при использовании гуманизированного mAb 46.

Пример 8.

Анти-ILТ3 антитела снижают супрессорную активность миелоидных клеток-супрессоров (MDS).

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией или гипотезой, авторы лишь предполагают, что продуктивный Т-клеточный ответ на опухоль в некоторых случаях может быть ограничен присутствием незрелых и миелоидных клеток-супрессоров. Эти клетки экспрессируют ILТ3, и авторы предполагают, что ILТ3 действует как ингибирующий агент, сохраняющий незрелое состояние, характеризующееся низким уровнем экспрессии HLA-DR, продуцированием IL-10 и эффективной супрессией активации и пролиферации Т-клеток. Создание модели на основе совместного культивирования человеческих МКПК с опухолевыми клетками SKMEL5 *in vitro* с последующей очисткой MDSC и их тестированием на способность подавлять пролиферацию аутологичных CD8⁺-Т-клеток позволило исследовать этот аспект биологической функции ILТ3. В этом примере показано, что с52В8 и гуманизированное 52В8 (mAb 46) негативно влияет на приобретение (или поддержание) фенотипа, подавляющего Т-клетки.

Для получения MDSC, МКПК здорового человека культивировали с клетками SKMEL5 и 20 нг/мл GM-CSF в течение 7 дней. CD33⁺-клетки собирали путем позитивного отбора на магнитных сферах, покрытых антителом, а затем совместно культивировали в указанных соотношениях с очищенными аутологичными CD8⁺-Т-клетками в течение 3 дней в присутствии поликлонального стимулирующего антитела. Культуры включали с52В8 (mAb 73), гуманизированное 52В8 (mAb 46) или антитело контрольного изотипа (1 мкг/мл) на стадии совместного культивирования и на стадии подавления Т-клеток. Анализ на подавление Т-клеток проводили при отношении Т-клетки:MDSC = 4:1 и измеряли количество продуцируемого интерферона гамма (INFγ).

На фиг. 6А и 6В проиллюстрирована активность гуманизированного 52В8 и с52В8 в модели MDSC при соотношении Т-клетки:MDSC, где эффект этих антител был наиболее очевидным и показал, что антитела снижают супрессорную активность MDSC по сравнимому механизму. Эти данные также показали, что результат, полученный с использованием с52В8, представляет собой репрезентативный результат, который был получен при использовании гуманизированного mAb 46.

Пример 9.

Анти-ILТ3 антитело сС52В8 ингибирует рост опухолей SK-MEL-5 у мышей NSG с человеческой SK-MEL-5, несущих подкожные опухоли SK-MEL-5.

Системное введение с52В8 один раз в неделю мышам с укоренившимися подкожными опухолями

приводило к ингибированию роста опухоли (фиг. 7). Животных произвольно распределяли по группам обработки исходя из объема опухоли на 21-й день после имплантации, и этим животным подкожно вводили дозу 20 мг/кг c52B8 (mAb 73) или дозу контрольного изотипа один раз в неделю, начиная с 21-го дня. Данные, показанные на левой панели, представляют собой среднее $\pm$ ср. кв. ош. (девять на группу). Кривые роста опухоли у отдельных животных показаны справа. Масса тела снижалась в одинаковой степени как у контрольной группы, так и у группы с 52B8. Это исследование является репрезентативным для трех независимых экспериментов.

Степень ингибирования роста опухоли была последовательной и сходной в трех отдельных экспериментах и была очень похожа на эффект анти-ILT4 антитела. Ни один из других механизмов, протестированных до настоящего времени (например, для анти-PD-1 антитела, анти-ILT4 антитела, анти-CD27 антитела, анти-GITR антитела), не давал регрессию, что позволило авторам настоящего изобретения предположить, что задержка роста опухоли может служить основанием для создания этой модели. Эта модель явно отличается от мышинных сингенных моделей, обычно используемых в преклинических анализах на эффективность.

Пример 10.

Иммунная активация у мышей NSG с человеческой SK-MEL-5 после обработки антителом c52B8.

Для того чтобы понять иммунный механизм, который опосредует противоопухолевую эффективность, были проанализированы опухоль-инфильтрирующие иммунные клетки и были измерены уровни sHLA-G в крови. Мышей обрабатывали антителом c52B8 (2 и 20 мг/кг, i.p., QW). Дозы антител были выбраны на основе уровней C_{max} и C_{min} , обнаруженных на мини-ПК, и на основе моделирования, проводимого с использованием уже имеющихся данных. Пробы крови брали для анализа на ПК, sHLA-G и цитокины. Профили TIL были оценены с использованием CyTOF для одновременного детектирования 36 маркеров. Конечные образцы опухолей фиксировали и использовали для ИГХ-анализа человеческих CD3⁺-Т-клеток. 30% ингибирование роста опухоли наблюдалось у мышей, получавших 20 мг/кг 52B8. Однако статистически значимого различия не наблюдалось из-за большой вариабельности, ассоциированной с моделью гуманизированной опухоли. Невысокая противоопухолевая эффективность 52B8 была связана с умеренным снижением числа CD4⁺-CD127⁺-Т-клеток-супрессоров опухоли (21% против 14%) и снижением уровней sHLA-G в крови и повышением активации Т-клеток (интенсивности CD69, 14 против 23) в опухоли. Какого-либо изменения уровня цитокинов при обработке антителом c52B8 не наблюдалось, как показано на фиг. 8.

Пример 11.

Эффект анти-ILT3-антитела c52B8 в комбинации с пембролизумабом у мышей NSG с моделью человеческой Panc08.13 в отношении противоопухолевой эффективности и иммунной активации.

Анти-ILT3 антитело c52B8 оценивали у мышей NSG с моделью человеческой Panc08.13. 52B8, используемое в качестве единственного агента, показал минимальное влияние на ингибирование роста опухоли. Если 52B8 использовалось в комбинации с пембролизумабом, то одна из пяти групп (пять различных людей-доноров) гуманизированных мышей имела 50% ингибирование роста опухоли (TGI), и TGI ассоциировалось с повышением активации Т-клеток и продуцирования IFN γ и снижением уровня sHLA-G в крови, как показано на фиг. 9A-9D.

Пример 12.

Эффект анти-ILT3-антитела c52B8 в комбинации с пембролизумабом в анализе на подавление MDSC/Т-клеток.

Гуманизированное анти-ILT3 антитело 52B8 (mAb 46) в присутствии и в отсутствии пембролизумаба вызывало повышение активности Т-клеток в анализах на подавление MDSC/Т-клеток. Эффект был аддитивным, если mAb 46 использовалось в комбинации с пембролизумабом.

Для получения MDSC, МКПК здорового человека, взятые у конкретного донора, культивировали с клетками SKMEL5 и 20 нг/мл GM-CSF в течение 7 дней. Культуры обрабатывали 52B8 (1 мкг/мл) или антителом контрольного изотипа (1 мкг/мл). CD33⁺-клетки собирали с помощью магнитных микросфер, содержащих анти-CD33 антитело, и разделяли на колонке LS (Miltenyi Biotec, Germany), а затем совместно культивировали в указанных соотношениях с очищенными аутологичными CD8⁺-Т-клетками в течение 3 дней в присутствии поликлонального стимулирующего антитела. Аутологичные CD8⁺-Т-клетки выделяли из МКПК здорового человека путем негативного отбора на магнитных сферах, покрытых антителом (Stem Cell Technologies, Canada), после чего совместно культивировали в 96-луночных планшетах с миелоидными CD33⁺-клетками в отношении 8:1 (Т-клетки:MDSC) в течение 2 дней. Культуры включали гуманизированное 52B8 (mAb 46) или антитело контрольного изотипа (IgG4) (1 мкг/мл) отдельно или в комбинации с пембролизумабом (2 мкг/мл) на стадиях совместного культивирования и подавления Т-клеток. Общая концентрация антител при каждой обработке была доведена до 3 мкг/мл путем добавления антитела контрольного изотипа. Пролиферация Т-клеток была индуцирована сферами, содержащими поликлональное стимулирующее анти-CD3/CD28 антитело и IL2. Уровни IFN γ определяли в супернатантах культуры с помощью ELISA MSD (Mesoscale Discovery, MD). Анализ на подавление Т-клеток проводили в отношении Т-клетки:MDSC = 4:1 или 8:1 и измеряли количество про-

дуцируемого интерферона-гамма (IFN γ). Результаты представлены на фиг. 10-14.

На фиг. 10 показано, что гуманизированное анти-ILТ3 антитело 52В8 (mAb 46) снижает супрессорную активность MDSC до степени, сравнимой с активностью химерного анти-ILТ3-антитела c52В8 (mAb 73; партия 26AVY) в анализах на подавление MDSC/Т-клеток с использованием MDSC, полученных из МКПК от двух различных людей-доноров (D00100385 и D001003507 соответственно).

Как показано на фиг. 11-14, гуманизированное анти-ILТ3 антитело 52В8 (mAb 46) в комбинации с пембролизумабом снижало степень MDSC-ингибирования активации Т-клеток на более высоком уровне по сравнению с уровнем, достигаемым в анализе только на подавление MDSC/Т-клеток (а) в отношении Т-клеток:MDSC = 4:1 или 8:1 с использованием MDSC, полученных из МКПК человека-донора D001003835 (фиг. 11); (б) в отношении Т-клеток:MDSC = 4:1 или 8:1 с использованием MDSC, полученных из МКПК человека-донора D001003180 (фиг. 12); (с) в отношении Т-клеток:MDSC = 4:1 или 8:1 с использованием MDSC, полученных из МКПК человека-донора D001003507 (фиг. 13); и в отношении Т-клеток:MDSC = 8:1 с использованием MDSC, полученных из МКПК человека-донора (фиг. 14). Результаты систематизированы в табл. 8 и 9. Как показано на фиг. 10-13 и в табл. 8 и 9, объединение анти-ILТ3-антитела 52В8 с пембролизумабом приводило к аддитивному эффекту увеличения уровня активации Т-клеток по сравнению с эффектом, достигаемым с использованием только пембролизумаба или только 52В8. Как уже было показано, увеличение уровня IFN γ в случае комбинации по сравнению с другими обработками варьировалось от 41 до 74%. Эти результаты показали, что комбинация пембролизумаба с 52В8 не приводит к избыточному или неконтролируемому повышению уровня активации Т-клеток.

