



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.03

(21) Номер заявки
201991243

(22) Дата подачи заявки
2017.12.01

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)

(54) МЕЧЕННЫЕ РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКОЙ АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-L1 ДЛЯ ИММУНО-ПЭТ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

(31) 62/428,672; 62/457,267; 62/569,773

(32) 2016.12.01; 2017.02.10; 2017.10.09

(33) US

(43) 2019.11.29

(86) PCT/US2017/064215

(87) WO 2018/102682 2018.06.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Келли Маркус, Ма Дангше, Олсон
Уильям, Терстон Гэвин (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Глухарёва А.О.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Лебедев В.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Парамонова К.В.
(RU)**

(56) WO-A1-2016162368
MARIA J W D VOSJAN ET AL.:
"Conjugation and radiolabeling of monoclonal
antibodies with zirconium-89 for PET imaging
using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-
desferrioxamine", NATURE PROTOCOLS, vol.
5, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), pages
739-743, XP55304936, GB, ISSN: 1754-2189, DOI:
10.1038/nprot.2010.13, page 740
WO-A1-2015112805

DAN LI ET AL.: "Immuno-PET imaging using
89Zr labeled PD-L1 antibody in non-small cell lung

cancer Xenograft", J. NUCL. MED., vol. 57, no. S2,
1 May 2016 (2016-05-01), page 337, XP055441806,
page 1

WOJCIECH G. LESNIAK ET AL.: "PD-L1
Detection in Tumors Using [64 Cu]Atezolizumab
with PET", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol.
27, no. 9, 21 September 2016 (2016-09-21), pages
2103-2110, XP55398262, ISSN: 1043-1802, DOI:
10.1021/acs.bioconjchem.6b00348, page 210

MARCUS KELLY ET AL.: "Immuno-PET
using Zirconium-89 (89Zr) radiolabeled fully human
anti-PD-L1 antibody successfully images PD-L1
positive tumors in preclinical mouse models",
JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 58,
no. S1, 1 May 2017 (2017-05-01), page 618,
XP055441801, the whole document

ANDERS JOSEFSSON ET AL.: "Imaging,
Biodistribution, and Dosimetry of Radionuclide-
Labeled PD-L1 Antibody in an Immunocompetent
Mouse Model of Breast Cancer", CANCER
RESEARCH, vol. 76, no. 2, 15 January 2016
(2016-01-15), pages 472-479, XP55398622, US ISSN:
0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2141,
the whole document

Samit Chatterjee ET AL.: "A humanized
antibody for imaging immune checkpoint ligand PD-
L1 expression in tumors", Oncotarget, 1 March 2016
(2016-03-01), pages 10215-10227, XP55389519,
United States DOI: 10.18632/oncotarget.7143,
Retrieved from the Internet: URL: [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=download&path\[\]=7143&path\[\]=20347](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=download&path[]=7143&path[]=20347) [retrieved on
2017-07-10] the whole document

(57) В изобретении представлены меченные радиоактивной меткой антитела против PD-L1 и их применение в иммуно-ПЭТ визуализации. Представлены способы выявления присутствия белков PD-L1 у больного или в образце.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Изобретение относится к меченным радиоактивной меткой антителам против PD-L1 и к их применению в иммуно-ПЭТ визуализации.

Перечень последовательностей

Официальная копия перечня последовательностей предоставляется одновременно с описанием в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII с названием файла "10305WO01_SEQ_LIST_ST25.txt", датой создания 01 декабря 2017 г. и размером приблизительно 117 КБ. Перечень последовательностей, содержащийся в этом отформатированном документе ASCII, является частью описания и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Лиганд 1 программируемой смерти клетки (PD-L1) (также называемый B7-H1 или CD274) представляет собой лиганд белкового рецептора из 290 аминокислот, широко экспрессируемый как в лимфоидных, так и в нелимфоидных тканях, таких как CD4 и CD8 Т-клетки, макрофагальные клеточные линии, в периферических тканях, а также в опухолевых клетках и инфицированных вирусом клетках (Dong et al. 1999, Nature Med.). PD-L1 связывается с рецепторами PD-1 и B7-1, которые принадлежат к семейству CD28/CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген)/ICOS (индуцибельный соstimулятор) Т-клеточных соингибиторных рецепторов (Chen et al. 2013, Nature Rev. Immunol. 13: 227-242), и ослабляет иммунный ответ путем ингибирования активации Т-клеток. PD-L1, связывающийся с PD-1 или B7-1, приводит к пониженной Т-клеточной пролиферации и секреции цитокинов, нарушению гуморального и клеточного иммунного ответа при таких заболеваниях, как злокачественная опухоль и вирусная инфекция. Экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках и инфицированных вирусом клетках используется опухолями и хроническими вирусными инфекциями, чтобы избежать иммунного ответа. PD-L1 экспрессируется в самых разных опухолях, и исследования на животных моделях показали, что PD-L1 в опухолях ингибирует активацию Т-клеток и лизис опухолевых клеток и может привести к повышенной гибели опухолеспецифических Т-клеток. При хронических вирусных инфекциях PD-L1, экспрессируемый на инфицированных вирусом клетках, связывается с PD-1 на вирус-специфических Т-клетках, и эти Т-клетки становятся "истощенными" с потерей эффекторных функций и пролиферативной способности (Freeman 2008, PNAS 105: 10275-10276). Система PD-1:PD-L1 также играет важную роль в индуцированном развитии Т-регуляторных (Treg) клеток и в поддержании функции Treg (Francisco et al. 2010, Immunol. Rev. 236: 219-242). Блокирование PD-L1 антагонистами, включая моноклональные антитела, было изучено при лечении рака и хронических вирусных инфекций (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519; Freeman 2008, PNAS 105: 10275-10276; Sheridan 2012, Nature Biotechnology 30: 729-730). Иммуно-позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) представляет собой диагностический инструмент для визуализации, который использует моноклональные антитела, меченные позитронными излучателями, сочетая целевые свойства антитела с чувствительностью камер позитронно-эмиссионной томографии. См., например, The Oncologist, 12: 1379 (2007); Journal of Nuclear Medicine, 52(8): 1171 (2011). Иммуно-ПЭТ обеспечивает визуализацию и количественную оценку накопления антигенов и антител in vivo и, как таковой, может служить важным инструментом для диагностики и дополнения терапии. Например, иммуно-ПЭТ может помочь в выборе потенциальных больных-кандидатов для конкретной терапии, а также в мониторинге лечения. Поскольку и PD1, и PD-L1 появились в качестве целей для иммунотерапии, существует потребность в диагностических инструментах для терапии на основе антител против PD1 и/или антител против PD-L1, в том числе, среди прочего, в диагностических инструментах, которые позволяют выявлять подходящих больных-кандидатов на указанную терапию.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее раскрытие включает в себя меченные радиоактивной меткой конъюгаты антитела против PD-L1 для применения в иммуно-ПЭТ визуализации. Согласно одному аспекту конъюгат содержит антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, хелатирующий фрагмент и позитронный излучатель. В настоящем документе также представлены процессы синтеза указанных конъюгатов и синтетические промежуточные соединения, применимые для этого.

В настоящем документе также представлены способы визуализации ткани, которая экспрессирует PD-L1, при этом способы предусматривают введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела против PD-L1, описываемого в настоящем документе, в ткань и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ).

В настоящем документе также представлены способы выявления PD-L1 в ткани, при этом способы предусматривают введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела против PD-L1, описываемого в настоящем документе, в ткань и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью ПЭТ визуализации. Согласно одному варианту осуществления ткань находится в субъекте-человеке. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является отличное от человека млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет заболевание или нарушение, такое как злокачественная опухоль, воспалительное заболевание или инфекция.

Согласно некоторым аспектам субъекту вводят дозу 5 мг, или 10 мг, или 20 мг меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела против PD-L1.

В настоящем документе также представлены способы идентификации больного, подходящего для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, при этом способы предусматривают отбор больного с солидной опухолью, введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела, описываемого в настоящем документе, и визуализацию введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоль с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли идентифицирует больного как подходящего для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1.

В настоящем документе также представлены способы лечения опухоли, при этом способы предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью; определение того, что солидная опухоль является PD-L1-позитивной; и введение противораковой терапии субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно некоторым вариантам осуществления противораковая терапия включает в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антитело против PD-1 или антитело против PD-L1). Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела, описываемый в настоящем документе, и визуализируют локализацию меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела путем визуализации позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) для определения, является ли опухоль PD-L1-позитивной.

В настоящем документе также представлены способы мониторинга эффективности противораковой терапии у субъекта, при этом способы предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью, при этом субъект получает лечение противораковой терапией; введение субъекту меченного радиоактивной меткой конъюгата, описываемого в настоящем документе; визуализацию локализации введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата в опухоль с помощью ПЭТ визуализации и определение роста опухоли, при этом уменьшение от исходного уровня поглощения конъюгата или меченного радиоактивной меткой сигнала указывает на регрессию и эффективность противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления противораковая терапия включает в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антитело против PD-1).

В настоящем документе также представлены способы прогнозирования ответа больного на противораковую терапию, включающую в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, при этом способы предусматривают отбор больного с солидной опухолью и определение того, является ли опухоль PD-L1-позитивной, при этом если опухоль является PD-L1-позитивной, это указывает на позитивный ответ больного на противораковую терапию, включающую в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль определяют как позитивную путем введения меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием и визуализируют локализацию меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-L1-позитивной.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображены SDS-PAGE и SEC немодифицированного антитела против PD-L1 и модифицированного DFO антитела против PD-L1.

На фиг. 2A и 2B изображена радио-SEC-HPLC после мечения радиоактивной меткой ^{89}Zr для исследования 1.

На фиг. 3 изображена радио-SEC-HPLC DFO-конъюгата (антитела против PD-L1) после мечения радиоактивной меткой ^{89}Zr для исследования 2.

На фиг. 4 изображена радио-SEC-HPLC SEC после мечения радиоактивной меткой ^{89}Zr для исследования 3.

На фиг. 5 изображена хроматограмма UV280-SEC-HPLC и меченое вещество радио-iTLC после мечения радиоактивной меткой ^{89}Zr для исследования 1.

На фиг. 6A, 6B, 6C и 6D показана экспрессия hPD-L1 линиями опухолевых клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1^{Tg} (фиг. 6A), LOX-IMVI (фиг. 6B), MDA-MB-231 (фиг. 6C) и SK-BR-3 (фиг. 6D) *in vitro*, как описывается в примере 5 настоящего документа.

На фиг. 7 показана экспрессия hPD-L1 опухолевыми клетками MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1^{Tg} и LOX-IMVI с или без лечения интерфероном-гамма *in vitro* во втором эксперименте, как описывается в примере 5 настоящего документа.

На фиг. 8 показаны хроматограммы, полученные с помощью анализа SEC-HPLC с использованием образцов из радиоиммуноконъюгатных препаратов конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 для исследований, показанных на A, B, D и E, и изотипного контрольного радиоиммуноконъюгата ^{89}Zr -DFO-IgG4^P для исследований, показанных на C и F. Хроматограммы для поглощения при 280 нм показаны на A-C, а радиохроматограммы для интенсивности γ -эмиссии показаны на D-F. На A-C также выявляли элюирование буферных компонентов. Эти пики солей в буфере для образцов (время удержания >25 мин, звездочка "**") были исключены из интеграции площадей пиков. Пики метили для обозначения HMW (высокомолекулярного) иммуноконъюгата ("1"), мономерного иммуноконъюгата ("2"), невключенного ^{89}Zr ("3") и солей в буфере для образца ("**"). Сокращения: mAU = миллиединицы поглощения; cps = число импульсов в секунду.

На фиг. 9 представлены данные биораспределения *ex vivo* для конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 у мышей PD-1^{hu/hu}-PD-L1^{hu/hu}. Шестнадцать мышам (2 группы по 8 животных в каждой) вводили однократную IV дозу 50 мкКи (1 мг/кг) конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 в день 0 и забивали их в день 6 (черные столбцы) или день 10 (серые столбцы) после введения дозы. Кровь, собранную посредством пункции сердца, и указанные собранные ткани взвешивали и определяли радиоактивность. Процент инъецируемой дозы на грамм (% ID/g) для отдельных образцов, собранных в день 6 или 10, рассчитывали относительно радиоактивности стандарта дозы из инъецируемого материала (конъюгат ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1) и массы отдельных образцов. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

I. Определения.

Если в настоящем документе не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же самое значение, что обычно известно рядовому специалисту в области, к которой относится раскрываемый заявляемый объект. Термин "PD-L1" относится к лиганду 1 программируемой смерти, также известному как CD274 и B7H1. Аминокислотная последовательность полноразмерного PD-L1 представлена в GenBank под регистрационным номером NP_054862.1. Термин "PD-L1" также включает в себя варианты белка PD-L1. Термин "PD-L1" включает в себя рекомбинантный PD-L1 или его фрагмент. Термин также предусматривает PD-L1 или его фрагмент, соединенный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, такой как ROR1. Например, термин включает в себя последовательности, содержащие Fc мыши (mIgG2a) или Fc человека (hIgG1) на С-конце, соединенные с аминокислотными остатками 19-239 полноразмерного PD-L1 (NP_054862.1). Варианты белка содержат гистидиновую метку на С-конце, соединенную с аминокислотными остатками 19-239 NP_054862.1. Если не указано происхождение от отличного от человека вида, термин "PD-L1" означает PD-L1 человека. PD-L1 представляет собой белок из 290 аминокислот с внеклеточным IgV-подобным и IgC-подобным доменами (аминокислоты 19-239 полноразмерного PD-L1), трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом из приблизительно 30 аминокислот. PD-L1 конститутивно экспрессируется на многих клетках, таких как антигенпрезентирующие клетки (например, дендритные клетки, макрофаги и В-клетки) и на гемопоэтических и негемопоэтических клетках (например, клетках сосудистого эндотелия, островках поджелудочной железы и сайтах иммунных привилегий). PD-L1 также экспрессируется в широком ряду опухолей и инфицированных вирусом клетках и представляет собой компонент иммуносупрессорной среды (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519). PD-L1 связывается с одним из двух соингибиторов Т-клеток PD-1 и B7-1.