Таблица 8

Систематизированные данные для комбинации гуманизированного анти-ILТ3-антитела 52В8 и пембролизумаба

Донор	Отношение Т-клетки: MDSC	Среднее средних $\pm$ ср. кв. ош.				
		Только Т-клетки	Т-клетка+MDSC			
			hIgG4+hIgG4	hIgG4 + пембролизумаб	hIgG4+52В8	52В8+ пембролизумаб
D001003835	4:1	19439 $\pm$ 4191	3667 $\pm$ 795	4676 $\pm$ 1162	6380 $\pm$ 1187	10438 $\pm$ 1132
	8:1	32644 $\pm$ 4146	17386 $\pm$ 1628	20556 $\pm$ 5028	28280 $\pm$ 4643	38163 $\pm$ 7817
D001003180	4:1	38166 $\pm$ 7574	1482 $\pm$ 646	1781 $\pm$ 295	3983 $\pm$ 1528	3606 $\pm$ 1864
	8:1	33250 $\pm$ 6021	6823 $\pm$ 2107	6768 $\pm$ 1287	9532 $\pm$ 3025	14896 $\pm$ 2932
D001003507	4:1	56836 $\pm$ 5777	7364 $\pm$ 2977	8111 $\pm$ 5220	12202 $\pm$ 3221	18422 $\pm$ 4135
	8:1	55376 $\pm$ 6310	23417 $\pm$ 8640	23981 $\pm$ 3135	26204 $\pm$ 3075	36992 $\pm$ 1856
D001003428	8:1	159127 $\pm$ 10552	81071 $\pm$ 13458	87413 $\pm$ 15061	98902 $\pm$ 8994	123920 $\pm$ 22448

Таблица 9

Комбинация антитела 52В8 + пембролизумаб - отношение Т-клетка:MDSC (8:1)

Условия	Отношения GM	95% ДП	P-величина
(52В8+пембролизумаб)/IgG4	1,84	1,35, 2,53	0,0043

(52B8+пембролизумаб)/ пембролизумаб	1,73	1,26, 2,36	0,0057
(52B8+пембролизумаб)/52B8	1,39	1,20, 1,61	0,0028
p-величины были получены с помощью односторонних парных t-критериев для сравнения комбинации 52B8+пембролизумаб с каждой из других групп с использованием логарифмов величин IFN γ . GM=геометрическое среднее			

Пример 13.

Эффект анти-ILТ3-антитела 52B8 в комбинации с пембролизумабом в смешанной лимфоцитарной реакции поляризованных IL-10-ДК и аллогенных CD8⁺-Т-клеток.

В этом примере проводили смешанную лимфоцитарную реакцию IL-10-поляризованных дендритных клеток, происходящих от человеческих моноцитов и аллогенных CD8⁺-Т-клеток, инкубированных в течение 4 дней, с последующим измерением уровня интерферона-гамма (IFN γ) в супернатанте культуры как результата анализа на активацию Т-клеток. В этом эксперименте активности пембролизумаба, 52B8 или их комбинации этих двух компонентов сравнивали с активностью антитела контрольного изотипа (IgG4 в обоих случаях) у девяти пар аллогенных доноров.

Происходящие от моноцитов дендритные клетки (ДК), т.е. IL10-ДК, взятые от трех доноров с CD14⁺-моноцитами, дифференцировали в течение 7 дней (в присутствии гранулоцитарного-макрофагального колониестимулирующего фактора (GMCSF)) и в присутствии IL4 в течение 5 дней, а затем в течение 2 дней в присутствии IL10 и в присутствии и отсутствии IgG4 (партия 92ASJ), и в присутствии и отсутствии 52B8 (партия 41BAB) в концентрации 1 мкг/мл с получением DC129, DC226 и DC196. CD8⁺-клетки выделяли у трех доноров и проводили смешанные лейкоцитарные реакции (MLR) в отношении ДК:Т-клетка 1:5 от трех доноров в 96-луночной планшете (30к ДК и 150к CD8⁺-Т-клеток), где клетки обрабатывали в присутствии и отсутствии IgG4 (партия 92 ASJ) и в присутствии и отсутствии пембролизумаба (партия 42ASN) в концентрации 2 мкг/мл. IgG4 или 52B8 также добавляли снова в MLR в концентрации 1 мкг/мл. Было получено девять пар MLR с IL10-ДК:CD8⁺-Т-клетками:

DC129 против T30, T3788 и T3259,

DC226 против T30, T3788 и T3259,

DC196 против T30, T3788 и T3259.

Супернатант IFN γ собирали на четвертый день и количественно оценивали с использованием Meso Scale Discovery (MSD). Дополнительную фракцию супернатанта собирали на пятый день, после чего клетки собирали и окрашивали на экспрессию PD1 и PDL1. Окрашивание дендритных клеток проводили на седьмой день дифференцировки (непосредственно перед запуском MLR). Окрашивание Т-клеток на наличие CD8⁺-Т-клеток проводили на пятый день с помощью анализа MLR.

На фиг. 15 показаны результаты для всех пар доноров, объединенные на одном чертеже (каждая метка соответствует паре доноров). Как уже было показано, 52B8 в комбинации с пембролизумабом устранили толерантность Т-клеток, что приводило к статистически значимому повышению активации CD8⁺-Т-клеток.

Таблица последовательностей

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Внеклеточный домен человеческого ILT3 (LILRB4) с C-концевой His-меткой; эпитопные домены показаны жирным шрифтом	QAGPLPKPTLWAEPGSV ISWGNS VTIWCQGTLEAREYRLD KEESPAPWDRQNPLEPKNKARF SIPSMTE DYAGRYRCYYR SPVGWSQPSDPLEL VMTGAYS KPTLSALPSPLVTS GKSVTL LC QSRSPMDT FLLIKERAAHPLLHLRSEHGA AQQHQA EFPM SPVTSVHGGTYRCFSSHGFSHYLL SH PSDPLELIVSGSLEDP RPSPTRSVSTAAGPEDQPLMPTGSPHSGLRRHWEHHHHH HHH
2	Внеклеточный домен ILT3 <i>Macaca mulatta</i> (макак-резуса) (LILRB4) (последовательно от GenBank NP 001035766)	QAGPLPKPTIWAEPGSVISWGSPVTIWCQGTLDQEYYLDK EGSPAPWDTQNPLEPRNKAKFSIPSMTQHYAGRYRCYYHS HPDWSESDPLDLVMTGAYSKPILSVLPSPLVTSGESVTLLC QSQSPMDTFLLFKEGAHPLPRLRSQHGAQLHWAFFPMGP VTSVHGGTYRCISSRSFSHYLLSRPSDPVELTVLGSLESPSPS PTRSISAAGPEDQSLMPTGSDPQSGLRRHWE
3	Пептид A человеческого ILT3	ISWGNS
4	Пептид B человеческого ILT3	IPSMTE
5	Пептид C человеческого ILT3	MTGAYS
6	Пептид D человеческого ILT3	QSRSPMDT
7	Пептид E человеческого ILT3	AQQHQA
8	Пептид F человеческого ILT3	LLSH
9	Константный домен HC человеческого IgG4 (S228P; показан жирным)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTYPSSSLGKTYTCNVDPK SNTKVDKRVESKYGPPCP PC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPETVTCVVVDV SQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTIVLH QD WLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKA

	шрифтом)	<i>KGQPREQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SYMHEALHNHYTQKSLSLGLG</i>
10	Константный домен HC человеческого IgG4 (S228P; показан жирным шрифтом) (не содержит C-концевого K (далее обозначен «K-»))	<i>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPETCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SYMHEALHNHYTQKSLSLGLG</i>
11	Константный домен HC человеческого IgG1	<i>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGQTYYTCNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>
12	Константный домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S, показаны жирным шрифтом)	<i>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGQTYYTCNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPETCVVVSVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT SKAKGQPREQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>
13	Константный домен HC человеческого IgG1 (K-) (L234A, L235A, D265S; показаны жирным шрифтом)	<i>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGQTYYTCNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPETCVVVSVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT SKAKGQPREQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>
14	Константный домен человеческой LC каппа	<i>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i>
15	Вариабельный домен родительской HC анти-ILT3 52B8	<i>EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQT PDRRLEWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDNANKNTLYL QMSSLKSEDTAMYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTSTV VSS</i>
16	Вариабельный домен родительской LC анти-ILT3 52B8	<i>NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLTSNLDGVPARFSGSGSRDTDFALTIDPVE ADDAATYYCQQNNEDPYTFGGGTGLEIK</i>
17	52B8 HC-CDR1	NYGMS
18	52B8 HC-CDR2 (где Xaa15	TISGGGDYTNYPDSXRG

	представляет собой M, V, или L)	
19	52B8 HC-CDR2 M	TISGGGDYTNYPDSMRG
20	52B8 HC-CDR2 V	TISGGGDYTNYPDSVRG
21	52B8 HC-CDR2 L	TISGGGDYTNYPDSLGR
22	52B8 HC-CDR3 (где Хаа3 представляет собой W, Y, Q или F)	RLXFRSLYYAMDY
23	52B8 HC-CDR3	RLWFRSLYYAMDY
24	52B8 HC-CDR3	RLYFRSLYYAMDY
25	52B8 HC-CDR3	RLQFRSLYYAMDY
26	52B8 HC-CDR3	RLFFRSLYYAMDY
27	52B8 LC-CDR1 (где Хаа11 представляет собой N, D, или Q и Хаа12 представляет собой S, N, или A)	RASEKVDSFGXXFMH
28	52B8 LC-CDR1 N (где Хаа12 представляет собой S, N, или A)	RASEKVDSFGNXFMH
29	52B8 LC-CDR1 D (где Хаа12 представляет собой S, N, или A)	RASEKVDSFGDXFMH
30	52B8 LC-CDR1 Q (где Хаа12 представляет собой S, N, или A)	RASEKVDSFGQXFMH
31	52B8 LC-CDR1 S (где Хаа11 представляет собой N, D, или Q)	RASEKVDSFGXSFMH
32	52B8 LC-CDR1 N (где Хаа11 представляет собой N, D, или Q)	RASEKVDSFGXNFMH
33	52B8 LC-CDR1 A (где Хаа11 представляет собой S, N, или A)	RASEKVDSFGXAFMH

	собою N, D, или Q)	
34	52B8 LC-CDR1 (NN)	RASEKVDSFGNNFMH
35	52B8 LC-CDR1 (DN)	RASEKVDSFGDNFMH
36	52B8 LC-CDR1 (QN)	RASEKVDSFGQNFMH
37	52B8 LC-CDR1 (NS)	RASEKVDSFGNSFMH
38	52B8 LC-CDR1 (DS)	RASEKVDSFGDSFMH
39	52B8 LC-CDR1 (NA)	RASEKVDSFGNAFMH
40	52B8 LC-CDR1 (DA)	RASEKVDSFGDAFMH
41	52B8 LC-CDR1 (QS)	RASEKVDSFGQSFMH
42	52B8 LC-CDR1 (AF)	RASEKVDSFGQAFMH
43	52B8 LC-CDR2	LTSNLDS
44	52B8 LC-CDR3	QQNNEDPYT
45	Вариабельный домен родительской HC анти-ILT3 40A6	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYSINWVRQSSG KGPEWMGRFWYDEGIAYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLKM NSLRTGDTGTYYCTRDRDTVGITGWFAYWGQGLTVTVSS
46	Вариабельный домен родительской LC анти-ILT3 40A6	ETVMTQSPTSLSASIGERVTLNCKASQSVGVNVDWYQQTP GQSPKLLIYGGSANRHTGVPDRFTGSGFGSDFTLTISDVEPED LGVYYCLQYGSVPYTFGAGTKLELK
47	40A6 HC-CDR1	SYSIN
48	40A6 HC-CDR2	RFWYDEGIAYNLTLES
49	40A6 HC-CDR3	DRDTVGITGWFAY
50	40A6 LC-CDR1	KASQSVGVNVD
51	40A6 LC-CDR2	GSANRHT
52	40A6 LC-CDR3	LQYGSVPYT
53	Вариабельный домен родительской HC анти-ILT3 16B1	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTNYCVNWVRQPS GKGPEWLGRFWFDEGKAYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLR MNSLRADDTGTYYCTRDRDTVGITGWFAYWGQGLTVTVS S
54	Вариабельный домен родительской LC анти-ILT3 16B1	ETVMTQSPTSLSASIGERVTLNCKASQSVGINVDWYQQTPG QSPKLLIYGGSANRHTGVPDRFTGSGFGSDFTLTISNVEPEDL GVYYCLQYGSVPYTFGPGTKLELK
55	16B1 HC-CDR1	NYCVN
56	16B1 HC-CDR2	RFWFDEGKAYNLTLES
57	16B1 HC-CDR3	DRDTVGITGWFAY
58	16B1 LC-CDR1	KASQSVGINVD
59	16B1 LC-CDR2	GSANRHT
60	16B1 LC-CDR3	LQYGSVPYT
61	Вариабельный	QVQLQQSGAELMKPGASVKISKATGYTFRTYWIEWVKQR

	домен родительской HC анти-ILT3 11D1	PGHGLEWIGEILPGNGNTHFNENFKDKATFTADTSSNAAYM QLSSLTSEDSAVYYCVRRRLGRGPFDFWQGQTTLTVSS
62	Вариабельный домен родительской LC анти-ILT3 11D1	DIQMTQSPSSLSVSLGGKVTITCKASQDINEYIGWYQRKPGK GPRLLIHYTSTLQSGIPSRFSGSGSGRDYSLISNLEPEDIATY YCLQYANPLPTFGGGTKLEIK
63	11D1 HC-CDR1	TYWIE
64	11D1 HC-CDR2	EILPGNGNTHFNENFKD
65	11D1 HC-CDR3	RRLGRGPFDF
66	11D1 LC-CDR1	KASQDINEYIG
67	11D1 LC-CDR2	YTSTLQS
68	11D1 LC-CDR3	LQYANPLPT
69	Вариабельный домен родительской HC анти-ILT3 17H12	EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAASGFTFSNFDMAWVRQ APTRGLEWVSSITYDGGSTSYRDSVKGRFTISRDNAGTLY LQMDSLRSEDATYYCTTVESIATISTYFDYWGQGVMTVS S
70	Вариабельный домен родительской LC анти-ILT3 17H12	DIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVSMSRYDLIHWWYQQ KPGQQPKLLIFRASDLASGIPARFSGSGSGTDFLTINPVQAD DIATYYCQQTRKSPPTFGGGTRLELK
71	17H12 HC-CDR1	NFDMA
72	17H12 HC-CDR2	SITYDGGSTSYRDSVKG
73	17H12 HC-CDR3	VESIATISTYFDY
74	17H12 LC-CDR1	RASQSVSMSRYDLIH
75	17H12 LC-CDR2	RASDLAS
76	17H12 LC-CDR3	QQTRKSPPT
77	Вариабельный домен родительской HC анти-ILT3 37C8	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYCVNWVRQPS GKGPEWLGRFWYDEGKVYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLK MNRLRTDDTGTYCTRDRDTMGITGWFAFWGQGTTLTVS S
78	Вариабельный домен родительской LC анти-ILT3 37C8	ETVMTQSPTSLASIGERVTLNCKASQSVGINVDWYQQTPG QSPKLLIYGSA NRHTGVPDRFTGSGFGSGFTLTISNVEPEDL GVYYCLQYGSVPYTFGPGTKLELK
79	37C8 HC-CDR1	SYCVN
80	37C8 HC-CDR2	RFWYDEGKVYNLTLES
81	37C8 HC-CDR3	DRDTMGITGWFAF
82	37C8 LC-CDR1	KASQSVGINVD
83	37C8 LC-CDR2	GSANRHT
84	37C8 LC-CDR3	LQYGSVPYT
85	Вариабельный домен родительской HC анти-ILT3 1G12	QVQMQQSGTELMKPGASMKISKATGYTFSTYWIQWIKQR PGHGLEWIGEILPGSGTTNYNENFKGKATFSADTSSNTAYIH LSSLTSEDSAVFYCARRLGRGPFDFWQGQTTLTVSS
86	Вариабельный домен родительской LC анти-ILT3 1G12	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCEASQDINKHIDWYQHQPGR GPSLLIHYASILQPGIPSRFSGSGSGRDYFSITSLEPEDIATYY CLQYDNLLPTFGGGTKLEIK
87	1G12 HC-CDR1	TYWIQ
88	1G12 HC-CDR2	EILPGSGTTNYNENFKG

89	1G12 HC-CDR3	RLGRGPFDDY
90	1G12 LC-CDR1	EASQDINKHID
91	1G12 LC-CDR2	YASILQP
92	1G12 LC-CDR3	LQYDNLPT
93	Вариабельный домен родительской HC анти-ILT3 20E4	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYSVNWVRQPS GKGLEWMGRFWYDGGTAYNSTLESRLSISGDTSKNQVFLK MNSLQTDDTGTYICTRDRDTMGITGWFAYWGQGTLLTVS P
94	Вариабельный домен родительской LC анти-ILT3 20E4	ETVMTQSPTSLASIGERVTLNCKASQSVGVNVDWYQQTP GQSPKLLIYGSANRHTGVPDRFTGSGFGSDFTLTISNVEPED LGVYYCLOYGSPYPTFGAGTKLELK
95	20E4 HC-CDR1	SYSVN
96	20E4 HC-CDR2	RFWYDGGTAYNSTLES
97	20E4 HC-CDR3	DRDTMGITGWFAY
98	20E4 LC-CDR1	KASQSVGVNVD
99	20E4 LC-CDR2	GSANRHT
100	20E4 LC-CDR3	LQYGSVPYT
101	Вариабельный домен родительской HC анти-ILT3 24A4	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYCVNWVRQPS GKGPEWLGRFWYDEGKVYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLK MNRLRTDDTGTYICTRDRDTLGITGWFAYWGQGTLLTVS S
102	Вариабельный домен родительской HC анти-ILT3 24A4	ETVMTQSPTSLASIGERVTLNCKASQSVGINVDWYQQTPG QSPKLLIYGSANRHTGVPDRFTGSGFGSGFTLTISNVEPEDL GVYYCLOYGSPYPTFGPGTKLELK
103	24A4 HC-CDR1	SYCVN
104	24A4 HC-CDR2	RFWYDEGKVYNLTLES
105	24A4 HC-CDR3	DRDTLGITGWFAY
106	24A4 LC-CDR1	KASQSVGINVD
107	24A4 LC-CDR2	GSANRHT
108	24A4 LC-CDR3	LQYGSVPYT
109	Лидерная последовательность А	MEWSWVFLFSLVTTGVHS
110	Лидерная последовательность В	MSVPTQVLGLLLLWLT DARC
111	Родительская HC мышиногo анти-ILT3 p52B8:тяжелая цепь мышиногo IgG2a	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYGMSWVRQT PDRRLWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDNKNTLYL QMSSLKSEDTAMYYCGRRWFRLYYAMDYWGQGTSTV VSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVT LTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNVANPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPS VFIFPPKIKDVLMIPLSVITCVVVDVSEDDPDVQISWVFN VEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKC KVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDMPEDYVETWNNGKTELNYKNTEPVLDSG SYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFS RTPGK
112	Родительская LC	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEKVD SFGNSFMHWYQ

	мышинного анти-ILT3 p52B8:мышинная легкая цепь каппа	QKPGQPPKLLIYLTSLNLD SGVPARFSGSGSRTDFALTIDPVE ADDAATYYCQQNNEDPYTFGGG TKLEIKRADAAPT VSI FPP SSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDG SERQNGVLN SWTDQD SKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFN RNEC
113	Родительский VH химерного мышинного анти-ILT3 52B8/человеческий IgG4 (S228P)	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQT PDRRLEWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDN AKNTLYL QMSSLKSEDTAMYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGT SVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLK
114	VH M64V химерного мышинного анти-ILT3 52B8/человеческий IgG4 (S228P)	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQT PDRRLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDN AKNTLYL QMSSLKSEDTAMYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGT SVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLK
115	VH M64L мышинного анти-ILT3 52B8/человеческий IgG4 (S228P)	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQT PDRRLEWVATISGGGDYTNYPDSLGRFTISRDN AKNTLYL QMSSLKSEDTAMYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGT SVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLK
116	Родительский VL химерного мышинного анти-ILT3 52B8/человеческая каппа	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEKVDSFGNSFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLTSLNLD SGVPARFSGSGSRTDFALTIDPVE ADDAATYYCQQNNEDPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQD SKDSTYSLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
117	Вариабельный домен VH1 HC гуманизованного 52B8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDN AKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGT LV TVSS
118	Вариабельный домен VH1 HC гуманизованного 52B8 (M64V)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDN AKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGT LV TVSS

119	Вариабельный домен VH1 HC гуманизованного 52B8 (M64L)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SNYGMSWVRQA</u> PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSL <u>RGRFTISR</u> DNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRL <u>WFRSLYYAMDYWGQ</u> GLTVT VSS
120	Вариабельный домен VH1 HC гуманизованного 52B8 (M64V, W101F)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SNYGMSWVRQA</u> PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVR <u>GRFTISR</u> DNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRL <u>FFRSLYYAMDYWGQ</u> GLTVT SS
121	Вариабельный домен VH1 HC гуманизованного 52B8 (M64V, W101Y)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SNYGMSWVRQA</u> PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVR <u>GRFTISR</u> DNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRL <u>YFRSLYYAMDYWGQ</u> GLTVT SS
122	Вариабельный домен VH1 HC гуманизованного 52B8 (M64V, W101Q)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SNYGMSWVRQA</u> PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVR <u>GRFTISR</u> DNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRL <u>QFRSLYYAMDYWGQ</u> GLTVT SS
123	Вариабельный домен VH2 HC гуманизованного 52B8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SNYGMSWVRQA</u> PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSMR <u>GRFTISR</u> DNAKNSLY LQMNSLKAEDTAVYYCGRRL <u>WFRSLYYAMDYWGQ</u> GLTV TVSS
124	Вариабельный домен VH2 HC гуманизованного 52B8 (M64V)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SNYGMSWVRQA</u> PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVR <u>GRFTISR</u> DNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCGRRL <u>WFRSLYYAMDYWGQ</u> GLTVT VSS
125	Вариабельный домен VH1 HC гуманизованного 52B8 (M64L)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SNYGMSWVRQA</u> PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSL <u>RGRFTISR</u> DNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCGRRL <u>WFRSLYYAMDYWGQ</u> GLTVT VSS
126	Вариабельный домен VL1 LC гуманизованного 52B8	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSFGNSFMH <u>WYQ</u> QKPGQPPLLIYLT <u>SNLDSGVPDR</u> FSGSGSRTDFTLTISLQA EDVAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
127	Humanized Вариабельный домен VL2 LC гуманизованного 52B8	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSFGNSFMH <u>WYQ</u> QKPGQPPLLIYLT <u>SNLDSGVPDR</u> FSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
128	Вариабельный домен VL3 LC гуманизованного	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASEKVDSFGNSFMH <u>WYQ</u> QKPGQAPRLLIYLT <u>SNLDSGVPAR</u> FSGSGSRTDFTLTISLLEP EDFVAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK

	52B8	
129	Вариабельный домен VL4 LC гуманизованного 52B8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ QKPGQAPRLLIYLTSLNLD SGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPE DFAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
130	Вариабельный домен VL5 LC гуманизованного 52B8	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLTSLNLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
131	Вариабельный домен VL6 LC гуманизованного 52B8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLTSLNLD SGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQP EDFATYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
132	Вариабельный домен VL7 LC гуманизованного 52B8	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLTSLNLD SGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQP EDFATYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
133	Вариабельный домен VL8 LC гуманизованного 52B8	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLTSLNLD SGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQP EDFATYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
134	Вариабельный домен VL2 LC гуманизованного 52B8 (S35A)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSEFGNAFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLTSLNLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
135	Вариабельный домен VL2 LC гуманизованного 52B8 (S35N)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSEFGNNFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLTSLNLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
136	Вариабельный домен VL2 LC гуманизованного 52B8 (N34Q)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSEFGQSFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLTSLNLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
137	Вариабельный домен VL2 LC гуманизованного 52B8 (N34D)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSEFGDSFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLTSLNLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
138	Вариабельный домен VL5 LC гуманизованного 52B8 (S35A)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSEFGNAFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLTSLNLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
139	Вариабельный домен VL5 LC гуманизованного 52B8 (S35N)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSEFGNNFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLTSLNLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIK
140	Вариабельный домен VL5 LC гуманизованного	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSEFGQSFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLTSLNLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP

	52B8 (N34Q)	EDFATYYCQONNEDPYTFGQGTKLEIK
141	Вариабельный домен VL5 LC гуманизованного 52B8 (N34D)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASEKVDSEFGDSFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLTSLNLDGVSFRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQONNEDPYTFGQGTKLEIK
142	Вариабельный домен VH1 HC гуманизованного 52B8 /константный домен человеческого IgG4 (S228P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKITYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLK
143	Вариабельный домен VH1 (M64V) HC гуманизованного 52B8 /константный домен человеческого IgG4 (S228P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKITYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLK
144	Вариабельный домен VH1 (M64L) HC гуманизованного 52B8 /константный домен человеческого IgG4 (S228P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSLGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKITYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

		WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
145	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101F) HC гуманизованного 52B8 /константный домен человеческого IgG4 (S228P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLFFRSLYYAMDYWGQGTLLTVV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTITYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
146	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101Y) HC гуманизованного 52B8 /константный домен человеческого IgG4 (S228P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLYFRSLYYAMDYWGQGTLLTVV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTITYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
147	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101Q) HC гуманизованного 52B8 /константный домен человеческого IgG4 (S228P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLQFRSLYYAMDYWGQGTLLTVV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTITYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

148	Вариабельный домен VH2 HC гуманизованного 52B8 /константный домен человеческого IgG4 (S228P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLKAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKITYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLK
149	Вариабельный домен VH2 (M64V) HC гуманизованного 52B8 /константный домен человеческого IgG4 (S228P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKITYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLK
150	Вариабельный домен VH2 (M64L) HC гуманизованного 52B8 /константный домен человеческого IgG4 (S228P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSLGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKITYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLK
151	Вариабельный домен VL1 LC гуманизованного	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSFGNSFMHWYQ QKPGQPPELLIYLTSLNLD SGVPDRFSGSGSRDTFTLTISLQA

	52B8 /константный домен каппа	EDVAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
152	Вариабельный домен VL2 LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLTSNLDSEGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
153	Вариабельный домен VL3 LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ QKPGQAPRLLIYLTSLNLDSEGVPARFSGSGSRTDFTLTISLLEP EDFAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
154	Вариабельный домен VL4 LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ QKPGQAPRLLIYLTSLNLDSEGVPARFSGSGSGTDFTLTISLLEP DFAVYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
155	Вариабельный домен VL5 LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLTSLNLDSEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
156	Вариабельный домен VL6 LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLTSLNLDSEGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQP EDFATYYCQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
157	Вариабельный	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASEKVDSEFGNSFMHWYQ

	домен VL7 LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	QKPGKAPKLLIYLT <u>SNLDS</u> GVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQP EDFATYYCQQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKV QWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
158	Вариабельный домен VL8 LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSFGNSFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLT <u>SNLDS</u> GVPARFSGSGSRTDFTLTISLQP EDFATYYCQQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKV QWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
159	Вариабельный домен VL2 (S35A) LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSFGNAFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLT <u>SNLDS</u> GVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKV QWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
160	Вариабельный домен VL2 (S35N) LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSFGNNFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLT <u>SNLDS</u> GVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKV QWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
161	Вариабельный домен VL2 (N34Q) LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSFGQSFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLT <u>SNLDS</u> GVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKV QWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
162	Вариабельный домен VL2 (N34D) LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEKVDSFGDSFMHWYQ QKPGQPPKLLIYLT <u>SNLDS</u> GVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQQNNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKV QWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

163	Вариабельный домен VL5 (S35A) LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSEFGNAFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLT <u>SNLDS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQNNEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKV QWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
164	Вариабельный домен VL5 (S35N) LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSEFGNNFMHWYQ QKPGKAPKLLIYLT <u>SNLDS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQNNEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKV QWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
165	Вариабельный домен VL5 (N34Q) LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSEFGQSF FM HWYQ QKPGKAPKLLIYLT <u>SNLDS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQNNEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKV QWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
166	Вариабельный домен VL5 (N34D) LC гуманизованного 52B8 /константный домен каппа	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEKVDSEFGDSF FM HWYQ QKPGKAPKLLIYLT <u>SNLDS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQNNEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPR AKV QWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
167	Вариабельный домен VH1 HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A L235A D265S)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDN AKNS LY LQMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCV VV SVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCTVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
168	Вариабельный домен VH1 (M64V) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDN AKNS LYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGT LV T VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCV VV SVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK

	IgG1 (L234A, L235A, D265S)	TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
169	Вариабельный домен VH1 (M64L) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSLGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVIVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
170	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101F) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLFFRSLYYAMDYWGQGTLLVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISW SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVIVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
171	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101Y) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLYFRSLYYAMDYWGQGTLLVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISW SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVIVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
172	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101Q) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLQFRSLYYAMDYWGQGTLLVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISW SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVIVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN

		<i>VFSCSVMEALHNHYTQKSLSPGK</i>
173	Вариабельный домен VH2 HC гуманизованного 52B8/константный домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLKAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVIVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSPGK
174	Вариабельный домен VH2 (M64V) HC гуманизованного 52B8/константный домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVIVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSPGK
175	Вариабельный домен VH2 (M64L) HC гуманизованного 52B8/константный домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSLGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVIVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSPGK
176	Вариабельный домен VH1 HC гуманизованного 52B8/константный домен человеческого IgG4 (S228P) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVIVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLG
177	Вариабельный	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA

	домен VH1 (M64V) HC гуманизованного 52B8/константны й домен человеческого IgG4 (S228P) (K-)	PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLLWFRSLYYAMDYWGQGLTVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLG
178	Вариабельный домен VH1 (M64L) HC гуманизованного 52B8/константны й домен человеческого IgG4 (S228P) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSLGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLLWFRSLYYAMDYWGQGLTVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLG
179	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101F) HC гуманизованного 52B8/константны й домен человеческого IgG4 (S228P) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLLFFRSLYYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSYMHEALHNHYTQKSLSLGLG
180	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101Y) HC гуманизованного 52B8/константны й домен человеческого IgG4 (S228P) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLLYFRSLYYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSYMHEALHNHYTQKSLSLGLG
181	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101Q) HC гуманизованного 52B8/константны й домен человеческого IgG4 (S228P) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLLQFRSLYYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW

		<i>ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG</i>
182	Вариабельный домен VH2 HC гуманизованного 52B8/константны й домен человеческого IgG4 (S228P) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLKAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
183	Вариабельный домен VH2 (M64V) HC гуманизованного 52B8/константны й домен человеческого IgG4 (S228P) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
184	Вариабельный домен VH2 (M64L) HC гуманизованного 52B8/константны й домен человеческого IgG4 (S228P) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSLGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
185	Вариабельный домен VH1 HC гуманизованного 52B8/константны й домен человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ OGNVFSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
186	Вариабельный домен VH1 (M64V) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP

	человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S) (K-)	KPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
187	Вариабельный домен VH1 (M64L) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSLGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGLTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
188	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101F) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLFFRSLYYAMDYWGQGLTVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
189	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101Y) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLYFRSLYYAMDYWGQGLTVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
190	Вариабельный домен VH1 (M64V, W101Q) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRLQFRSLYYAMDYWGQGLTVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
191	Вариабельный домен VH2 HC гуманизованного	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSMRGRFTISRDNAKNSLYL LQMNSLKAEDTAVYYCGRRLWFRSLYYAMDYWGQGLTV

	52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S) (K-)	TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
192	Вариабельный домен VH2 (M64V) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCGRRLLWFRSLYYAMDYWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
193	Вариабельный домен VH2 (M64L) HC гуманизованного 52B8/константны й домен HC человеческого IgG1 (L234A, L235A, D265S) (K-)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSLGRFTISRDNNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCGRRLLWFRSLYYAMDYWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
194	Вариабельный домен родительской HC химерного крысиного анти- ILT3 40A6/ константный домен HC человеческого IgG4 (S228P)	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYINWVRQSSG KGPEWMGRFWYDEGIAYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLKM NSLRTGDTGTYYCTRDRDVTGITGWFAYWGQGTLLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPKPKDT LMISRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
195	Вариабельный домен родительской LC химерного крысиного анти- ILT3 40A6/ человеческая каппа	ETVMTQSPTSLASIGERVTLNCKASQSVGVNVDWYQQTP GQSPKLLIYGSA NR HTGVPDRFTGSFGSDFTLTISDVEPED LGVYYCLQYGSVPYTFGAGTKLELKRIVAAPS V FIFPPSDEQ LKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRG EC
196	Вариабельный домен родительской HC	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTNYCVN W VRQPS GKGPEWLGRFWFDEGKAYNLTL S RLSISGDTSKNQVFLR MNSLRADDTGTYYCTRDRDVTGITGWFAYWGQGTLLVTVS