Термин "PD-1" относится к белку программируемой смерти 1, Т-клеточному соингибитору, также известному как CD279. Аминокислотная последовательность полноразмерного PD-1 представлена в GenBank под регистрационным номером NP_005009.2. Термин также включает в себя PD-1 или его фрагмент, соединенный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, такой как ROR1. Например, термин включает в себя последовательности, содержащие Fc мыши (mIgG2a) или Fc человека (hIgG1) на С-конце, соединенные с аминокислотными остатками 25-170 NP_005009.2 с заменой C93S. PD-1 представляет собой представителя семейства CD28/CTLA-4/ICOS Т-клеточных соингибиторов. PD-1 представляет собой белок из 288 аминокислот с внеклеточным N-концевым доменом, который является IgV-подобным, трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом, содержащим тирозинсодержащий ингибирующий мотив иммунорецептора (ITIM) и тирозинсодержащий свич-мотив иммунорецептора (ITSM) (Chattopadhyay et al. 2009, Immunol. Rev.). Рецептор PD-1 характеризуется наличием двух лигандов PD-L1 и PD-L2.

Термин "B7-1" относится к антигену активации Т-лимфоцитов, также известному как состимулирующий фактор CD80. B7-1 представляет собой мембранный рецептор из 288 аминокислот с внеклеточным N-концевым доменом, который содержит IgV-подобную (aa 37-138) и IgC-подобную (aa 154-232) области, трансмембранным доменом (aa 243-263) и С-концевой внутриклеточной областью (aa 263-288). Аминокислотная последовательность полноразмерного B7-1 представлена в GenBank под регистрационным номером NP_005182.1.

Используемый в настоящем документе термин "Т-клеточный соингибитор" относится к лиганду и/или рецептору, который модулирует иммунный ответ посредством Т-клеточной активации или супрессии. Термин "Т-клеточный соингибитор", также известный как Т-клеточная сосигнальная молекула, включает в себя без ограничения PD-1, белок гена активации лимфоцита 3 (LAG-3, также известный как CD223), антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, Т-клеточный иммуноглобулин и муцин-3 (TIM3), Т-клеточный иммунорецептор с иммуноглобулином и ITIM (TIGIT; также известный как VSIG9), ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LAIR1; также известный как CD305), индуцируемый Т-клеточный состимулятор (ICOS; также известный как CD278), B7-1 (CD80) и CD160.

Каждая тяжелая цепь состоит из вариационной области тяжелой цепи ("HCVR" или "VH") и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из вариационной области легкой цепи ("LCVR" или "VL") и константной области легкой цепи (C_L). Области

V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, которые называются каркасными областями (FR). Каждая из V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно определенным вариантам осуществления FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) может быть идентичной последовательностям зародышевой линии человека или может быть естественным или искусственным путем модифицированной. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании сравнительного анализа двух или более CDR.

Также возможна замена одного или нескольких остатков CDR или пропуск одной или нескольких CDR. В научной литературе были описаны антитела, которые для связывания могут обходиться без одной или двух CDR. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали контактные области между антителами и их антигенами на основании опубликованных кристаллических структур и пришли к выводу, что только приблизительно одна пятая - одна третья остатков CDR фактически контактирует с антигеном. Padlan также обнаружил многие антитела, в которых одна или две CDR не характеризуются наличием аминокислот в контакте с антигеном (см. также, Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 зачастую не являются необходимыми) из областей CDR согласно Kabat, лежащих за пределами CDR согласно Chothia, с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или ее остаток(остатки) пропущен(ы), как правило, они замещаются аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности антитела человека или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замещения также могут быть выбраны эмпирически. Эмпирические замены могут являться консервативными или неконсервативными заменами.

Раскрытые в настоящем документе полностью человеческие моноклональные антитела против PD-L1 могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко выявить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Согласно настоящему раскрытию предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрываемых в настоящем документе, при этом одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных и/или CDR областей мутированы по отношению к соответствующему(им) остатку(ам) последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело, или по отношению к соответствующему(им) остатку(ам) другой последовательности зародышевой линии человека, или по отношению к консервативной аминокислотной замене соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в настоящем документе обобщенно называются "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области, начиная с раскрытых в настоящем документе последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепей, сможет без труда получить различные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления все каркасные и/или CDR остатки в пределах доменов V_H и/или V_L мутируют обратно с получением остатков, встречающихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки мутируют обратно по отношению к исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, встречающиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, встречающиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков мутируют по отношению к соответствующему(им) остатку(ам) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально произошло антитело). Более того, антитела в соответствии с настоящим раскрытием могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных и/или CDR областей, например, при этом определенные отдельные остатки мутируют по отношению к соответствующему остатку конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют по отношению к соответствующему остатку другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко тестировать в отношении одного или нескольких требуемых свойств, таких как, улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (если таковые имеются), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, предусмотрены

объемом настоящего раскрытия.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены полностью человеческие моноклональные антитела против PD-L1, содержащие варианты любой из раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, характеризующиеся одной или несколькими консервативными заменами. Например, согласно настоящему раскрытию предусмотрены антитела против PD-L1, характеризующиеся аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д., консервативными аминокислотными заменами относительно любой из раскрываемых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR. Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "антитело человека" включает в себя антитела, характеризующиеся переменными и константными областями, происходящими из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. mAb человека в соответствии с настоящим раскрытием могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Тем не менее, не предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "антитело человека" включает в себя mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были привиты на последовательности FR человека. Используемый в настоящем документе термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" относится к биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам и их антигенсвязывающим фрагментам. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы могут являться специфическими в отношении различных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении эпитопов более чем одного целевого полипептида. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может представлять собой отдельный мультифункциональный полипептид, или она может представлять собой мультимерный комплекс из двух или более полипептидов, которые ковалентно или нековалентно соединены друг с другом. Термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" включает в себя антитела в соответствии с настоящим раскрытием, которые могут быть связаны или могут соэкспрессироваться с другой функциональной молекулой, например, с другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, с помощью химического сочетания, генетического слияния, нековалентной связи или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными структурными единицами, такими как белок или его фрагмент, с получением биспецифической или мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы со второй специфичностью связывания. Согласно настоящему раскрытию термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" также включает в себя биспецифические, триспецифические или мультиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Согласно определенным вариантам осуществления антитело в соответствии с настоящим раскрытием функционально связано с другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с получением биспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Биспецифические и мультиспецифические антитела в соответствии с настоящим раскрытием описаны в другом месте в настоящем документе.

Термин "специфически связывает" или "специфически связывается с" или подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным при физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать равновесной константой диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно 1×10^{-8} М или меньше (например, меньшая K_D означает более сильное связывание). Способы определения того, связываются ли две молекулы специфически, хорошо известны в уровне техники и включают в себя, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и подобное. Как описано в настоящем документе, с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, были идентифицированы антитела, которые специфически связываются с PD-L1. Более того, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в PD-L1 и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифические, которые связываются с двумя различными областями PD-L1, тем не менее, рассматривают как антитела, которые "специфически связывают", как используется в настоящем документе.

Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и подобное включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с PD-L1.

Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое по сути не включает в себя другие антитела (Ab), характеризующиеся другими

антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-L1, или его фрагмент, по сути не включает в себя Ab, которые специфически связываются с антигенами, отличными от PD-L1).

Используемый в настоящем документе термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет проанализировать биомолекулярные взаимодействия в режиме реального времени путем обнаружения изменений в концентрациях белка в пределах биосенсорной матрицы, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden и Piscataway, N.J.).

Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин " K_D " относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с конкретным сайтом связывания антигена в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Отдельный антиген может иметь более чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут характеризоваться различными биологическими эффектами. Термин "эпитоп" также относится к сайту на антигене, с которым реагируют В- и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, которая связывается антителом. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, представляют собой подгруппу структурных эпитопов и содержат такие остатки, которые вносят прямой вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, то есть состоящими из нелинейных аминокислот. Согласно определенным вариантам осуществления эпитопы могут включать в себя детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и согласно определенным вариантам осуществления могут характеризоваться конкретными трехмерными структурными характеристиками и/или конкретными характеристиками заряда.

Термин "существенная идентичность" или "по сути идентичная", относящийся к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) наблюдается идентичность нуклеотидных последовательностей по меньшей мере у приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, согласно измерению с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по сути сходный" означает, что две пептидных последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпа по умолчанию, обладают по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95, 98 или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются на консервативные аминокислотные замены. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, характеризующимся боковой цепью (группой R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена не будет по сути изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства можно отрегулировать в сторону повышения для корректировки в отношении консервативной природы замены. Средства для проведения такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают в себя 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидо-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат; и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой следующие: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативное замещение представляет собой любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45, включенной в настоящий документ посредством ссылки. "Умеренно консервативное" замещение представляет собой любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250. Сходство последовательностей для полипептидов, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков проверяет соответствие сходных последовательностей с использованием величин сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспе-

чение GCG содержит такие программы, как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и идентичность последовательностей в процентах для областей наилучшего перекрытия между последовательностями поискового запроса и поиска (Pearson (2000), выше). Другой предпочтительный алгоритм при сравнении последовательности в соответствии с настоящим раскрытием с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, представляет собой компьютерную программу BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, и (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Под фразой "терапевтически эффективное количество" подразумевают количество, которое производит требуемый эффект, для которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения, и его сможет определить специалист в данной области с использованием известных техник (см., например, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Используемый в настоящем документе термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в облегчении, профилактике и/или лечении заболевания или нарушения, такого как хроническая вирусная инфекция, злокачественная опухоль или аутоиммунное заболевание.

II. Меченные радиоактивной меткой иммуноконъюгаты антител против PD-L1 для иммуно-ПЭТ визуализации.

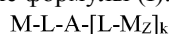
В настоящем документе представлены меченные радиоактивной меткой антигенсвязывающие белки, которые связывают лиганд 1 программируемой смерти клетки (PD-L1). Согласно некоторым вариантам осуществления меченные радиоактивной меткой антигенсвязывающие белки включают в себя антигенсвязывающий белок, ковалентно соединенный с одним или несколькими хелатирующими фрагментами, которые являются химическими фрагментами, способными хелатировать позитронный излучатель.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлены антигенсвязывающие белки, которые связывают PD-L1, например, антитела, при этом указанные антигенсвязывающие белки, которые связывают PD-L1, ковалентно связаны с одним или несколькими фрагментами, имеющими следующую структуру:



при этом L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; а z независимо в каждом случае равняется 0 или 1; и при этом по меньшей мере один из z равняется 1.

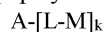
Согласно некоторым вариантам осуществления меченный радиоактивной меткой антигенсвязывающий белок представляет собой соединение формулы (I):



(I),

при этом A представляет собой белок, который связывает PD-L1; L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; z равняется 0 или 1; и k равняется целому числу от 0 до 30. Согласно некоторым вариантам осуществления k равняется 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления меченный радиоактивной меткой антигенсвязывающий белок представляет собой соединение формулы (II):



(II),

при этом A представляет собой белок, который связывает PD-L1; L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; и k равняется целому числу от 1 до 30.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлены композиции, включающие в себя конъюгат, имеющий следующую структуру:



при этом A представляет собой белок, который связывается PD-L1; L представляет собой хелатирующий фрагмент; и k равняется целому числу от 1 до 30; при этом конъюгат хелатируется с позитронным излучателем в количестве, достаточном для обеспечения специфической активности, подходящей для клинической ПЭТ визуализации. Подходящие связывающие белки, хелатирующие фрагменты и позитронные излучатели представлены ниже.

A. PD-L1 связывающие белки.

Подходящими связывающими PD-L1 белками являются белки, которые специфически связываются с PD-L1, в том числе описанные в публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1,

включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративные анти-тела против PD-L1 в соответствии с настоящим раскрытием приведены в табл. 1 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, также представленной ниже.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антигена	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR 3
H2M8306N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M8307N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M8309N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M8310N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M8312N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M8314N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M8316N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M8317N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M8321N	130	132	134	136	138	140	142	144
H2M8323N	146	148	150	152	154	156	158	160
H2M8718N	162	164	166	168	170	172	174	176
H2M8718N2	178	180	182	184	170	172	174	176
H2M8719N	186	188	190	192	194	196	198	200
H1N9323P	202	204	206	208	210	212	214	216
H1N9327P	218	220	222	224	226	228	230	232
H1N9329P	234	236	238	240	242	244	246	248
H1N9336P	250	252	254	256	258	260	262	264
H1N9344P2	266	268	270	272	274	276	278	280
H1N9345P2	282	284	286	288	274	276	278	280
H1N9351P2	290	292	294	296	274	276	278	280
H1N9354P2	298	300	302	304	274	276	278	280
H1N9364P2	306	308	310	312	274	276	278	280
H1N9373P2	314	316	318	320	274	276	278	280
H1N9382P2	322	324	326	328	274	276	278	280
H1N9387P2	330	332	334	336	274	276	278	280
H1N9396P2	338	340	342	344	274	276	278	280

В табл. 1 излагаются идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител против PD-L1.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1, или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1, или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), включающую в себя любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, включающим в себя пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против PD-L1, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/170, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/274, 290/274, 298/274, 306/274,

314/274, 322/274, 330/274 и 338/274. Согласно некоторым вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 82/90 (например, H2M8314N), 162/170 (например, H2M8718N), 306/274 (например, H1H9364P2) и 314/274 (например, H1H9373P2). Согласно некоторым другим вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID NO: 98/106 (например, H2M8316N), 146/154 (например, H2M8323N), 290/274 (например, H1H9351P2) и 330/274 (например, H1H9387P2).

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в табл. 1 или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в табл. 1 или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 1 или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в табл. 1 или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в табл. 1 или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 1 или по сути схожей с ними последовательности, характеризующейся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя пару аминокислотных последовательностей HCVR3 и LCVR3 (HCVR3/LCVR3), включающую в себя любую из аминокислотных последовательностей HCVR3, приведенных в табл. 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR3, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, включающим в себя пару аминокислотных последовательностей HCVR3/LCVR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против PD-L1, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 88/96 (например, H2M8314N), 168/176 (например, H2M8718N), 312/280 (например, H1H9364P2), и 320/280 (например, H1H9373P2). Согласно некоторым другим вариантам осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 104/112 (например, H2M8316N), 152/160 (например, H2M8323N), 296/280 (например, H1H9351P2) и 336/280 (например, H1H9387P2).

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из иллюстративных антител против PD-L1, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84-86-88-92-94-96 (например, H2M8314N); 164-166-168-172-174-176 (например, H2M8718N); 308-310-312-276-278-280 (например, H1H9364P2) и 316-318-320-276-278-280 (например, H1H9373P2). Согласно неко-

торым другим вариантам осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 -LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100-102-104-108-110-112 (например, H2M8316N); 148-150-152-156-158-160 (например, H2M8323N); 292-294-296-276-278-280 (например, H1H9351P2) и 332-334-336-276-278-280 (например, H1H9387P2). Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащий в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определяемой в любом из иллюстративных антитела против PD-L1, приведенных в табл. 1. Например, согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающие в себя набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82/90 (например, H2M8314N), 98/106 (например, H2M8316N), 146/154 (например, H2M8323N), 162/170 (например, H2M8718N), 290/274 (например, H1H9351P2), 306/274 (например, H1H9364P2), 314/274 (например, H1H9373P2) и 330/274 (например, H1H9387P2). Способы и методики для идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в уровне техники и могут быть использованы для идентификации CDR в определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрываемых в настоящем документе. Иллюстративные правила, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение согласно AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на вариативности последовательностей, определение согласно Chothia основано на расположении областей структурных петель, а определение согласно AbM является компромиссом между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Также имеются общедоступные базы данных также для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающими белками являются антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за специфическое связывание с PD-L1 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, включающим в себя CDR из HCVR и CDR из LCVR, при этом каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, приведенных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающими белками являются выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1, могут связываться с тем же эпитопом на PD-L1, что и PD-1/B7-1, или могут связываться с другим эпитопом на PD-L1, чем PD-1/B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием, которые блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1, включают в себя CDR из HCVR, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1; и CDR из LCVR, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1.

Согласно альтернативным вариантам осуществления связывающими белками являются выделенные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые не блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к выделенным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают PD-L1, при этом антитела или их антигенсвязывающие фрагменты усиливают связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые усиливают связывание PD-L1 с PD-1/B7-1, включают в себя CDR из HCVR, при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 66, 114, 130, 202, 218, 266, 282, 298, 322 и 338; и CDR из LCVR, при этом LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 74, 122, 138, 210, 226 и 274. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают в себя пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26 (например, H2M8307N), 66/74 (например, H2M8312N), 114/122 (например, H2M8317N), 130/138 (например, H2M8321N), 202/210 (например, H1H9323P), 218/226 (например, H1H9327P), 266/274 (например, H1H9344P2), 282/274 (например, H1H9345P2), 298/274 (например, H1H9354P2), 322/274 (например, H1H9382P2) и 338/274 (например, H1H9396P2).

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающими белками являются антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PD-L1 от человека или других видов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела могут связываться с PD-L1 человека и/или PD-L1 яванского макака. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающими белками являются антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, включающим в себя CDR из

HCVR и CDR из LCVR, при этом каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, приведенных в табл. 1.

Согласно одному варианту осуществления связывающим белком является выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые обладают одной или несколькими из следующих характеристик: (а) блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1; (б) специфически связываются с PD-L1 человека и/или PD-L1 яванского макака; (с) ингибируют пролиферацию Т-клеток в анализе на основе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR) и (d) увеличивают секрецию IL-2 и/или гамма-интерферона в анализе MLR.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим белком является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут связываться специфически с PD-L1 агонистическим образом, т.е. они усиливают или стимулируют связывание и/или активность PD-L1; согласно другим вариантам осуществления антитело может связываться специфически с PD-L1 антагонистическим образом, т.е. оно блокирует связывание PD-L1 с его рецептором.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются биспецифическими, включающими в себя первую специфичность связывания с PD-L1 и вторую специфичность связывания для второго целевого эпитопа. Вторым целевым эпитопом может представлять собой другой эпитоп на PD-L1 или на другом белке, таком как Т-клеточный соингибитор. Согласно определенным вариантам осуществления целевой эпитоп может находиться на другой клетке, в том числе, например, на другой Т-клетке, В-клетке, опухолевой клетке, клетке аутоиммунной ткани или инфицированной вирусом клетке.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител связывают мономерный PD-L1 (например, при 25°C или при 37°C) с K_D менее чем приблизительно 318 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают мономерный PD-L1 с K_D менее чем приблизительно 300 пМ, менее чем приблизительно 250 пМ, менее чем приблизительно 150 пМ, менее чем приблизительно 100 пМ или менее чем приблизительно 50 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител связывают димерный PD-L1 (например, при 25°C или при 37°C) с K_D менее чем приблизительно 15 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают димерный PD-L1 с K_D менее чем приблизительно 12 пМ, менее чем приблизительно 10 пМ, менее чем приблизительно 8 пМ или менее чем приблизительно 5 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают PD-L1 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (например, при 25°C или при 37°C) с K_D менее чем приблизительно 28 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают PD-L1 яванского макака с K_D менее чем приблизительно 25 нМ, менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 15 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ или менее чем приблизительно 5 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител связывают PD-L1 с диссоциационным периодом полужизни ($t_{1/2}$) более чем приблизительно 1 мин, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связывают PD-L1 с $t_{1/2}$ более чем приблизительно 5 мин, более чем приблизительно 10 мин, более чем приблизительно 30 мин, более чем приблизительно 50 мин, более чем приблизительно 60 мин, более чем приблизительно 70 мин, более чем приблизительно 80 мин, более чем приблизительно 90 мин, более чем приблизительно 100 мин, более чем приблизительно 200 мин, более чем приблизительно 300 мин, более чем приблизительно 400 мин, более чем приблизительно 500 мин, более чем приблизительно 600 мин, более чем приблизительно 700 мин или более чем приблизительно 800 мин, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C или 37°C,

например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1 (например, формата захвата mAb или захвата антигена), или по сути подобного анализа.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание PD-L1 с PD-1 с IC_{50} менее чем приблизительно 770 нМ, как определено с использованием иммуноанализа на основе ELISA, например, как показано в примере 4 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют связывание PD-L1 с B7-1 с IC_{50} менее чем приблизительно 10 нМ как определено с использованием иммуноанализа на основе ELISA, например, как показано в примере 4 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, или по сути подобного анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты связываются с PD-L1 и усиливают связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с внеклеточным доменом PD-L1 или с фрагментом домена. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с более чем одним доменом (перекрестно реакционноспособные антитела). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела связываются с эпитопом, расположенным во внеклеточном домене, включающем в себя аминокислотные остатки 19-239 NP_054862.1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела функционируют путем блокирования или ингибирования PD-1-связывающей или B7-1-связывающей активности, ассоциированной с PD-L1, путем связывания с любой другой областью или фрагментом полноразмерного белка. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела ослабляют или модулируют взаимодействие между PD-L1 и PD-1/B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела являются биспецифическими антителами. Биспецифические антитела могут связывать один эпитоп в одном домене и также могут связывать второй эпитоп в другом домене PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические антитела связывают два разных эпитопа в одном и том же домене. Согласно одному варианту осуществления мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первую специфичность связывания антигена, при этом первая специфичность связывания содержит внеклеточный домен или его фрагмент PD-1; и вторую специфичность связывания антигена с другим эпитопом PD-L1. Согласно другому варианту осуществления мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первую специфичность связывания антигена, при этом первая специфичность связывания содержит внеклеточный домен или его фрагмент B7-1; и вторую специфичность связывания антигена с другим эпитопом PD-L1. Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент является полностью человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с PD-L1, при этом антитело или его фрагмент обладает одной или несколькими из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 186, 202, 218, 234, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306, 314, 322, 330 и 338, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 194, 210, 226, 242, 258 и 274, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 280, 288, 296, 304, 312, 320, 328, 336 и 344, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 200, 216, 232, 248, 264 и 280, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 292, 300, 308, 316, 324, 332 и 340, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 294, 302, 310, 318, 326, 334 и 342, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 196, 212, 228, 244, 260 и 276, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей.

98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 198, 214, 230, 246, 262 и 278, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (v) является мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, включающей в себя первую специфичность связывания с PD-L1 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из PD-L1, опухолеспецифического антигена, антигена инфицированной вирусом клетки и Т-клеточного соингибитора; (vi) связывается с PD-L1 человека с K_D от приблизительно 4 пМ до приблизительно 645 нМ; (vii) связывается с PD-L1 яванского макака с K_D от приблизительно 70 пМ до приблизительно 400 нМ; (viii) блокирует или усиливает связывание PD-L1 с PD-1 с $IC_{50} \leq 770$ пМ; (ix) блокирует или усиливает связывание PD-L1 с B7-1 с $IC_{50} \leq 10$ нМ; (x) блокирует индуцированную PD-1 Т-клеточную отрицательную регуляцию и/или восстанавливает Т-клеточную передачу сигнала в анализе репортерного гена люциферазы в Т-клетках/APC; (xi) стимулирует Т-клеточную пролиферацию и активность в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR); (xii) индуцирует продуцирование IL-2 и/или IFN γ в анализе MLR; и (xiii) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъектов со злокачественной опухолью. Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент является полностью человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1, при этом антитело или его фрагмент обладает одной или несколькими из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82, 98, 146, 162, 290, 306, 314 и 330, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 90, 106, 154, 170 и 274, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 88, 104, 152, 168, 296, 312, 320 и 336, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 112, 160, 176, и 280, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84, 100, 148, 164, 292, 308, 316 и 332, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86, 102, 150, 166, 294, 310, 318 и 334, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 92, 108, 156, 172 и 276, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94, 110, 158, 174 и 278, или по сути схожую с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей; (v) является мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, включающей в себя первую специфичность связывания с PD-L1 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого эпитопа PD-L1, опухолеспецифического антигена, антигена инфицированной вирусом клетки и Т-клеточного соингибитора; (vi) связывается с PD-L1 человека с $K_D \leq 10^{-10}$ М; (vii) связывается с PD-L1 яванского макака с $K_D \leq 10^{-7}$ М; (viii) блокирует индуцированную PD-1 Т-клеточную отрицательную регуляцию и/или восстанавливает Т-клеточную передачу сигнала в анализе репортерного гена люциферазы в Т-клетках/APC; (xi) стимулирует Т-клеточную пролиферацию и активность в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR); (xii) индуцирует продуцирование IL-2 и/или IFN γ в анализе MLR; и (xiii) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъектов со злокачественной опухолью.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела против PD-L1 или их антигенсвязывающие фрагменты связывают эпитоп в пределах любой одной или нескольких из областей, иллюстративно представленных в PD-L1, либо в натуральной форме, либо полученных рекомбинантно, или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием связываются с внеклеточной областью, включающей в себя одну или несколько аминокислот, выбран-

ных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 19-239 PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием связываются с областью, включающей в себя одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 1-221 PD-L1 яванского макака.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием, показанные в табл. 1, взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных остатков, варьирующих от приблизительно положения 19 до приблизительно положения 130 в PD-L1; или аминокислотных остатков, варьирующих от приблизительно положения 130 до приблизительно положения 153 в PD-L1; или аминокислотных остатков, варьирующих от приблизительно положения 153 до приблизительно положения 210 в PD-L1; или аминокислотных остатков, варьирующих от приблизительно положения 210 до приблизительно положения 239 в PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела против PD-L1 связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описываемых в настоящем документе в табл. 1, или антитело, имеющее последовательности CDR любого из иллюстративных антител, описываемых в табл. 1. Подобным образом, подходящие антитела также включают в себя антитела против PD-L1, которые конкурируют за связывание с PD-L1 или фрагментом PD-L1 с любым из конкретных иллюстративных антител, описываемых в настоящем документе в табл. 1, или антитело, имеющее последовательности CDR любого из иллюстративных антител, описываемых в табл. 1. Например, подходящие антитела включают в себя антитела против PD-L1, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 с одним или несколькими антителами, определяемыми в примере 6 настоящего документа (например, H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2 и H2aM8306N). Настоящее раскрытие также относится к антителам против PD-L1, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 с одним или несколькими антителами, определяемыми в примере 6 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1 (например, H1H9396P2, H2aM8317N, H2aM8321N, H1H9323P, H1H9382P2, H1H9344P2, H1H9345P2 и H1H9354P2).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описываемые в настоящем документе, специфически связываются с PD-L1 и модулируют взаимодействие PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Антитела против PD-L1 могут связываться с PD-L1 с высокой аффинностью или с низкой аффинностью. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела являются блокирующими антителами, при этом антитела связываются с PD-L1 и блокируют взаимодействие PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления блокирующие антитела в соответствии с настоящим раскрытием блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1 и/или стимулируют или усиливают активацию Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления блокирующие антитела применимы для стимуляции или усиления иммунного ответа и/или для лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли или хронической вирусной инфекции. Антитела при введении субъекту, нуждающемуся в этом, могут уменьшать хроническую инфекцию, вызванную вирусом, таким как HIV, LCMV или HBV, у субъекта. Они могут быть использованы для ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта. Они могут быть использованы отдельно или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими фрагментами или методами, известными в уровне техники для лечения злокачественной опухоли или вирусной инфекции. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела против PD-L1, которые связываются с PD-L1 с низкой аффинностью, используют в виде мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, при этом первая специфичность связывания связывается с PD-L1 с низкой аффинностью, а вторая специфичность связывания связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого эпитопа в PD-L1, Т-клеточного соингибитора, такого как PD-1, опухолеспецифического антигена и специфического в отношении инфицированной клетки антигена.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием являются агонистическими антителами, при этом антитела связываются с PD-L1 и усиливают взаимодействие PD-L1 и PD-1/B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления активирующие антитела усиливают связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1 и/или ингибируют или подавляют активацию Т-клеток. Активирующие антитела в соответствии с настоящим раскрытием могут быть применимы для ингибирования иммунного ответа у субъекта и/или для лечения аутоиммунного заболевания.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела против PD-L1 являются мультиспецифическими антигенсвязывающими молекулами, при этом они включают в себя первую специфичность связывания с PD-L1 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого эпитопа PD-L1, Т-клеточного соингибитора, такого как PD-1, опухолеспецифического антигена и специфического для инфицированной клетки антигена. Согласно некоторым вариантам осуществления первая специфичность связывания связывается с PD-L1 с низкой аффинностью, например, с K_D 10^{-8} М, 10^{-7} М или больше.