	химерного крысиного анти-ILT3 16B1/ константный домен HC человеческого IgG4 (S228P)	SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMSRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
197	Вариабельный домен родительской LC химерного крысиного анти-ILT3 16B1/ человеческая каппа	ETVMTQSPSTLSASIGERVTLNCKASQSVGINVDWYQQTPG QSPKLLIYGSA NRHT GVPDRFTGSGFGSDFTLTISNVEPEDL G VYYC LQYGSVPYTFGPGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASV V CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDS TY SLSS TL TL SK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
198	Вариабельный домен родительской HC химерного мышиноного анти-ILT3 11D1/ константный домен HC человеческого IgG4 (S228P)	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTRTYWIEWVKQR PGHGLEWIGELPGNGNTHFNENFKDKATFTADTSSNAAYM QLSSLTSEDSAVYYCVRRLLGRGPFDFWQGQTTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
199	Вариабельный домен родительской LC химерного мышиноного анти-ILT3 11D1/человеческая каппа	DIQMTQSPSSLSVSLGGKVTITCKASQDINEYIGWYQRKPGK GPRLLIHYTSTLQSGIPSRFSGSGSGRDYSLISNLEPEDIATY YC LQY ANPLPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASV V CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS T YSLSS TL TL SK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
200	Вариабельный домен родительской HC химерного крысиного анти-ILT3 17H12/ константный домен HC человеческого IgG4 (S228P)	EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAASGFTFSNFDMAWVRQ APTRGLEWVSSITYDGGSTSYRDSVKGRFTISRDNAGKGLY LQMDSLRSEDATYYCTTVES IATISTY FDYWGGQVMVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMSRTPEVTCVTVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
201	Вариабельный домен родительской LC химерного крысиного анти-ILT3	DIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVSMSRYDLIHWYQQ KPGQQPKLLIFRASDLASGIPARFSGSGSGTDFLTINPVQAD DIATYYCQQTRKSPPTFGGGTRLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASV V CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDS TY SLSS TL TL SK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC

	17H12/человеческая каппа	
202	Вариабельный домен родительской LC химерного крысиного анти-ILT3 37C8/ константный домен HC человеческого IgG4 (S228P)	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYCYNWVRQPS GKGPEWLGGRFWYDEGKVYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLK MNLRLTDDTGTYICTRDRDTMGITGWFAYWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTEPVTCTVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
203	Вариабельный домен родительской LC химерного крысиного анти-ILT3 37C8/человеческая каппа	ETVMTQSPTSLASIGERVTLNCKASQSVGINVDWYQQTPG QSPKLLIYGSA NRHTGVPDRFTGSGFGSGFTLTISNVEPEDL GVYYCLQYGSVPYTFGPGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVTCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
204	Вариабельный домен родительской HC химерного мышиноного анти-ILT3 1G12/ константный домен человеческого IgG4 (S228P)	QVQMQQSGTELMKPGASMKISCKATGYTFSTYWIQWIKQR PGHGLEWIGEILPGSGTTNYNENFKGKATFSADTSSNTAYIH LSSLTSEDSAVFYCARRLGRGPFEDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TEPVTCTVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVME ALHNHYTQKSLSLSPGK
205	Вариабельный домен родительской LC химерного мышиноного анти-ILT3 1G12/человеческая каппа	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCEASQDINKHIDWYQHQPGR GPSLLIHYASILQPGIPSRFSGSGSGRDYSFITSLEPEDIAITYY CLQYDNLLPTFGGGTKLEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTY LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
206	Вариабельный домен родительской HC химерного крысиного анти-ILT3 20E4/ константный домен HC человеческого IgG4 (S228P)	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYSVNWVRQPS GKGLEWMGRFWYDGGTAYNSTLESRLSISGDTSKNQVFLK MNSLQTDGDTGTYICTRDRDTMGITGWFAYWGQGTLLTVS PASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTEPVTCTVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
207	Вариабельный	ETVMTQSPTSLASIGERVTLNCKASQSVGNVDWYQQTP

	домен родительской LC химерного крысиного анти- ILT3 20E4/человеческа я каппа	GQSPKLLIYG <u>GSANRHT</u> GVPDRFTGSGFGSDFTLTISNVEPED LGVYYCLQYGSVPYTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
208	Вариабельный домен родительской HC химерного крысиного анти- ILT3 24A4/ константный домен человеческого IgG4 (S228P)	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYCVNWVRQPS GKGPEWLGREFWYDEGKVYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLK MNRLRTDDTGTYICTRDRDTLGITGWFAYWGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSPGK
209	Вариабельный домен родительской LC химерного крысиного анти- ILT3 24A4/человеческ ая каппа	ETVMTQSPTSLASIGERVTLNCKASQSVGINVDWYQQTPG QSPKLLIYG <u>GSANRHT</u> GVPDRFTGSGFGSGFTLTISNVEPEDL GVYYCLQYGSVPYTFGPGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
210	Вариабельный домен VH1 (M64V) HC гуманизованного 52B8 /константный домен HC (N297A)человече ского IgG1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVATISGGGDYTNYPDSVRGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCGRRWFRLYYAMDYWGQGLTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSPGK
211	Константный домен HC человеческого IgG1 (N297A; показано жирным шрифтом)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSPGK
212	VH химерного крысиного анти- ILT3 40A6/человеческ ий IgG1 (N297A)	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYSINWVRQSSG KGPEWMGREFWYDEGIAYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLKM NSLRTGDTGTYYCTRDRDTVGITGWFAYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDT

		<i>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>
213	VH химерного крысиного анти- ILT3 16B1/человеческ ий IgG1 (N297A)	<i>QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTNYCVNWVRQPS GKGPEWLGRFWFDEGKAYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLR MNSLRADDTGTYICTRDRDTVGITGWFAYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>
214	VH химерного мышинного анти- ILT3 11D1/человеческ ий IgG1 (N297A)	<i>QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFRTYIEWVVKQR PGHGLEWIGELPGNGNTHFNENFKDKATFTADTSSNAAYM QLSSLTSEDSAVYYCVRRLLGRGPFDFWGGQTTLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>
215	VH химерного крысиного анти- ILT3 17H12/человечес кий IgG1 (N297A)	<i>EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSAASGFTFSNFDMAWVRQ APTRGLEWVSSITYDGGSTSYRDSVKGRFTISRDNAKGTLY LQMDSLRSEDTATYYCTTVESIAITISTYFDYWGQGMVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>
216	VH химерного крысиного анти- ILT3 37C8/человеческ ий IgG1 (N297A)	<i>QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYCVNWVRQPS GKGPEWLGRFWYDEGKVYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLK MNRLRTDDTGTYICTRDRDTMGITGWFAYWGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>
217	VH химерного мышинного анти- ILT3	<i>QVQMQQSGTELMKPGASMKISCKATGYTFSTYWIQWIKQR PGHGLEWIGELPGSGTTNYNENFKGKATFSADTSSNTAYIH LSSLTSEDSAVFYCARRLLGRGPFDFYWGQGTTLTVSSASTKG</i>

	1G12/человеческий IgG1 (N297A)	PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
218	VH химерного крысиного анти-ILТ3 20Е4/человеческий IgG1 (N297A)	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYSYNWVRQPSGKGLEWMGRFWYDGGTAYNSTLESRLSISGDTSKNQVFLKMNSLQTDGTYICTRDRDTMGITGWFAYWGQGLVTVSPASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
219	VH химерного крысиного анти-ILТ3 24А4/человеческий IgG1 (N297A)	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYCVNWVRQPSGKGPEWLGGRFWYDEGKVYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLKMNSLRTDDTGTYICTRDRDTLGITGWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
220	VH химерного крысиного анти-ILТ3 40А6/человеческий IgG1 (N297A)	QVQLKESGPGLVQASETSLTCTVSGFSLTSYISINWVRQSSGKGPEWMGRFWYDEGIAYNLTLESRLSISGDTSKNQVFLKMNSLRTGDTGTYICTRDRDTVGITGWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
221	Остатки после LC-CDR3 Хаа представляет собой любую аминокислоту	FGXG
222	Остатки до HC-CDR1 Хаа представляет собой любую аминокислоту	CXXX
223	Остатки до HC-	LEWIG

	CDR1	
224	Остатки после HC-CDR3 Хаа представляет собой любую аминокислоту	WGXXG
225	Тяжелая цепь пембролизумаба	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQ APGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTA YMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL LGK
226	Легкая цепь пембролизумаба	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ QKPGQAPRLLIYLAYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
227	Константный домен HC человеческого IgG1 (N297A, D265A; показаны жирным шрифтом)	<i>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSG ALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK</i>
Константные области показаны курсивом. Подчеркнутые аминокислотные последовательности представляют собой CDR.		

Хотя настоящее изобретение описано в настоящем документе со ссылкой на проиллюстрированные варианты его осуществления, однако следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается этими вариантами. Специалистам в данной области, имеющим доступ к изложенным здесь концепциям, будут очевидны дополнительные модификации и варианты, входящие в объем настоящего изобретения. Следовательно, настоящее изобретение ограничено только прилагаемой здесь формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с человеческим иммуноглобулин-подобным транскриптом 3 (ILT3), содержащее:

(a) гипервариабельную область тяжелой цепи (HC-CDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17; HC-CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19, 20 или 21 и HC-CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23;

(b) гипервариабельную область легкой цепи (LC-CDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 или 42; LC-CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 43 и LC-CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 44.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где:

(a) HC-CDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; HC-CDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 и HC-CDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;

(b) LC-CDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; LC-CDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 и LC-CDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где V_H включает каркасную область, выбранную из группы, состоящей из человеческих V_{H1} , V_{H2} , V_{H3} , V_{H4} , V_{H5} и V_{H6} и их вариантов, имеющих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций, и V_L включает каркасную область, выбранную из группы, состоящей из человеческих V_{L1} , V_{L2} , V_{L3} , V_{L4} , V_{L5} , V_{L6} , V_{L7} , V_{L8} , V_{L9} и V_{L10} и их вариантов, имеющих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где антитело содержит HC, имеющую константный домен HC человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или его вариант, имеющий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокис-

лотной последовательностью константного домена нативного изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.3 или 4, где антитело содержит LC, имеющую константный домен человеческой LC каппа или лямбда или его вариант, включающий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного константного домена человеческой легкой цепи каппа или лямбда.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где антитело содержит:

(i) V_H , имеющий каркасную область, выбранную из человеческих V_{H1} , V_{H2} , V_{H3} , V_{H4} , V_{H5} и V_{H6} , и константный домен HC человеческого IgG1 или IgG4 или его вариант, включающий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного константного домена HC изотипа IgG1 или IgG4; и

(ii) V_L , имеющий каркасную область, выбранную из человеческих V_{L1} , V_{L2} , V_{L3} , V_{L4} , V_{L5} , V_{L6} , V_{L7} , V_{L8} , V_{L9} и V_{L10} , и константный домен человеческой LC каппа или лямбда или его вариант, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен, добавлений, делеций или их комбинаций по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного константного домена человеческой LC каппа или лямбда.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 117, 118, 119, 123, 124 или 125 и V_L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140 или 141.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.6, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 118 и V_L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 140.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где антитело содержит тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, и их варианты, где HC не содержит С-концевого лизинового остатка или С-концевого глицина-лизина.