Некоторые антитела против PD-L1 в соответствии с настоящим раскрытием способны связываться с PD-L1 и нейтрализовать его активность, как определено с помощью *in vitro* или *in vivo* анализов. Способность антител в соответствии с настоящим раскрытием связываться с PD-L1 и нейтрализовать его

активность, может быть измерена с использованием любого стандартного способа, известного специалистам в данной области, включающего в себя анализы связывания или анализы активности, описываемые в настоящем документе.

Неограничивающие иллюстративные *in vitro* анализы для измерения связывающей активности иллюстрируются в примере 3 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1. В примере 3 аффинности связывания и кинетические константы человеческого антитела против PD-L1 в отношении PD-L1 человека и PD-L1 яванского макака определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса и измерения выполняли на аппарате T200 Biacore. В примерах 4 и 5 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1 анализы блокирования использовали для определения способности антитела против PD-L1 блокировать PD-L1-связывающую способность с PD-1 или с B7-1 *in vitro*. В примере 6 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1 анализы блокирования использовали для определения перекрестной конкуренции между различными антителами против PD-L1. В примере 7 публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1 описывается связывание антител с клетками, надэкспрессирующими PD-L1. В примере 8 патентного документа США № US 2015-0203580 A1 использовали люциферазный анализ для определения способности антител против PD-L1 antagonизировать передачу сигнала PD-1/PD-L1 в Т-клетках.

Если определено не указано иное, используемый в настоящем документе термин "антитело" следует понимать как включающий в себя молекулы антител, содержащие две тяжелых цепи иммуноглобулина и две легких цепи иммуноглобулина (т.е. "полные молекулы антитела"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и подобные включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с PD-L1. Фрагмент антитела может включать в себя фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. Согласно определенным вариантам осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептиду или его фрагменту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Согласно таким вариантам осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" включает в себя, например, внеклеточный домен PD-1, который специфически связывается с PD-L1. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как обработка протеолитическими ферментами или рекомбинантные методики генной инженерии, включающие в себя манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующую переменные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК является известной и/или легко доступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, библиотеки фагов-антител), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и провести с ней химические манипуляции или использовать методики молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя следующее: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетраатела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтическое средство на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также предусмотрены в пределах используемого в настоящем документе выражения "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может характеризоваться любым размером или аминокислотным составом и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая является смежной или находится в одной рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, характеризующихся доменом V_H, связанным с доменом V_L, домены V_H и V_L могут быть расположены друг относительно друга в любом подходящем расположении. Например, переменная область может являться димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L. Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и кон-

стантных доменов, которые можно обнаружить в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела в соответствии с настоящим раскрытием, включают в себя: (i) V_H-C_{H1} ; (ii) V_H-C_{H2} ; (iii) V_H-C_{H3} ; (iv) $V_H-C_{H1}-C_{H2}$; (v) $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (vi) $V_H-C_{H2}-C_{H3}$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_{H1} ; (ix) V_L-C_{H2} ; (x) V_L-C_{H3} ; (xi) $V_L-C_{H1}-C_{H2}$; (xii) $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (xiii) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$ и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе в любой из перечисленных выше иллюстративных конфигураций, переменные и константные домены могут быть либо напрямую соединены друг с другом, либо могут быть соединены с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые дают в результате гибкое или полугибкое соединение между смежными переменным и/или константным доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела в соответствии с настоящим раскрытием может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентном соединении друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)). Аналогично полным молекулам антител антигенсвязывающие фрагменты могут являться моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере два различных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с различным эпитопом на одном и том же антигене. Любой мультиспецифический формат антител, в том числе иллюстративные биспецифические форматы антител, раскрываемые в настоящем документе, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела в соответствии с настоящим раскрытием с использованием рутинных методик, доступных в уровне техники.

Антитела против PD-L1 и фрагменты антител в соответствии с настоящим раскрытием включают в себя белки, характеризующиеся аминокислотными последовательностями, которые отличаются от таковых в описанных антителах, но которые сохраняют способность связываться с PD-L1. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одну или несколько вставок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая является по сути эквивалентной биологической активности описанных антител. Подобным образом, кодирующие антитело последовательности ДНК в соответствии с настоящим раскрытием включают в себя последовательности, которые содержат одну или несколько вставок, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, являющиеся по сути биоэквивалентом антителу или фрагменту антитела в соответствии с настоящим раскрытием.

Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, чья скорость и степень абсорбции не демонстрирует значительного различия при введении в одной и той же молярной дозе при сходных экспериментальных условиях, или в однократной дозе, или в многократных дозах. Не-которые антитела будут рассматриваться эквивалентными или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными по степени своей абсорбции, но не по своей скорости абсорбции, и все еще могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены на этикетке, не являются значимыми для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении, и считаются незначительными с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствует клинически значимые различия в их безопасности, чистоте или эффективности.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если больной может переключиться один или несколько раз с эталонного продукта на биологический продукт без прогнозируемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включающих в себя клинически значимое изменение иммуногенности или пониженную эффективность, по сравнению с непрерывной терапией без такого переключения.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют посредством общего механизма или механизмов действия для состояний или условий применения, в той степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью *in vivo* и/или *in vitro* способов. Параметры биоэквивалентности включают в себя, например, (a) *in vivo* тестирование на людях или других млекопитающих, при котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию от времени; (b) *in vitro* тестирование, которое соотносит с *in vivo* данными биодоступности в отношении человека и которое является достаточно прогностическим в отношении этих данных; (c) *in vivo* тестирование на людях или других млекопитающих, при котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его цели) измеряют как функцию от времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом испытании, которое устанавливает безопасность, эффективность, или биодоступность, или биоэквивалентность антитела. Биоэк-

вивалентные варианты антител в соответствии с настоящим раскрытием можно сконструировать, например, путем создания различных замен остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно удалить или заменить другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных межмолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего раскрытия антитела против PD-L1 включают в себя домен Fc, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислотной pH по сравнению с нейтральной pH. Например, настоящее раскрытие относится к антителам против PD-L1, содержащим мутацию в области C_H2 или C_H3 домена Fc, при этом мутация(и) увеличивает(ют) аффинность домена Fc по отношению к FcRn в кислом окружении (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают в себя, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация включает в себя модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259 I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); а также модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). Согласно еще одному варианту осуществления модификация включает в себя модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, настоящее раскрытие относится к антителам против PD-L1, включающим в себя домен Fc, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); а также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Согласно одному варианту осуществления настоящее раскрытие относится к антителам против PD-L1, включающим в себя домен Fc, содержащий мутацию S108P в шарнирной области IgG4 для стимуляции стабилизации димера. Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций домена Fc и другие мутации в пределах варьируемых доменов антител, раскрываемых в настоящем документе, рассмотрены в объеме настоящего раскрытия.

Настоящее раскрытие также относится к антителам против PD-L1, включающим в себя химерную константную (C_H) область тяжелой цепи, при этом химерная область C_H содержит сегменты, происходящие из областей C_H более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела в соответствии с настоящим раскрытием могут содержать химерную область C_H, содержащую часть или весь домен C_H2, происходящий из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, комбинированную с частью или всем доменом C_H3, происходящим из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно определенным вариантам осуществления антитела в соответствии с настоящим раскрытием содержат химерную область C_H, характеризующуюся химерной шарнирной областью. Например, химерный шарнир может содержать "верхнюю шарнирную" аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки от положения 216 до положения 227 согласно нумерации EU), происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, комбинированную с "нижней шарнирной" последовательностью (аминокислотные остатки от положения 228 до положения 236 согласно нумерации EU), происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно определенным вариантам осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, происходящие из верхнего шарнира IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, происходящие из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную область C_H, описываемую в настоящем документе, может согласно определенным вариантам осуществления проявлять модифицированные эффекторные функции Fc, не оказывая неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, USSN. 14/170166, поданную 31 января 2014 г., полное раскрытие которой тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки).

В. Позитронные излучатели и хелатирующие фрагменты.

Подходящие позитронные излучатели включают в себя без ограничения такие, которые образуют стабильные комплексы с хелатирующим фрагментом и характеризуются физическими периодами полу-

жизни, подходящими для целей иммуно-ПЭТ визуализации. Иллюстративные позитронные излучатели включают в себя без ограничения ^{89}Zr , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{44}Sc и ^{86}Y . Подходящие позитронные излучатели также включают в себя такие, которые непосредственно связываются со связывающим PD-L1 белком, в том числе без ограничения ^{76}Br и ^{124}I , и такие, которые вводятся через простетическую группу, например, ^{18}F .

Хелатирующие фрагменты, описываемые в настоящем документе, представляют собой химические фрагменты, которые ковалентно соединены со связывающим PD-L1 белком, например, антителом против PD-L1, и включают в себя часть, способную хелатировать позитронный излучатель, т.е. способную реагировать с позитронным излучателем с образованием координированного хелатного комплекса. Подходящие фрагменты включают в себя такие, которые обеспечивают эффективную загрузку конкретного металла и образуют комплексы металл-хелатор, которые являются достаточно стабильными *in vivo* для диагностических применений, например, для иммуно-ПЭТ визуализации. Иллюстративные хелатирующие фрагменты включают в себя такие, которые минимизируют диссоциацию позитронного излучателя и накопление в отложении минералов в кости, белках плазмы и/или костном мозге до степени, подходящей для диагностических применений.

Примеры хелатирующих фрагментов включают в себя без ограничения такие, которые образуют стабильные комплексы с позитронными излучателями ^{89}Zr , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{44}Sc и/или ^{86}Y . Иллюстративные хелатирующие фрагменты включают в себя без ограничения те, которые описаны в Nature Protocols, 5(4): 739, 2010; Bioconjugate Chem., 26(12): 2579 (2015); Chem Commun (Camb), 51(12): 2301 (2015); Mol. Pharmaceutics, 12: 2142 (2015); Mol. Imaging Biol., 18: 344 (2015); Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 37:250 (2010); Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging (2016). doi:10.1007/s00259-016-3499-x; Bioconjugate Chem., 26(12): 2579 (2015); в международной заявке № WO 2015/140212A1 и патенте США № US 5639879, включенных посредством ссылки во всей своей полноте.

Иллюстративные хелатирующие фрагменты также включают в себя без ограничения такие, которые включают в себя дезферриоксамин (DFO), 1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTA), диэтиленetriаминпентауксусную кислоту (DTPA), этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетра(метиленфосфиновую) кислоту (DOTP), 1R,4R,7R,10R)- α' α'' -тетраметил-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTMA), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусную кислоту (TETA), H₄остара, H₆phospa, H₂dedpa, H₅decapa, H₂azapa, HOPO, DO2A, 1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан (DOTAM), 1,4,7-триазациклононан-N,N',N''-триуксусную кислоту (NOTA), 1,4,7,10-тетракис(карбамоилметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан (DOTAM), 1,4,8,11-тетраазабицикло[6,6,2]гексадекан-4,11-уксусную кислоту (CB-TE2A), 1,4,7,10-тетраазациклододекан (циклен), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан (циклам), октадентатные хелаторы, гексадентатные хелаторы, хелаторы на основе фосфонатов, макроциклические хелаторы, хелаторы, включающие в себя макроциклические терефаламидные лиганды, бифункциональные хелаторы, хелаторы на основе фузарина С и производных фузарина С, триацетилфузаринин С (ТАФС), ферриоксамин Е (FOXЕ), ферриоксамин В (FOXВ), феррихром А (FCHA) и т.п.

Согласно некоторым вариантам осуществления хелатирующие фрагменты ковалентно связаны со связывающим PD-L1 белком, например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, через линкерный фрагмент, который ковалентно присоединяет хелатирующую часть хелатирующего фрагмента к связывающему белку. Согласно некоторым вариантам осуществления эти линкерные фрагменты образуются при реакции между реакционноспособным фрагментом связывающего PD-L1 белка, например, цистеином или лизином антитела, и реакционноспособным фрагментом, который присоединяется к хелатору, включающему в себя, например, п-изотиоцианатобензильную группу и реакционноспособные фрагменты, представленные в способах конъюгации ниже. Кроме того, такие линкерные фрагменты необязательно включают в себя химические группы, используемые для целей регулирования полярности, растворимости, стерических взаимодействий, жесткости и/или длины между хелатирующей частью и связывающим PD-L1 белком.

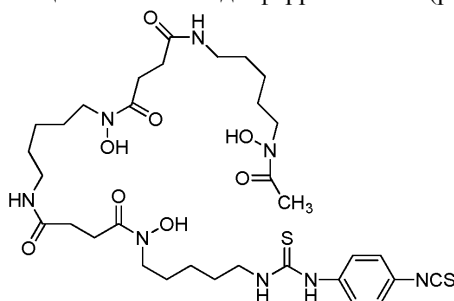
С. Получение меченных радиоактивной меткой конъюгатов антитела против PD-L1.

Меченные радиоактивной меткой конъюгаты антитела против PD-L1 могут быть получены путем (1) осуществления реагирования связывающего PD-L1 белка, например, антитела, с молекулой, включающей в себя хелатор для позитронного излучателя и фрагмент, реакционноспособный в отношении желаемого сайта конъюгации связывающего PD-L1 белка, и (2) загрузки желаемого позитронного излучателя.

Подходящие сайты конъюгации включают в себя без ограничения лизин и цистеин, оба из которых могут быть, например, нативными или сконструированными, и могут, например, присутствовать в тяжелой или легкой цепи антитела. Сайты конъюгации цистеина включают в себя без ограничения полученные путем мутации, вставки или восстановления дисульфидных связей антитела. Способы получения сконструированных с цистеином антител включают в себя без ограничения описанные в международной заявке №WO 2011/056983. Способы сайтспецифической конъюгации также могут быть использованы для направления реакции конъюгации на специфические сайты антитела, достижения желаемой стехиометрии и/или достижения желаемых отношений лекарственного средства к антителу (DAR). такие способы конъюгации известны специалистам в данной области и включают в себя без ограничения способ

цистеинового конструирования, ферментативный и хемоферментативный способы, предусматривающие без ограничения конъюгацию глутамина, конъюгацию Q295 и опосредованную трансклутаминазой конъюгацию, а также те, которые описаны в J. Clin. Immunol., 36: 100 (2016), включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Подходящие фрагменты, реакционноспособные в отношении желаемого сайта конъюгации, обычно обеспечивают эффективное и легкое связывание связывающего PD-L1 белка, например, антитела и хелатора для позитронного излучателя. Фрагменты, реакционноспособные в отношении лизиновых и цистеиновых сайтов, включают в себя электрофильные группы, которые известны специалистам в данной области. Согласно некоторым аспектам, когда желаемым сайтом конъюгации является лизин, реакционноспособный фрагмент представляет собой изотиоцианат, например, п-изотиоцианатобензильную группу или реакционноспособный сложный эфир. Согласно некоторым аспектам, когда желаемым сайтом конъюгации является цистеин, реакционноспособный фрагмент представляет собой малеимид.

Когда хелатор представляет собой дезферриоксамин (DFO), подходящие реакционноспособные фрагменты включают в себя без ограничения изотиоцианатобензильную группы, н-гидроксисукцинимидный сложный эфир, 2,3,5,6-тетрафторфенольный сложный эфир, н-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат и такие, которые описаны в BioMed Research International, Vol 2014, Article ID 203601, включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающим PD-L1 белком является антитело, а молекула, включающая в себя хелатор для позитронного излучателя и фрагмент, реакционноспособный в отношении сайта конъюгации, представляет собой п-изотиоцианатобензил-дезферриоксамин (p-SCN-Bn-DFO):



Загрузку позитронного излучателя осуществляют путем инкубации конъюгата связывающего PD-L1 белка и хелатора с позитронным излучателем в течение времени, достаточного для обеспечения координации указанного позитронного излучателя с хелатором, например, путем осуществления способов, описанных в представленных в настоящем документе примерах, или по сути подобного способа.

D. Иллюстративные варианты осуществления конъюгатов.

В настоящем раскрытии представлены меченные радиоактивной меткой конъюгаты антитела, включающие в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают человеческий лиганд 1 программируемой смерти клетки (PD-L1), хелатирующий фрагмент и позитронный излучатель.

Согласно некоторым вариантам осуществления хелатирующий фрагмент содержит хелатор, способное формировать комплекс с ^{89}Zr . Согласно некоторым вариантам осуществления хелатирующий фрагмент содержит дезферриоксамин. Согласно некоторым вариантам осуществления хелатирующий фрагмент представляет собой п-изотиоцианатобензил-дезферриоксамин.

Согласно некоторым вариантам осуществления позитронный излучатель представляет собой ^{89}Zr .

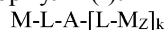
Согласно некоторым вариантам осуществления отношение хелатирующего фрагмента к антителу в конъюгате составляет от 1 до 2.

Согласно конкретному варианту осуществления хелатирующий фрагмент представляет собой п-изотиоцианатобензил-дезферриоксамин, а позитронный излучатель представляет собой ^{89}Zr . Согласно другому конкретному варианту осуществления хелатирующий фрагмент представляет собой п-изотиоцианатобензил-дезферриоксамин, позитронный излучатель представляет собой ^{89}Zr , а отношение хелатирующего фрагмента к антителу в конъюгате составляет от 1 до 2.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлены антигенсвязывающие белки, которые связывают PD-L1, при этом указанных антигенсвязывающие белки, которые связывают PD-L1, ковалентно связаны с одним или несколькими фрагментами, имеющими следующую структуру:



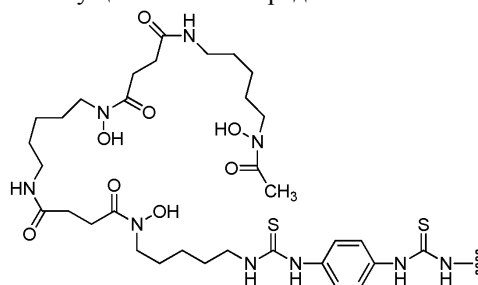
при этом L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; а z независимо в каждом случае равняется 0 или 1; и при этом по меньшей мере один из z равняется 1. Согласно некоторым вариантам осуществления меченный радиоактивной меткой антигенсвязывающий белок представляет собой соединение формулы (I):



(I),

при этом А представляет собой белок, который связывает PD-L1; L представляет собой хелатирующий фрагмент; М представляет собой позитронный излучатель; z равняется 0 или 1; и k равняется целому числу от 0 до 30. Согласно некоторым вариантам осуществления k равняется 1.

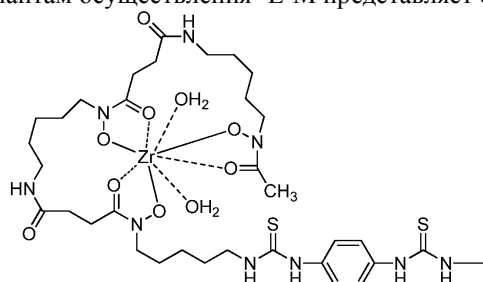
Согласно некоторым вариантам осуществления L представляет собой



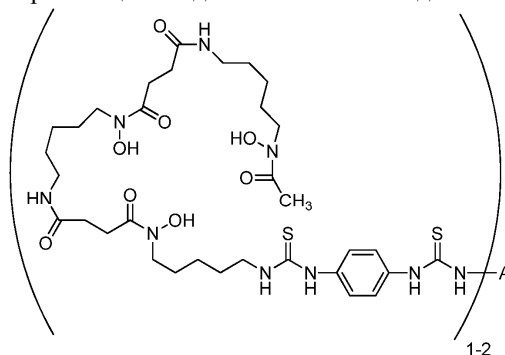
Согласно некоторым вариантам осуществления М представляет собой ^{89}Zr .

Согласно некоторым вариантам осуществления k равняется целому числу от 1 до 2. Согласно некоторым вариантам осуществления i равняется 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления -L-M представляет собой



В настоящем раскрытии также представлены способы синтеза меченных радиоактивной меткой конъюгатов антитела, предусматривающие введение в контакт соединения формулы (III):

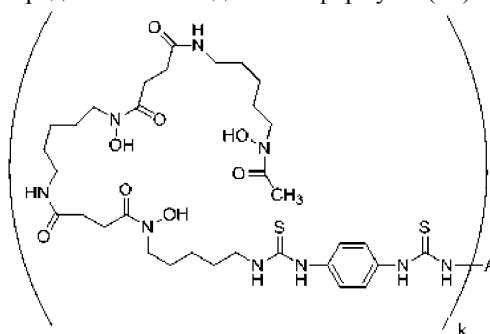


(III),

с ^{89}Zr , при этом А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы (III) синтезируют путем введения в контакт антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающего PD-L1, с p-SCN-Bn-DFO.

Также в настоящем документе представлен продукт реакции между соединением формулы (III) и ^{89}Zr .

В настоящем документе представлены соединения формулы (III):



при этом А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связы-

вают PD-L1, и k равняется целому числу от 0 до 30. Согласно некоторым вариантам осуществления k равняется 1 или 2.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлены композиции, включающие в себя конъюгат, имеющий следующую структуру:



при этом A представляет собой белок, который связывает PD-L1; L представляет собой хелатирующий фрагмент; и k равняется целому числу от 0 до 30; при этом конъюгат хелатируется с позитронным излучателем в количестве, достаточном для обеспечения специфической активности, подходящей для клинической ПЭТ визуализации. Согласно некоторым вариантам осуществления количество хелатированного позитронного излучателя представляет собой количество, достаточное для обеспечения специфической активности 1-3 мКи на 1-50 мг белка, который связывает PD-L1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают мономерный человеческий лиганд 1 программируемой смерти клетки (PD-L1) с равновесной константой диссоциации связывания (K_D) менее чем приблизительно 310 пМ, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают мономерный PD-L1 человека с K_D менее чем приблизительно 180 пМ в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают димерный PD-L1 человека с K_D менее чем приблизительно 15 пМ, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают димерный PD-L1 человека с K_D менее чем приблизительно 8 пМ в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с PD-L1 человека с эталонным антителом, включающим в себя определяющие комплементарность области (CDR) HCVR, при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1; и CDR LCVR, при этом LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, приведенных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам осуществления эталонное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82/90, 98/106, 146/154, 162/170, 290/274, 306/274, 314/274 и 330/274.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает связывание PD-L1 с одним из PD-1 или B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание PD-L1 с PD-1 и/или B7-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не увеличивает или не уменьшает связывание PD-L1 с его лигандами.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарность области (CDR) HCVR, при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 66, 114, 130, 202, 218, 266, 282, 298, 322 и 338; и CDR LCVR, при этом LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 74, 122, 138, 210, 226 и 274. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/26, 66/74, 114/122, 130/138, 202/210, 218/226, 266/274, 282/274, 298/274, 322/274 и 338/274.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-L1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-L1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-L1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит (a) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1; и (b) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из

группы, состоящей из последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), приведенных в табл. 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельной области легкой цепи (LCVR), приведенных в табл. 1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 292, 300, 308, 316, 324, 332 и 340;

(b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 294, 302, 310, 318, 326, 334 и 342;

(c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 296, 304, 312, 320, 328, 336 и 344;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 196, 212, 228, 244, 260 и 276;

(e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 198, 214, 230, 246, 262 и 278; и

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 200, 216, 232, 248, 264 и 280.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82/90, 98/106, 146/154, 162/170, 290/274, 306/274, 314/274 и 330/274.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR HCVR, при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 34, 50, 82, 98, 146, 162, 178, 186, 234, 250, 290, 306, 314 и 330; и CDR LCVR, при этом LCVR, имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 42, 58, 90, 106, 154, 170, 194, 242, 258 и 274.

Е. Крупномасштабное производство для получения конъюгатов антитела против PD-L1-хелатор.

Настоящее раскрытие относится к процессам крупномасштабного производства для получения антител против PD-L1, конъюгированных с хелатором. Конъюгаты антитела против PD-L1-хелатор имеют форму, подходящую для мечения радиоактивной меткой.

Надлежащие процессы производства соблюдаются в отношении всех аспектов получения, в том числе поддержание стерильной среды, применение асептических процедур, ведение учета всех процессов и документирование качества, чистоты, прочности и идентичности продукта, а также любых отклонений от них. Процесс крупномасштабного производства согласно некоторым вариантам осуществления протекает на много быстрее, чем процесс производства при исследовании и разработке. Согласно некоторым вариантам осуществления процесс крупномасштабного производства может занимать менее чем 12 ч, или менее чем 10 ч, или менее чем 8 ч, или менее чем 6 ч, или менее чем 4 ч, или менее чем, или приблизительно 2 ч.

Согласно некоторым вариантам осуществления первая стадия предусматривает ультрафильтрацию и диалфильтрацию (UFDF) с использованием мембраны 30-50 кДа антитела против PD-L1 для удаления вспомогательных средств, препятствующих конъюгации веществ и солей, которые ингибируют процесс конъюгации. Иллюстративные мембранные полимеры включают в себя полиэфирсульфон (PES), ацетат целлюлозы (CA) и регенерированную целлюлозу (RC). На данной стадии в растворе антитела заменяют буфер на не взаимодействующий буферный раствор с низкой ионной силой. pH буфера может составлять от приблизительно 4,5 до приблизительно 6, или от приблизительно 5 до приблизительно 6, или от приблизительно 5,3 до приблизительно 5,7, или приблизительно 5,5. Буферные системы, рассматриваемые как применимые в настоящем документе, включают в себя любую буферную систему, в которой отсутствует первичный амин. Иллюстративные буферы включают в себя ацетатные, фосфатные или цитратные буферы. Буфер обеспечивает стабильность белка во время обработки перед конъюгацией. Обрабатываемый объем может быть дополнительно уменьшен для концентрации антитела, затем стерильно отфильтрован.

После предварительной конъюгации с UFDF концентрированное и фильтрованное антитело может быть перенесено в не содержащую амин карбонатную буферную систему. Карбонатная буферная система может иметь pH в диапазоне от приблизительно 8,5 до приблизительно 9,6, или от приблизительно 9,0 до приблизительно 9,6, или от приблизительно 9,2 до приблизительно 9,4, или от приблизительно 9,4 до приблизительно 9,6, или pH приблизительно 9,4.