10. Композиция для лечения рака у индивидуума, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 или композиции по п.10, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, меланому, рак молочной железы, рак легких, рак головы и шеи, рак бронхов, рак прямой и ободочной кишки, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак головного мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак пищевода, рак шейки матки, рак матки или эндометрия, рак ротовой полости или глотки, рак печени, рак почек, рак яичек, рак желчных путей, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, рак надпочечников, остеосаркому, хондросаркому или злокачественную опухоль кроветворных тканей.

12. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9 для лечения рака у индивидуума.

13. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.12, где применение включает один или более ингибиторов или антагонистов PD-1, PD-L1 и/или PD-L2.

14. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.13, где один или более ингибиторов или антагонистов PD-1, PD-L1 и/или PD-L2 представляют собой анти-PD-1 антитело, выбранное из группы, состоящей из пембролизумаба, ниволумаба, цемиплимаба и пидилизумаба.

15. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.13, где один или более ингибиторов или антагонистов PD-1, PD-L1 и/или PD-L2 представляют собой ингибитор PD-L1, выбранный из группы, состоящей из дурвалумаба, атезолизумаба, авелумаба, YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C и MDX-1105.

16. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.12 или 13, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, меланому, рак молочной железы, рак легких, рак головы и шеи, рак бронхов, рак прямой и ободочной кишки, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак головного мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак пищевода, рак шейки матки, рак матки или эндометрия, рак ротовой полости или глотки, рак печени, рак почек, рак яичек, рак желчных путей, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, рак надпочечников, остеосаркому, хондросаркому или злокачественную опухоль кроветворных тканей.

17. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая анти-ILT3-антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9.

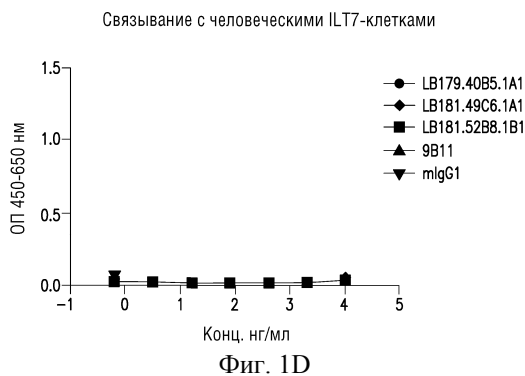
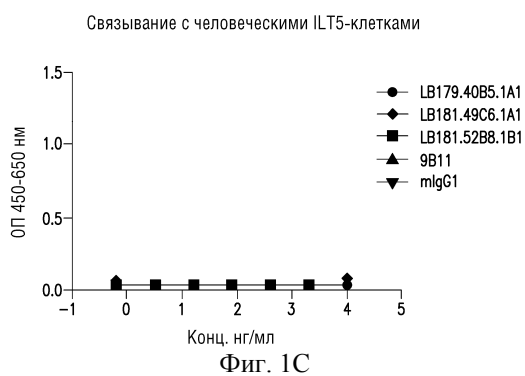
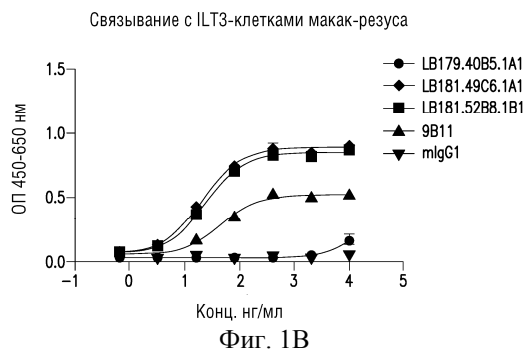
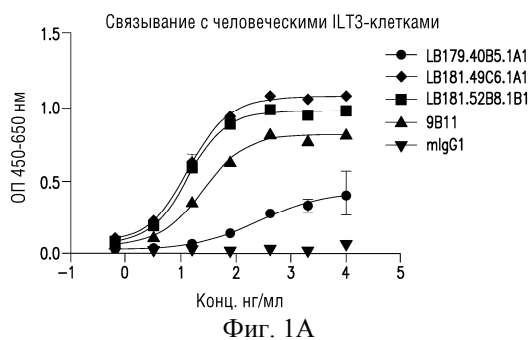
18. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.17.

19. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.18.

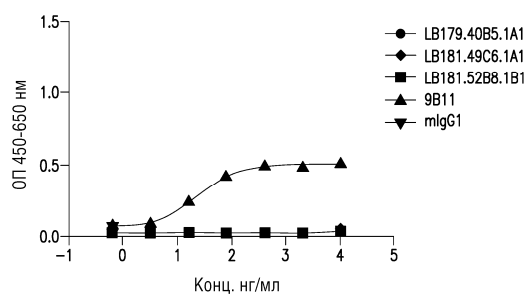
20. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-9, вклю-

чающий:

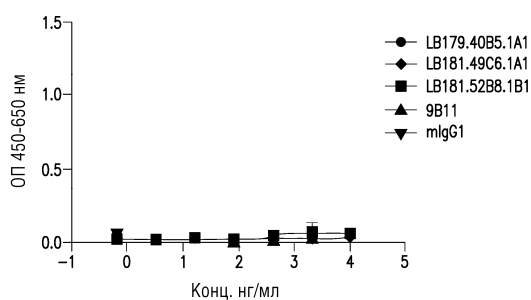
- (а) получение клетки-хозяина, содержащей вектор по п.18;
- (б) культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела или антигенсвязывающего фрагмента, кодируемого вектором; и
- (с) получение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из культуральной среды для продуцирования антитела или антигенсвязывающего фрагмента.



Связывание с человеческими ILT8-клетками



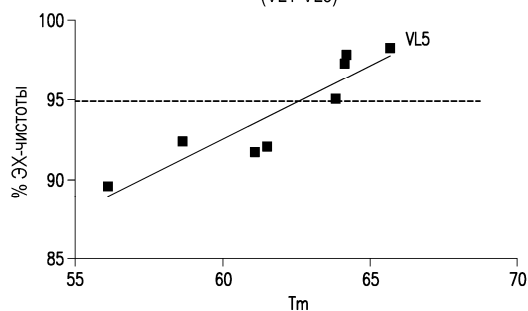
Связывание с человеческими ILT11-клетками



mAb No.	Описание	hILT3 KD (нМ)	rhILT3 KD (нМ)	Отношен. rhILT3/hILT3	измер. рI	ЭХ-чистота (% главного пика)	Начальн. Tm (Fab)	Tm (Fab)	Tagg
10	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL2) IgG4 S228P/Каппа	0.72	8.77	12.2	6.33	95.5°C	55.8°C	63.7°C	62.7°C
25	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL2) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	0.74	8.66	11.8	7.76	94.9°C	60.4°C	65.8°C	64.2°C
26	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL5) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	0.61	4.9	8.1	8.62	96.1°C	62.1°C	67.6°C	66.1°C
27	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL6) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	0.92	10.35	11.3	8.84	90.2°C	55.6°C	61.9°C	57.2°C
28	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL7) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	0.57	5.56	9.8	8.8	94.4°C	59.6°C	65.3°C	63.9°C
29	Гуманизованное анти-ILT3 mAb ((52B8 VH1 M64V/VL8) L234A L235A D265S) IgG1/Каппа	0.56	5.74	10.2	8.85	94.1°C	59.1°C	65.2°C	65.2°C
30	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL5) IgG4 S228P/Каппа	0.6	4.8	8	7.21	98.2°C	57.9°C	65.7°C	64.1°C
31	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL6) IgG4 S228P/Каппа	0.88	10.3	11.7	7.45	91.7°C	54.9°C	61.1°C	58.4°C
32	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL7) IgG4 S228P/Каппа	0.53	5.61	10.5	7.45	97.8°C	57.9°C	64.2°C	61.7°C
33	Гуманизованное анти-ILT3 mAb (52B8 VH1 M64V/VL8) IgG4 S228P/Каппа	0.54	5.59	10.4	7.45	97.3°C	58.1°C	64.1°C	59.8°C

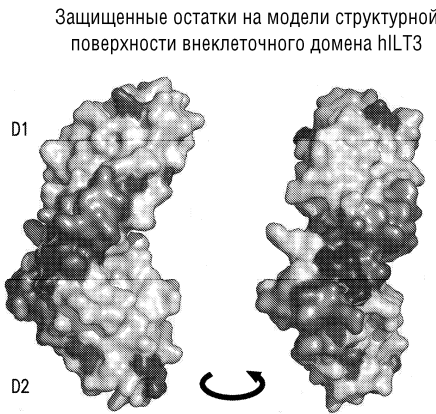
Фиг. 2А

ЭХ-чистота и Tm для всех вариантов VH1 M64V IgG4 (VL1-VL8)