Добавляют хелатор, например, DFO, в растворитель до целевой концентрации в буферную систему,

содержащую антитело, и дополнительный растворитель может быть добавлен в раствор до желаемого процентного содержания. Хелатор может быть добавлен при молярном избытке относительно антитела, например, 3,5-5:1 хелатора к антителу. Суммарный реакционный объем может составлять до 5 л.

Температура реакции и время реакции находятся в обратной зависимости. Например, если температура реакции выше, то время реакции меньше. Если температура реакции ниже, то время реакции выше. В качестве иллюстрации, при температуре выше приблизительно 18°C реакция может занимать менее 2 ч; при температуре ниже 18°C реакция может занять более 2 ч.

Реакция конъюгации может быть прекращена путем гашения, например, путем добавления уксусной кислоты.

Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгацию антитела с дефероксамином проводят для получения конъюгатов DFO-mAb. Согласно некоторым вариантам осуществления конъюгацию антитела с p-SCN-Bn-дефероксамином проводят для получения конъюгатов DFO-mAb.

Иллюстративные растворители для хелатора включают в себя DMSO и DMA. В последующих стадиях UFDF используют мембраны, и мембрану выбирают на основе системы растворителей, используемой на стадии конъюгации. Например, DMA растворяет PES мембраны, поэтому их нельзя использовать в одной системе.

Карбонатные буферы не являются предпочтительными для стабильности конъюгата при длительном хранении. Таким образом, после образования конъюгатов антитело-хелатор они могут быть заменены на буфер, выбранный специально для длительного хранения и стабильности. Иллюстративные буферы включают в себя цитратный, ацетатный, фосфатный, аргининовый и гистидиновый буферы. Дополнительная стадия UFDF может быть выполнена для удаления остаточных солей и для обеспечения подходящей концентрации, уровня вспомогательного средства и pH конъюгированного моноклонального антитела. Полученные конъюгаты антитело-хелатор можно стерильно фильтровать и хранить для последующего составления.

III. Способы использования меченных радиоактивной меткой иммуноконъюгатов.

Согласно некоторым аспектам настоящее раскрытие относится к диагностическим и терапевтическим способам применения меченных радиоактивной меткой конъюгатов антитела в соответствии с настоящим раскрытием.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам выявления PD-L1 в ткани, при этом способы предусматривают введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела, представленного в настоящем документе, в ткань и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ). Согласно некоторым вариантам осуществления ткань содержит клетки или клеточные линии. Согласно некоторым вариантам осуществления ткань присутствует в субъекте, при этом субъектом является млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом является субъект-человек. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из злокачественной опухоли, инфекционного заболевания и воспалительного заболевания. Согласно одному варианту осуществления субъект имеет злокачественную опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления инфекционным заболеванием является бактериальная или вирусная инфекция, вызванная, например, вирусом гепатита В (HBV), вирусом гепатита С (HCV), вирусом иммунодефицита человека (HIV) и *Mycobacterium tuberculosis*.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам визуализации ткани, которая экспрессирует PD-L1, предусматривающим введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием в ткань и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ). Согласно одному варианту осуществления ткань содержится в опухоли. Согласно одному варианту осуществления ткань содержится в культуре опухолевых клеток или линии опухолевых клеток. Согласно одному варианту осуществления ткань содержится в опухолевом поражении у субъекта.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам измерения ответа на терапию, при этом ответ на терапия измеряют путем измерения воспаления. Способы согласно данному аспекту предусматривают введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела, представленного в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом, и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ). Согласно некоторым вариантам осуществления воспаление присутствует в опухоли у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления усиление экспрессии PD-L1 коррелирует с усилением воспаления в опухоли.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам определения того, подходит ли больной для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, при этом способы предусматривают отбор больного с солидной опухолью, введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием и визуализацию локализации введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли идентифицирует больного как подходящего для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигналь-

ной оси PD-1/PD-L1.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам идентификации кандидата для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, при этом способы предусматривают отбор больного с солидной опухолью, введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием и визуализацию локализации введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли идентифицирует больного как подходящего для противораковой терапии, включающей в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам прогнозирования ответа больного на противораковую терапию, включающую в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, при этом способы предусматривают отбор больного с солидной опухолью, определение того, является ли опухоль PD-L1-позитивной, при этом прогнозируют позитивный ответ больного, если опухоль является PD-L1-позитивной. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль определяют как позитивную путем введения меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием и визуализации локализации меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-L1-позитивной.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам выявления PD-L1-позитивной опухоли у субъекта. Способы согласно данному аспекту предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью; введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием субъекту и определение локализации меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-L1-позитивной.

Используемое в настоящем документе выражение "субъект, нуждающийся в этом" означает человека или отличное от человека млекопитающее, которые проявляют один или несколько симптомов или признаков злокачественной опухоли, и/или которым был поставлен диагноз злокачественной опухоли, в том числе солидной опухоли, и которые нуждаются в лечении ее. Во многих вариантах осуществления термин "субъект" может взаимозаменяемо использоваться с термином "больной". Например, у субъекта-человека может быть диагностирована первичная или метастатическая опухоль и/или один или несколько симптомов или показаний, в том числе без ограничения необъяснимая потеря массы, общая слабость, постоянная усталость, потеря аппетита, лихорадка, ночная потливость, боль в костях, одышка, вздутый живот, боль/давление в груди, увеличение селезенки и повышение уровня связанного со злокачественной опухолью биомаркера (например, CA125). Данное выражение включает в себя субъектов с первичными или установленными опухолями. Согласно конкретным вариантам осуществления выражение включает в себя субъектов-людей, которые имеют солидную опухоль и/или нуждаются в лечении солидной опухоли, например, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака легкого, рака предстательной железы, рака кожи, рака печени, рака кости, рака яичника, рака шейки матки, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи и рака головного мозга. Термин включает в себя субъектов с первичными или метастатическими опухолями (запущенными злокачественными новообразованиями). Согласно некоторым вариантам осуществления выражение "субъект, нуждающийся в этом" включает в себя больных с солидной опухолью, которая устойчива или не поддается лечению или недостаточно контролируется предшествующей терапией (например, лечением противораковым средством). Например, выражение включает в себя субъектов, которых лечили одной или несколькими линиями предшествующей терапии, такой как лечение химиотерапией (например, карбоплатином или доцетакселом). Согласно некоторым вариантам осуществления выражение "субъект, нуждающийся в этом" включает в себя больных с солидной опухолью, которых лечили одной или несколькими линиями предшествующей терапии, но которые впоследствии рецидивировали или метастазировали. Согласно некоторым вариантам осуществления термин включает в себя субъектов, имеющих воспалительное заболевание или нарушение, в том числе без ограничения злокачественную опухоль, ревматоидный артрит, атеросклероз, периодонтит, септическую лихорадку, болезнь сердца, болезнь коронарной артерии, инфекционное заболевание, бронхит, дерматит, менингит, астму, туберкулез, язвенный колит, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, гепатит, синусит, псориаз, аллергию, фиброз, волчанку, везикулит, анкилозирующий спондилит, болезнь Грейвса, целиакию, фибромиалгию и отторжение трансплантата.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы в соответствии с настоящим раскрытием используют для субъекта с солидной опухолью. Термины "опухоль", "рак" и "злокачественная опухоль" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Используемый в настоящем документе термин "солидная опухоль" относится к аномальной массе ткани, которая обычно не содержит кист или областей жидкости. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (нераковыми) или злокачественными (раковыми). Для целей настоящего раскрытия термин "солидная опухоль" означает злокачественные солидные опухоли. Термин включает в себя различные типы солидных опухолей, названные по типу клеток, которые их формируют, а именно саркомы, карциномы и лимфомы. Согласно некоторым вариантам

осуществления термин "солидная опухоль" включает в себя злокачественные опухоли, в том числе без ограничения колоректальный рак, рак яичника, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак головного мозга, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак анального канала, рак матки, рак толстой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак эндометрия, рак кости, рак яичка, рак кожи, рак почки, рак желудка, рак пищевода, рак головы и шеи, рак слюнной железы и миелому.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам лечения опухоли у субъекта. Способы согласно данному аспекту предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью; определение того, что опухоль является PD-L1-позитивной; и введение одной или нескольких доз ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1.

Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль определяют как PD-L1-позитивную путем введения меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием субъекту и визуализации меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-L1-позитивной.

Используемый в настоящем документе термин "лечить", "лечение" или т.п. означают облегчение симптомов, устранение причины симптомов либо на временной, либо на постоянной основе, задержку или ингибирование роста опухоли, уменьшение нагрузки опухолевых клеток или опухолевой нагрузки, обеспечение регрессии опухоли, обеспечение сокращения опухоли, некроза и/или исчезновения, предотвращение рецидива опухоли, предотвращение или ингибирование метастазирования, ингибирование роста метастатической опухоли и/или увеличение продолжительности выживания субъекта.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способам мониторинга эффективности противораковой терапии у субъекта, при этом способы предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью, при этом субъект получает лечение противораковой терапией; введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в соответствии с настоящим раскрытием субъекту; визуализацию локализации введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата в опухоли с помощью ПЭТ визуализации; и определение роста опухоли, при этом снижение от исходного уровня меченного радиоактивной меткой сигнала указывает на регрессию опухоли и эффективность противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления противораковая терапия включает в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антитело против PD-1).

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способам оценки изменений в воспалительном состоянии опухоли, при этом способы предусматривают отбор субъекта с солидной опухолью, при этом субъект получает лечение противораковой терапией; введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела, представленного в настоящем документе, субъекту и визуализацию локализации введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом усиление от исходного уровня меченного радиоактивной меткой сигнала указывает усиление воспаления и эффективность противораковой терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления противораковая терапия включает в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антитело против PD-1).

Используемый в настоящем документе термин "исходный уровень" в отношении экспрессии PD-L1 в опухоли означает числовое значение поглощения меченного радиоактивной меткой конъюгата у субъекта до или во время введения дозы противораковой терапии. Поглощение меченного радиоактивной меткой конъюгата определяют с использованием способов, известных в уровне техники (см., например, Oosting et al. 2015, J. Nucl. Med. 56: 63-69). Согласно некоторым вариантам осуществления противораковая терапия включает в себя ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1.

Для определения наличия регрессии опухоли поглощение меченного радиоактивной меткой конъюгата количественно определяют во время исходного визита и в один или несколько моментов времени после введения ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антитела против PD-1). Например, поглощение введенного меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела (например, меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела против PD-L1) может быть измерено в день 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 22, 25, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 85 или в конце недели 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или позже после начала лечения ингибитором сигнальной оси PD-1/PD-L1 (например, антителом против PD-1). Разницу между значением поглощения в конкретный момент времени после начала лечения и значением поглощения на исходном визите используют для установления того, была ли разница в количестве опухолевой ткани (регрессии или прогрессирования опухоли). Например, снижение по сравнению с исходным значением поглощения при лечении по меньшей мере одной дозой ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1 означает регрессию опухоли и указывает на эффективность противораковой терапии.

Согласно некоторым вариантам осуществления меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела вводят субъекту внутривенно или подкожно. Согласно некоторым вариантам осуществления меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела вводят внутрь опухоли. После введения меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела локализуется в опухоли. Локализованный меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела визуализируют с помощью ПЭТ визуализации, а поглощение меченного ра-

диоактивной меткой конъюгата антитела опухолью измеряют способами, известными в уровне техники. Согласно некоторым вариантам осуществления визуализацию осуществляют через 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после введения меченного радиоактивной меткой конъюгата. Согласно некоторым вариантам осуществления визуализацию осуществляют в тот же день после введения меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело против PD-L1 содержит CDR HCVR, при этом HCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 34, 50, 82, 98, 146, 162, 178, 186, 234, 250, 290, 306, 314 и 330; и CDR LCVR, при этом LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 42, 58, 90, 106, 154, 170, 194, 242, 258 и 274.

Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и REGN2810. Согласно некоторым другим вариантам осуществления ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-L1. Согласно одному варианту осуществления антитело против PD-L1 представляет собой атезолизумаб. Согласно одному варианту осуществления антитело против PD-L1 содержит HCVR согласно SEQ ID NO: 82 и LCVR согласно SEQ ID NO: 90.

IV. Примеры.

Некоторые варианты осуществления настоящего раскрытия иллюстрируются следующими неограничивающими примерами.

Пример 1. Создание человеческих антител против PD-L1.

Человеческие антитела против PD-L1, в том числе приведенные в табл. 1, получали и характеризовали, как описано в публикации патентного документа США № US 2015-0203580 A1, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Вкратце, человеческие антитела против PD-L1 создавали с использованием фрагмента PD-L1, который варьирует в пределах приблизительно 19-239 аминокислот PD-L1 (регистрационный номер в Genbank NP_054862.1). Иммуноген вводили непосредственно, с адъювантом для стимуляции иммунного ответа мышам VELOCIMMUNE®, содержащим ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой цепей человеческого иммуноглобулина. Опосредованный антителами иммунный ответ контролировали с помощью PD-L1-специфического иммуноанализа. Когда достигался желаемый иммунный ответ, спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и формирования линии гибридных клеток. Линии гибридных клеток скринировали и отбирали для идентификации клеточных линий, которые продуцируют PD-L1-специфические антитела. С использованием этой методики и описываемого выше иммуногена получали несколько химерных антител против PD-L1 (т.е. антител, обладающих человеческими вариабельными доменами и мышиными константными доменами); иллюстративные антитела, созданные данным способом, обозначали как H2M8306N, H2M8307N, H2M8309N, H2M8310N, H2M8312N, H2M8314N, H2M8316N, H2M8317N, H2M8321N, H2M8323N, H2M8718N, H2M8718N2 и H2M8719N.

Антитела против PD-L1 также выделяли непосредственно из антиген-позитивных В-клеток без слияния с миеломными клетками, как описано в патентном документе США № US 2007/0280945A1, специально включенном в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. С использованием этого способа получали несколько полных человеческих антител против PD-L1 (т.е. антител, обладающих человеческими вариабельными доменами и человеческими константными доменами); иллюстративные антитела, созданные данным способом, обозначали как H1H9323P, H1H9327P, H1H9329P, H1H9336P, H1H9344P2, H1H9345P2, H1H9351P2, H1H9354P2, H1H9364P2, H1H9373P2, H1H9382P2, H1H9387P2 и H1H9396P2.

Пример 2. Конъюгация антитела против PD-L1 H4H8314N с p-SCN-Bn-DFO.

Для модификации исходного антитела против PD-L1 H4H8314N и изотипного контрольного антитела, чтобы оно подходило для исследований с помощью иммуно-ПЭТ с мечением радиоактивной меткой, к антителу присоединяли хелатор p-SCN-bn-деферохамин (DFO; Macrocylics, № по каталогу B-705).

Для модификации H4H8314N сначала гистиридиновый буфер заменяли на PBS, Ph 7,2, путем диализа при 4°C на протяжении ночи (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 10k MWCO; ThermoScientific), затем снова заменяли буфер с использованием колонки PD-10 (GE Healthcare, № по каталогу 17-0851-01) на буфер, состоящий из 50 mM карбонатного буфера, 150 mM NaCl, pH 9,0 (буфер для конъюгации). Для определения концентрации после замены буфера образцы измеряли на спектрометре Nanodrop 2000 UV/VIS (Thermo Scientific) с использованием коэффициента экстинкции на основе последовательности MacVector 1,46 г/л (см. табл. 2). В 15-мл полиэтиленовой пробирке добавляли 773,9 мкл H4H8314N (12,5 мг) к 1676,1 мкл буфера для конъюгации. В отдельном сосуде 29,3 мкл DMSO добавляли к 20,7 мкл DFO. Этот раствор DFO по одной четверти добавляли в раствор H1H8314N, каждый раз осторожно перемешивая пипеткой вверх-вниз. Конечный раствор представлял собой 5 мг/мл H4H8314N в буфере для конъю-

гации, 2% DMSO с 6-кратным молярным избытком DFO. Обеспечивали инкубацию этого раствора в водяной бане при 37°C без дополнительного перемешивания.

Через 30 мин при 37°C раствор быстро пропускали через колонку для обессоливания PD-10 (GE Healthcare, № по каталогу 17-0851-01), предварительно уравновешенную буфером, содержащим 250 mM NaAcO при pH 5,4 (буфером для составления). Конечный раствор стерильно фильтровали через шприцевой фильтр (13-мм шприцевой фильтр Acrodisc, Pall Corporation, № по каталогу 4602). Затем концентрацию и отношение DFO к антителу (DAR) измеряли с помощью UV/VIS спектроскопии. Для измерения поглощения антитела, конъюгированное с DFO, измеряли в сопоставлении с буфером для составления при 252 нм (A₂₅₂), 280 нм (A₂₈₀) и 600 нм (A₆₀₀). Для расчета фон корректировали при каждом значении поглощения с использованием уравнения:

$$A'_\lambda = A_\lambda - A_{600}$$

Конъюгат антитела тестировали на предмет агрегации с использованием SEC хроматографии, при этом 25 мкг образца вводили в колонку Superdex 200 (GE Healthcare, № по каталогу 17-5175-01), контролировали при 280 нм с помощью подвижной фазы PBS (0,75 мл/мин). Целостность антитела оценивали с помощью 4-20% готового геля Tris/Gly для SDS-PAGE (Novex) с 2 мкг загруженного образца. Гель показан на фиг. 1. Концентрацию антител, концентрацию конъюгата и DAR рассчитывали с использованием приведенных ниже уравнений:

вычисление концентрации антитела

$$\text{Конц. mAb (мг/мл)} = \frac{A'_{280}}{\epsilon_{280}}$$

вычисление концентрации конъюгата

$$\text{Конц. конъюгата (мг/мл)} = \frac{A'_{252} - 1.53A'_{280}}{\epsilon_{252} - 1.53\epsilon_{280}}$$

вычисление DAR

$$\text{DAR} = \frac{\epsilon_{252}A'_{280} - \epsilon_{280}A'_{252}}{18800A'_{252} - 28700A'_{280}}$$

Таблица 2

Молярные коэффициенты экстинкции и молярная масса

Антитело	MW (г моль ⁻¹)	ϵ_{280} (л г ⁻¹ см ⁻¹)	ϵ_{252} (л г ⁻¹ см ⁻¹)
H4H8314N	144984	1,46	0,553

Таблица 3

UV DAR, процент агрегата и концентрация после присоединения DFO

Антитело	UV DAR	Концентрация (мг/мл)	% агрегата
H4H8314N	1,2	3,34	< 1%

Пример 3. Хелатирование ⁸⁹Zr конъюгированного с DFO моноклонального антитела.

Для применения в иммуно-ПЭТ in vivo исследованиях конъюгированное с DFO антитело против PD-L1, H4H8314N, и конъюгированное с DFO антитело контрольного изотипа метили радиоактивной меткой с ⁸⁹Zr.

Конъюгированное с DFO антитело (250 или 750 мкг) сначала доводили до 1,25 мг/мл в 1 M HEPES, pH 7,2. Состав раствора конъюгата DFO-Ab для каждого исследования приведен в табл. 4. Отдельно готовили раствор ⁸⁹Zr с использованием состава для каждого соответствующего исследования, показанного в табл. 5. Маточный раствор ⁸⁹Zr-щавелевой кислоты получали от PerkinElmer или 3D Imaging. Если концентрация радиоактивности маточного раствора была низкой (см. табл. 5), то выполняли стадию нейтрализации с помощью 1 M бората, pH 9,0. Конечную радиоактивность раствора сначала подтверждали с использованием дозкалибратора Capintec CRC-25R (Capintec, № 520), затем сразу же объединяли с раствором конъюгата DFO-Ab, осторожно смешивали (перемешивали в пипетке), а затем инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре.

После инкубации брали небольшой образец из каждой реакционной смеси для iTLC (мгновенной тонкослойной жидкостной хроматографии) для определения меченя радиоактивной меткой реакционного выхода, а оставшиеся реакционные смеси переносили в предварительно уравновешенные колонки PD-10 (Vendor) с 250 mM ацетата натрия при pH 5,4 для обессоливания с гравитационной подачей. Каждая колонка PD-10 вмещала не более чем 1,2 мл реакционной смеси (в ином случае использовали несколько колонок). После того, как содержимое реакционной смеси поступило в слой колонки, добавляли 1,6 мл 250 mM ацетата натрия при pH 5,4 (буфера для составления); проточную фракцию отбрасывали. Дополнительные 1,8 мл буфера для составления добавляли в колонку и элюат собирали из каждой колонки. Затем приблизительно 500 мкл каждого раствора анализировали с использованием спектрофото-

метра Nanodrop (ThermoScientific). Конечную концентрацию Ab рассчитывали с использованием соответствующего коэффициента экстинкции и поглощения при 280 нм с использованием уравнения: концентрация в мг/мл = поглощение при 280 нм - коэффициент экстинкции при 280 нм (находится в табл. 6).

Конечная масса, измеренная в граммах, записана в табл. 4. Затем измеряли радиоактивность с использованием дозкалибратора и представляли в табл. 5. Затем конечный материал вместе с материалом до обработки в колонке PD-10 анализировали с помощью iTLC. Для этого анализа 1 мкл каждого раствора добавляли на хроматографическую бумагу из микроволокна iTLC-SG-Glass, пропитанную силикагелем (Agilent Technologies, № по каталогу SG10001), обработанную в камере TLC с 20 mM буферного раствора на основе лимонной кислоты. Конечный материал также анализировали с использованием SEC-HPLC с UV 280 и радиоизотопным детектором, соединенным последовательно (Agilent 1260 с Lablogic Radio-TLC/HPLC Detector, SCAN-RAM), с использованием колонки Superdex 200 с подвижной фазой PBS при скорости потока 0,75 мл/мин. Использовали Radiotrace для определения радиохимической чистоты путем сравнения интеграции пика белка (~10-16 мин) и свободного пика ^{89}Zr (~25 мин). Чистоту мономера определяли путем сравнения интеграции олигомерного пика (от 10 мин до ~15 мин) с мономером (~16 мин).

Удельную активность и восстановление белка (%) каждого меченного радиоактивной меткой конъюгата определяли с использованием следующих уравнений:

- масса конъюгата в мг = концентрация в мг/мл × масса раствора в граммах;
- удельная активность в мКи/мг = активность сосуда в мКи - масса конъюгата в мг;
- восстановление белка = исходная масса конъюгата (мг) - масса конъюгата в мг.

Наконец, внешний вид отмечали и регистрировали в табл. 7. И UV280, и iTLC меченое вещество определяли на очищенном продукте.

Результаты приведены в табл. 7. Хроматограммы радио-SEC-HPLC показаны на фиг. 2-4. Пример хроматограммы SEC UV280 HPLC и радио-iTLC показан на фиг. 5 для мечения радиоактивной меткой ^{89}Zr , исследование 1. Хроматограмма SEC UV280-HPLC подтверждает высокомономерный продукт (99%). След радио-iTLC обрабатывали с помощью 7-точечной биномиальной функции сглаживания. Начало и фронт растворителя составляли примерно 16 и 100 мм, соответственно. За пределами 22 мм не обнаруживали выявляемого ^{89}Zr , что подтверждает радиохимическую чистоту, определенную с помощью SEC радио-SEC-HPLC на фиг. 2B.

Таблица 4
Получение конъюгата DFO-антитело для мечения радиоактивной меткой

№ мечения радиоактивной меткой	№ исследования	Партии мечения радиоактивной меткой	Концентрация (мг/мл)	DA R*	Масса конъюгата (мг)	Суммарный объем (мкл)	Конечная концентрация (мг/мл)
1	1	Изотип-DFO- ^{89}Zr	3,7	1,6	250	200	1,25
2	1	H4N8314N-DFO- ^{89}Zr	3,34	1,2	250	200	1,25
3	2	H4N8314N-DFO- ^{89}Zr	3,34	1,2	750	600	1,25
4	3	Изотип-DFO- ^{89}Zr	3,7	1,6	250	200	1,25
5	3	H4N8314N-DFO- ^{89}Zr	3,34	1,2	250	200	1,25

* DAR определяют как отношение DFO к антителу.

Таблица 5
Получение реакционного раствора ^{89}Zr для мечения радиоактивной меткой

Мечение радиоактивной меткой	№ исследования	Партии мечения радиоактивной меткой	^{89}Zr - оксалат (мкл)	Дополнительное добавление 1 M шавелевой кислоты (мкл)	Добавление 1 M бората, pH 9,0 (мкл)	1 M HEPES, pH 7,2 (мкл)	Конечный объем (мкл)	Конечная активность (мКи)	Удельная активность (мКи/мкл)
1	1	Изотип-DFO- ^{89}Zr	50	50	400	500	1000	1009	1,01

2	1	H4H8314 N-DFO- ⁸⁹ Zr	50	50	400	500	1000	1000	1
3	2	H4H8314 N-DFO- ⁸⁹ Zr	150	150	1200	1500	3000	3070	1,02
4	3	Изотип- DFO- ⁸⁹ Zr	~1	0	0	1000	1000	1680	1,68
5	3	H4H8314 N-DFO- ⁸⁹ Zr	~1	0	0	1000	1000	1640	1,64

Таблица 6

Коэффициенты экстинкции для партий конъюгатов

Партия меченая радиоактивной меткой	ϵ_{280} (AU мл мг ⁻¹ см ⁻¹)
Изотип-DFO- ⁸⁹ Zr	1,71
H4H8314N-DFO- ⁸⁹ Zr	1,61

Таблица 7

Краткое описание меченных ⁸⁹Zr конъюгатов DFO-Ab для in vivo визуализации и исследований биораспределения

Мечен е радиоак тивной меткой	№ иссле дова ния	Партии конъюгато в	Внеш ний вид	Радиохи миче ская чистот а* (%)	Моно мерна я чисто та* (%)	Восста новле ние белка (%)	Концен трация (мг/мл)	Удельная активнос ть (мКи/мг)
1	1	Изотип- DFO- ⁸⁹ Zr	Прозра чный	>99%	>95%	60%	0,106	3,35
2	1	H4H8314N- DFO- ⁸⁹ Zr	Прозра чный	>99%	>95%	63%	0,121	2,75
3	2	H4H8314N- DFO- ⁸⁹ Zr	Прозра чный	>99%	>95%	62%	0,134	3,58
4	3	Изотип- DFO- ⁸⁹ Zr	Прозра чный	>99%	>95%	66%	0,074	5,38
5	3	H4H8314N- DFO- ⁸⁹ Zr	Прозра чный	>99%	>95%	74%	0,084	5,13

* с помощью радио-SEC-HPLC.

Пример 4. Иммунореактивность.

Иммунореактивность (IR) меченного радиоактивной меткой антитела против PD-L1 и антитела контрольного изотипа измеряли следующим образом. Для начальных исследований использовали клетки C38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}, а затем также использовали клетки LOX-IMVI (см. подробное описание клеточных линий в примере 5) в дальнейшем исследовании. В данных анализах добавляли 20 нг соответствующих меченных ⁸⁹Zr антител в 15×10⁶ клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} или 30×10⁶ клеток LOX-IMVI в конечном объеме 1 мл. Образцы инкубировали в течение 45 мин при непрерывном перемешивании, а затем подвергали 3 промывкам со средой для удаления какого-либо несвязанного антитела. Затем подсчитывали радиоактивность тестируемых клеточных масс с помощью автоматического счетчика гамма-излучения (Wizard 2470, Perkin Elmer) против 2 эталонных стандартов, содержащих те же 20 нг меченного ⁸⁹Zr антитела. Процентное содержание иммунореактивности определяли для образцов с использованием среднего значения стандартов в качестве меры суммарной активности.