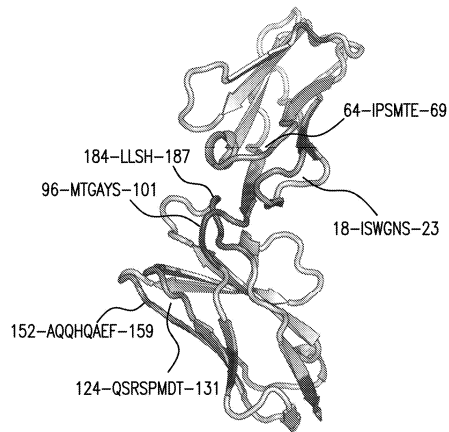




Фиг. 3А

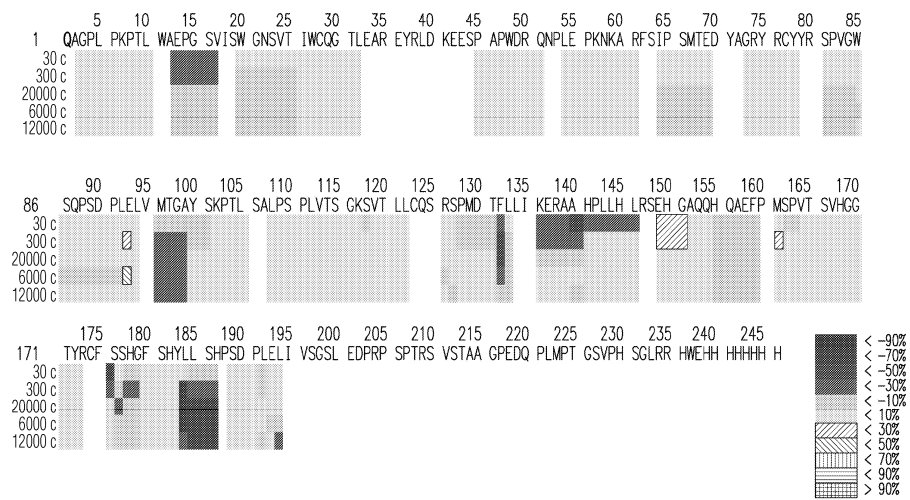


Фиг. 3В



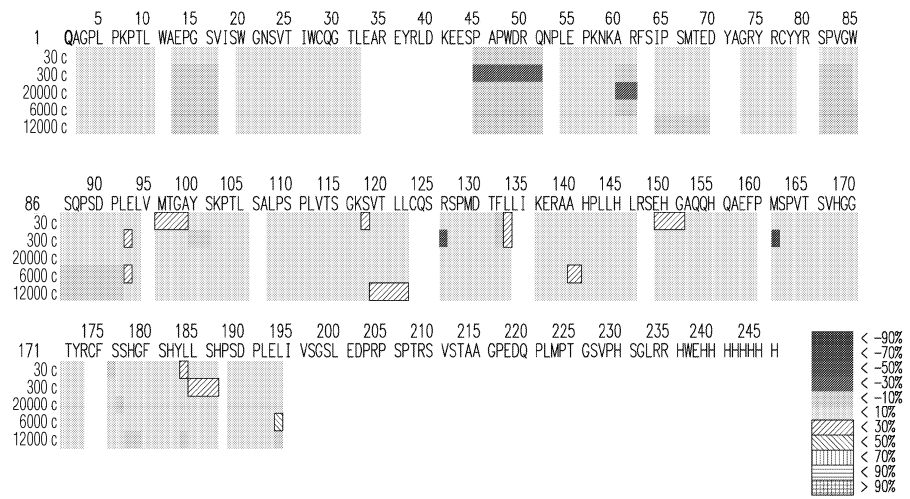
Фиг. 3С

Дейтериевая тепловая карта связывания
антитела ZM4.1 с человеческим ILT3



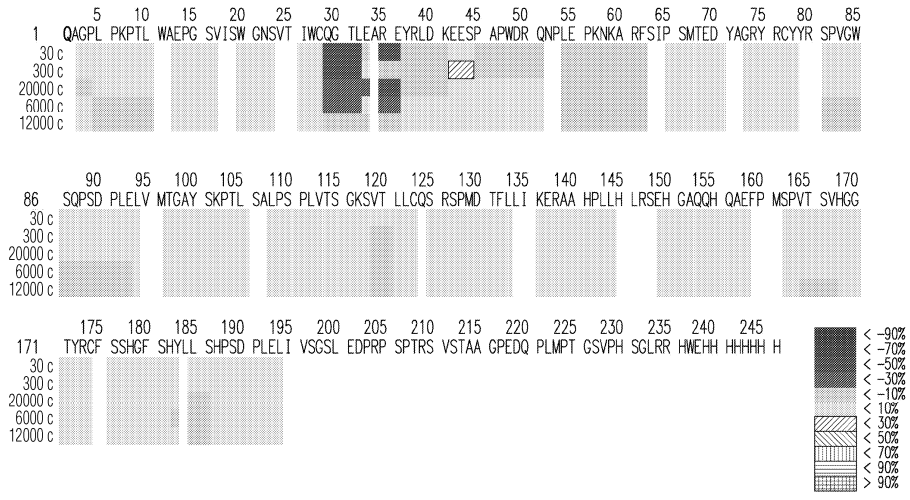
Фиг. 3D

Дейтериевая тепловая карта связывания
антитела DX446 с человеческим ILT3

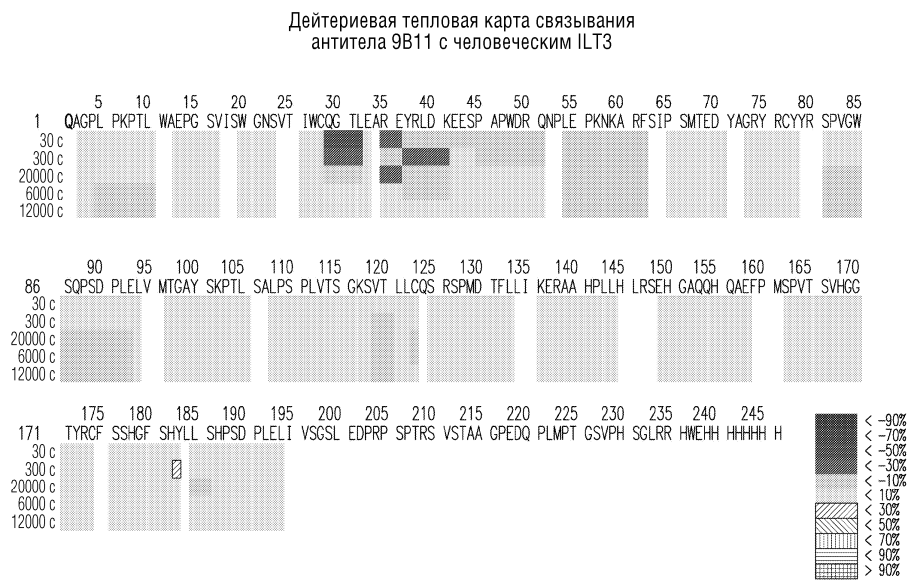


Фиг. 3E

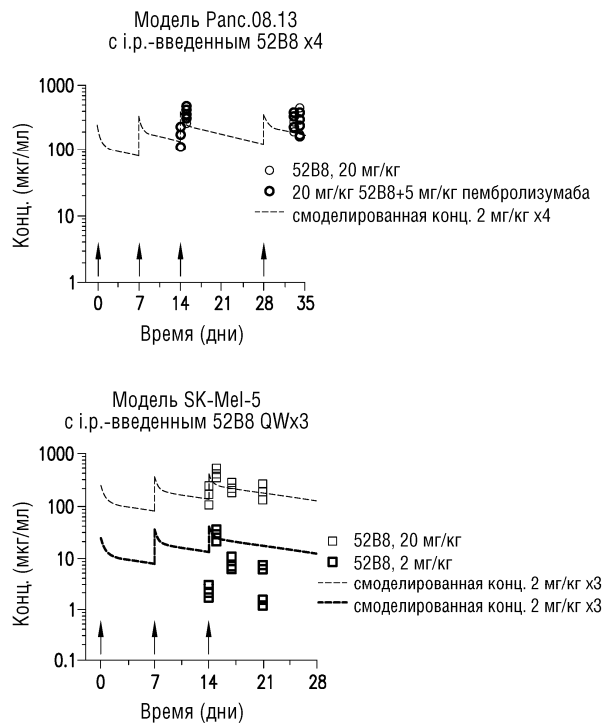
Дейтериевая тепловая карта связывания
антитела DX439 с человеческим ILT3



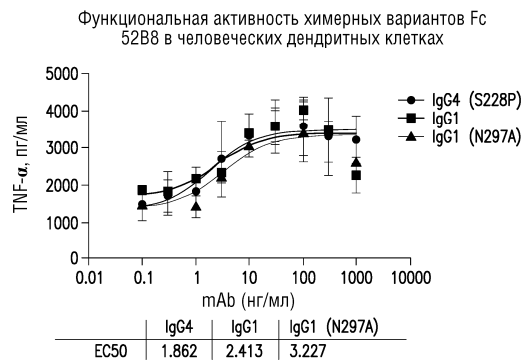
Фиг. 3F



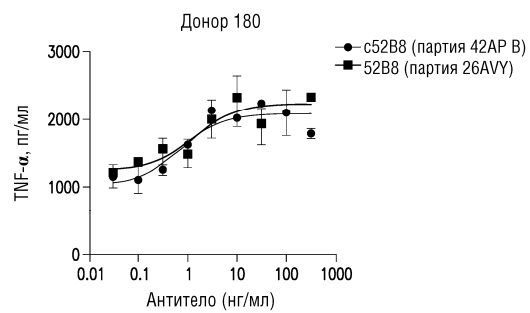
Фиг. 3G



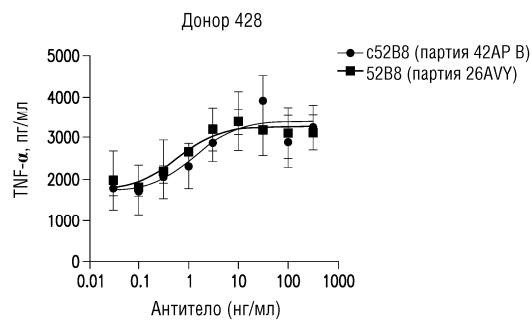
Фиг. 4



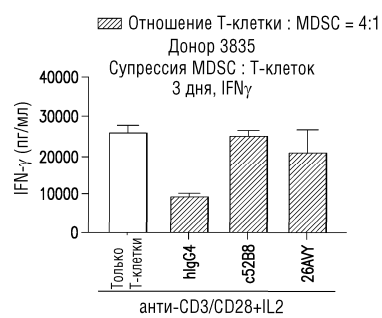
Фиг. 5A



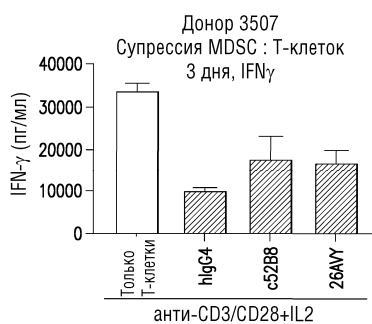
Фиг. 5В



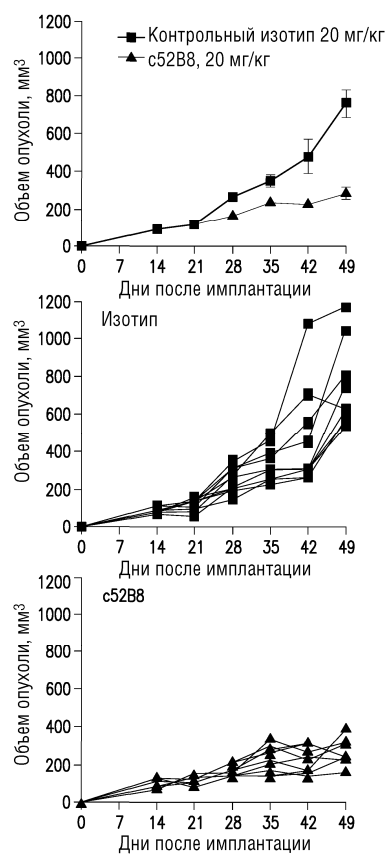
Фиг. 5С



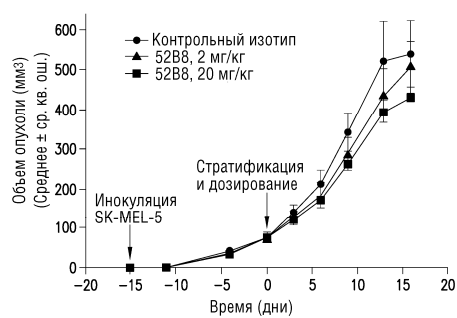
Фиг. 6А



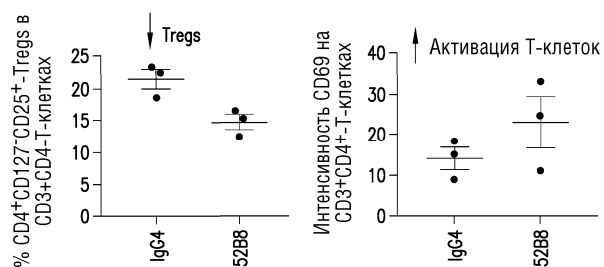
Фиг. 6В



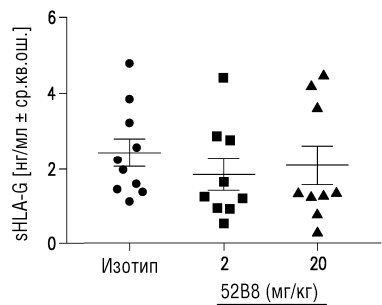
Фиг. 7



Фиг. 8А



Фиг. 8В

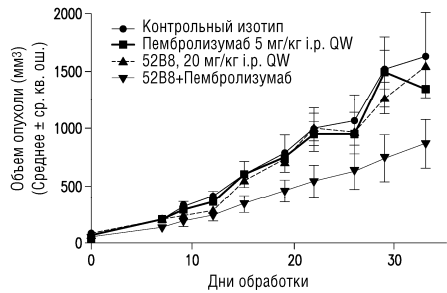


Фиг. 8С

	hulgG 20 мг/кг	52B8, 2 мг/кг	52B8, 20 мг/кг
Оценка инфильтрации (среднее ± ср. кв. ош.)	1,25 ± 0,25	1,5 ± 0,29	1,75 ± 0,25
Комментарии	Т-клетки в сердцевине 2/4 опухолей		Т-клетки в сердцевине 4/4 опухолей

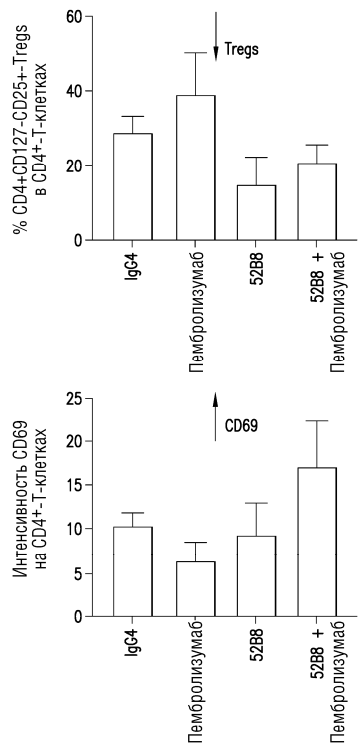
Шкала оценок по ИГХ: 0 - негативный; 1 - редкий; 2 - низкий; 3- умеренный; 4 - высокий; 5 - очень высокий

Фиг. 8D

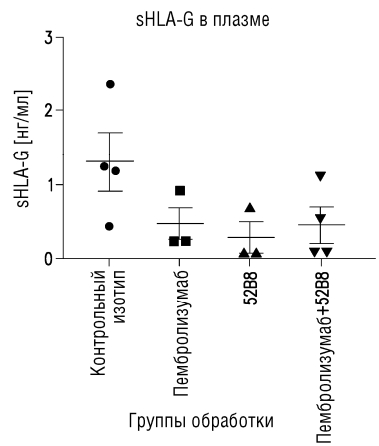


Фиг. 9А

Анализ TIL с помощью CyTOF

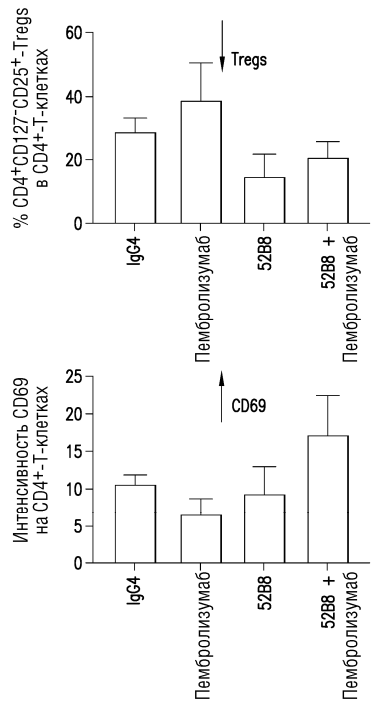


Фиг. 9В

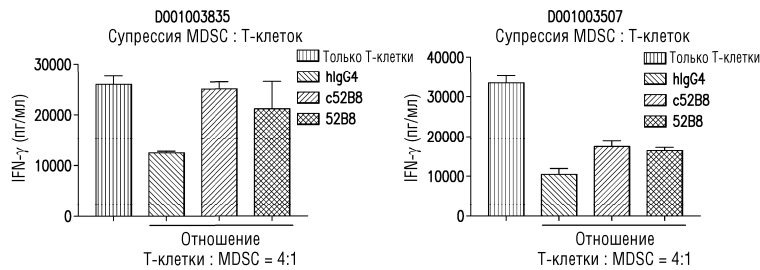


Фиг. 9С

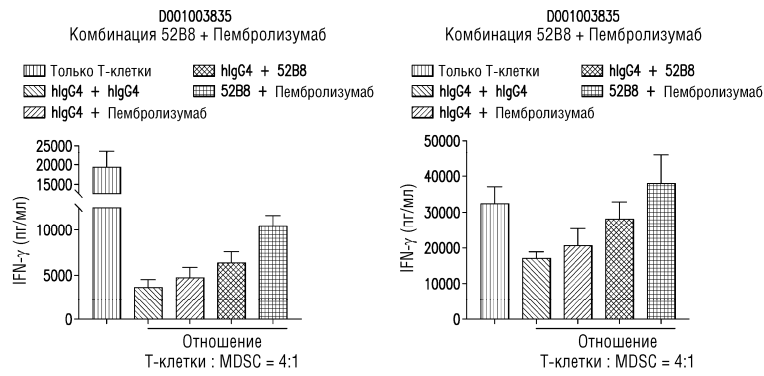
Анализ TIL с помощью CyTOF



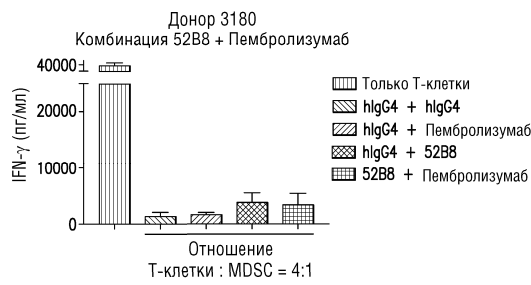
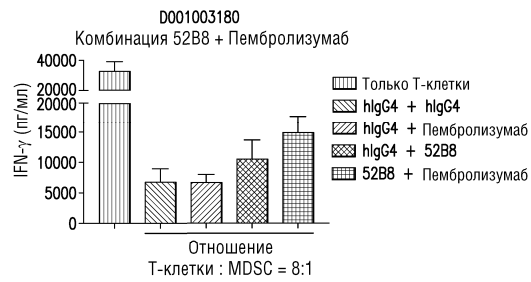
Фиг. 9D



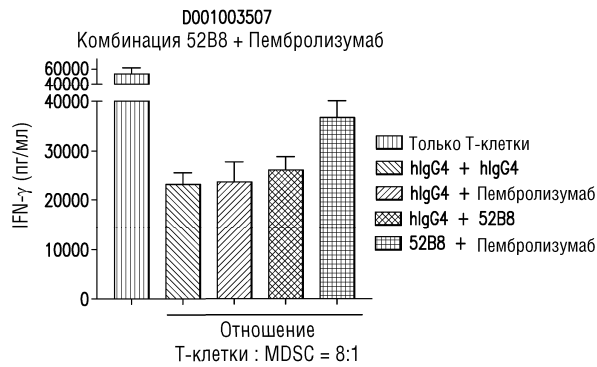
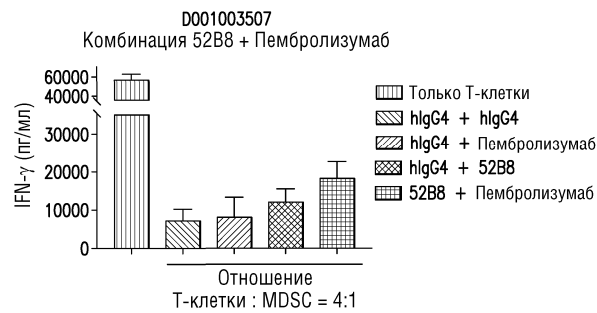
Фиг. 10



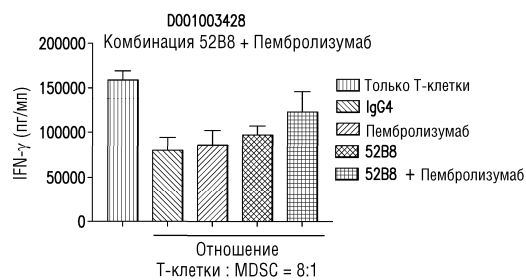
Фиг. 11



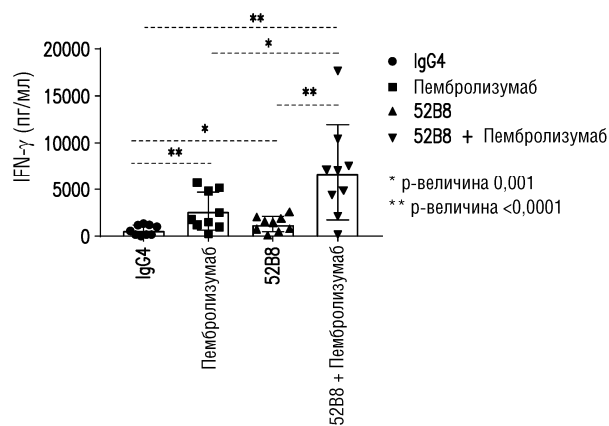
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



n=9, пары доноров
 Парные, односторонние t-критерии для сравнения
 логарифмических отношений

Фиг. 15