Как видно из табл. 8, меченное ⁸⁹Zr антитело против PD-L1 сохраняло иммунореактивность после конъюгации и меченая радиоактивной меткой, при этом % IR варьировала от 88 до 98% в исследованиях. Специфичность связывания очевидна в отношении контрольных антител, имеющих исходный уровень % IR менее чем 1%.

Таблица 8
Иммунореактивность DFO-конъюгатов с хелатированным ^{89}Zr

Исследование	Исследование 1		Исследование 2		Исследование 3			
Клеточная линия	MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-L1 ^{Tg}		MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-L1 ^{Tg}		MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-L1 ^{Tg}		LOX-IMVI	
Антитело	^{89}Zr -антитело против PD-L1	^{89}Zr -контроль	^{89}Zr -антитело против PD-L1	^{89}Zr -контроль	^{89}Zr -антитело против PD-L1	^{89}Zr -контроль	^{89}Zr -антитело против PD-L1	^{89}Zr -контроль
Активность клеточной массы	4048,4	29,6	8311,9	Нет данных	6262,4	68	5587,54	65,4
Средняя стандартная активность	4536,5	6432,4	8567,2	Нет данных	6386,6	9544,8	6386,6	9544,8
Процент IR	89,2	0,5	97,0	Нет данных	98,1	0,7	87,5	0,7

Пример 5. In vitro и ex vivo характеристика экспрессии PD-L1 человека в линиях опухолевых клеток. Несколько линий опухолевых клеток исследовали для оценивания уровня экспрессии PD-L1 человека с целью выявления PD-L1 человека, эндогенно экспрессируемого опухолями in vivo, у самцов голых мышей NCr (Taconic, Hudson NY) или у мышей, которых модифицировали для гомозиготности по экспрессии внеклеточного домена PD-L1 человека вместо внеклеточного домена PD-L1 мыши (мышей PD-L1 HumIn) на фоне штамма 75% C57/B16/25% 129 с использованием технологии VelociGene® (Valenzuela et al. 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659; публикация заявки на выдачу патента США № US 2016/0157469).

Клеточные линии, используемые в данных исследованиях, включают в себя: 1) клеточную линию карциномы толстой кишки мыши MC38 (полученную из NCI при Frederick, MD, Laboratory of Tumor Immunology and Biology), которая была сконструирована для нокаута PD-L1 мыши, но надэкспрессирует полноразмерный PD-L1 человека и полноразмерный куриный овальбумин, слитый с eGFP, таким образом, упоминаемый в настоящем документе как MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}; 2) несколько линий опухолевых клеток человека: клеточную линию меланомы человека LOX-IMVI (эндогенную PD-L1-позитивную линию, полученную из NCI при Frederick, MD, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, Tumor Repository), клеточные линии рака молочной железы человека MDA-MB-231 (эндогенную PD-L1-позитивную линию) и SK-BR-3 (PD-L1-негативную клеточную линию) (обе получены из ATCC). В некоторых случаях PD-L1 человека оценивали напрямую без какой-либо индукции in vitro; в некоторых случаях экспрессию PD-L1 человека оценивали с помощью обработки на протяжении ночи мышинным или человеческим IFN γ (100 нг/мл) (полученным от Peprotech); в некоторых случаях PD-L1 человека оценивали ex vivo на ферментативно диссоциированных опухолевых клетках, выделенных от голых несущих опухоль мышей или гуманизированных мышей. Все поверхностное окрашивание PD-L1 человека выполняли в соответствии со стандартным протоколом. Вкратце, опухолевые клетки промывали PBS один раз, один раз промывали ледяным буфером для окрашивания, окрашивали коммерчески доступным непосредственно конъюгированным с флуорохромом антителом против PD-L1 человека (eBioscience, клон M1H1) в буфере для окрашивания в течение 30 мин на льду в темноте, и затем снова промывали 2 мл PBS. Устраняемый краситель eFluor506 также включали в соответствии с протоколом производителя (eBioscience, № по каталогу 17-5983). Образцы получали на BD FACSCanto II™ IVD10, оборудованном DIVA v8. Данные далее анализировали с помощью FlowJo v10.0.6 или выше.

Экспрессия PD-L1 клетками MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} до имплантации и через несколько дней после имплантации у голых мышей показана в табл. 9.

Таблица 9

Процентное содержание позитивных по PD-L1 человека клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} до имплантации и через 7 дней после имплантации у голых мышей

	Окрашивание изотипом	Окрашивание hPD-L1
До имплантации	0,6%	94,7%
После имплантации	1,09%	74,0%

Перед имплантацией подавляющее большинство клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} бы-

ли позитивными по PD-L1 человека по сравнению с окрашиванием контрольным изотипом. Через несколько дней после имплантации голым мышам и после ферментативной и механической обработки для диссоциации опухоли ~70% клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} все еще оставались позитивными по PD-L1 человека.

Экспрессия PD-L1 клетками MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} до имплантации и через четырнадцать дней после имплантации у PD-L1 гуманизированных мышей показана в табл. 10.

Таблица 10

Процентное содержание позитивных по PD-L1 человека клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} до имплантации и через 14 дней после имплантации у PD-L1 гуманизированных мышей

	Окрашивание изотипом	Окрашивание hPD-L1
До имплантации	0,2%	92,5%
После имплантации	3,6	46,2%

Перед имплантацией подавляющее большинство клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} были позитивными по PD-L1 человека по сравнению с окрашиванием контрольным изотипом. Через четырнадцать дней после имплантации у PD-L1/ PD-L1 дважды гуманизированных мышей и после ферментативной и механической обработки для диссоциации опухоли ~50% клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} все еще оставались позитивными по PD-L1 человека.

Экспрессия PD-L1 многочисленными линиями опухолевых клеток *in vitro* показана на фиг. 6. Для оценивания того, насколько сопоставим уровень экспрессии PD-L1, с помощью сконструированной клеточной линии (MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}) и других линий опухолевых клеток человека (клеток меланомы LOX-IMVI, клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и клеток рака молочной железы SK-Br-3) проводили титрование дозы окрашивания антителами против PD-L1. На фиг. 6 показано, что клетки MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} характеризовались самым высоким уровнем экспрессии PD-L1 человека (фиг. 6A), а клетки SK-Br-3 характеризовались самой низкой экспрессией без выявления PD-L1 (фиг. 6D), тогда как экспрессия PD-L1 клетками LOX-IMVI и MDA-MB-231 была умеренной (приблизительно в 5 раз ниже, чем в клетках MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}) (фиг. 6B и 6C).

Во втором эксперименте дальнейшее сравнение между клетками LOX-IMVI и MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} проводили с обработкой *in vitro* или без таковой с помощью 100 нг/мл hIFN γ /mIFN γ в течение ночи, соответственно. На фиг. 7 показано, что средняя интенсивность флуоресценции PD-L1 достигала плато при ~150 нМ антитела против PD-L1, используемого для окрашивания. На исходном уровне экспрессия PD-L1 клетками LOX-IMVI была умеренной (приблизительно в 6-7 раз ниже, чем у клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}). После обработки mIFN γ не наблюдали изменений в окрашивании PD-L1 в клетках MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}, тогда как наблюдали 3-кратное усиление окрашивания PD-L1 человека в клетках LOX-IMVI после обработки с hIFN γ .

Экспрессия PD-L1 *ex vivo* клетками LOX-IMVI и MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} примерно через три недели после имплантации голым мышам была показана в табл. 11 и 12.

Таблица 11

Процентное содержание PD-L1 позитивных клеток LOX-IMVI и MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} через ~3 недели после имплантации у голых мышей

	Окрашивание изотипом	Окрашивание hPD-L1
LOX-IMVI	0,2%	56,6%
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-L1 ^{Tg}	0,2%	96,2%

Таблица 12

Средняя интенсивность флуоресценции PD-L1 в клетках LOX-IMVI и MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} через ~3 недели после имплантации у голых мышей

	Опухоль 1	Опухоль 2
LOX-IMVI	8479,1	12121,5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-L1 ^{Tg}	49589,1	51445,0

После ферментативной и механической обработки для обеспечения диссоциации опухоли клетки окрашивали антителом против PD-L1 (20 мкг/мл). Уровень экспрессии PD-L1 в клетках LOX-IMVI был приблизительно 5 раз ниже такового в опухолевых клетках MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}.

Пример 6. Селективная локализация меченного радиоактивной меткой антитела против PD-L1 в hPD-L1 позитивных опухолях у голых мышей.

Для определения *in vivo* локализации антитела против PD-L1 меченный цирконием-89 конъюгат DFO-антитело вводили внутривенно голым мышам, несущим PD-L1 позитивные опухоли.

Опухолевая линия, используемая для исследования, представляла собой клеточную линию карциномы толстой кишки мыши, называемую MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}, которая была сконструирована для нокаута PD-L1 мыши из MC38 дикого типа, но надэкспрессировала полноразмерный PD-

L1 человека и полноразмерный куриный овальбумин, слитый с eGFP. Для второго исследования опухолей с эндогенной экспрессией PD-L1 человека клеточную линию меланомы человека LOX-IMVI использовали для установления опухолей *in vivo* для последующих исследований локализации антител против PD-L1.

Иллюстративным меченным радиоактивной меткой антителом против PD-L1, используемым для данного исследования, было H1H8314N, включающие в себя HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 82/90.

Для первого исследования 1×10^6 клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1^{Tg} имплантировали подкожно в левый бок самцам голых мышей NCr возрастом 8-10 недель (Taconic, Hudson NY). Для опухолей LOX-IMVI подкожно имплантировали 1×10^6 клеток в левый бок самцов голых мышей NCr возрастом 8-10 недель. Как только опухоли достигали среднего объема 50-150 мм³ (день ~7-10), мышей рандомизировали в группы и им вводили либо меченный ⁸⁹Zr конъюгат DFO-антитело против PD-L1 (H1H8314N), либо меченный ⁸⁹Zr не связывающий контрольный изотип конъюгата DFO-антитело. Голые мыши, несущие опухоли MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1^{Tg}, получали 50 ± 1 мкКи меченного ⁸⁹Zr антитела с дозой белка ~0,6 мг/кг. В исследовании с использованием мышей, несущих опухоли LOX-IMVI, мыши получали 35 ± 1 мкКи меченого ⁸⁹Zr антитела с конечной дозой антитела 0,3 или 1 мг/кг.

ПЭТ визуализацию локализации антител оценивали через 6 дней после введения антител. Для получения изображений использовали Sofie Biosciences G8 PET/CT (Sofie Biosciences и Perkin Elmer). Прибор предварительно откалибровывали для выявления ⁸⁹Zr до получения изображения. Энергетическое окно варьировало от 150 до 650 кэВ с восстановленным разрешением 1,4 мм в центре поля зрения. Мышей подвергали индукционной анестезии с использованием изофлурана и держали в непрерывном потоке изофлурана во время визуализации. Статические 10-минутные изображения получали с использованием программного обеспечения G8, а затем реконструировали с использованием предварительно сконфигурированных настроек. Данные изображений корректировали с учетом распада и других параметров. КТ-изображения получали после осуществления ПЭТ, а затем совместно регистрировали с ПЭТ-изображениями. Изображения готовили с использованием программного обеспечения VivoQuant для последующей обработки (inviCRO Imaging Services).

Для биораспределения мышей подвергали эвтаназии в конечный момент времени (через 5-6 дней после введения дозы) и собирали кровь с помощью пункции сердца. Опухоли и нормальные ткани затем вырезали и помещали в счетные трубки. Измеряли и регистрировали массу для каждого образца. Данные подсчета для ⁸⁹Zr в CPM затем собирали путем измерения образцов на автоматическом счетчике гамма-излучения (Wizard 2470, Perkin Elmer). Процент инъецированной дозы на грамм (% ID/г) рассчитывали для каждого образца с использованием стандартов, приготовленных из инъецируемого материала.

Среднее значение % ID/г для каждого антитела представлено в табл. 13.

Таблица 13
Среднее значение % ID/г в анализируемых тканях

Образец	⁸⁹ Zr-H1H8314N		⁸⁹ Zr-антитело контрольного изотипа	
	Среднее значение ID/г	Ст. отклонение % ID/г	Среднее значение ID/г	Ст. отклонение % ID/г
Печень	3,1	0,4	0,9	0,9
Селезенка	4,4	1,1	1,5	1,3
Почка	4,0	0,7	1,4	1,6
Кость	5,1	2,6	1,7	1,6
Легкое	5,1	1,1	2,5	3,0
Сердце	2,4	0,2	1,3	1,4
Кровь	7,6	1,6	3,8	4,6
Тимус	5,3	3,0	2,8	2,2
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1 ^{Tg}	55,3	12,2	3,0	3,3
Тонкий кишечник	1,5	0,3	0,6	0,6

Исходя из этого, явное высокое поглощение в опухолях MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1^{Tg} было очевидным по сравнению с другими нормальными тканями, при этом поглощение в опухоли составляло 55,3% ID/г, что значительно превышало следующее самое высокое поглощение 5,3% ID/г, наблюдаемое в тимусе. Поглощение в опухоли было в 7,3 раза и в 17,8 раза выше, чем активность в крови и печени, соответственно. Специфичность поглощения антитела против PD-L1 опухолью (55,3% ID/г) была очевидной по сравнению со значительно сниженным поглощением в опухоли на 3%, что наблюдали для не связывающего антитела контрольного изотипа. Выполненная в данном случае пилотная ПЭТ визуализация продемонстрировала четкую локализацию меченного ⁸⁹Zr конъюгата DFO-антитела против

PD-L1 в опухолях MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1^{Tg}. В момент времени в день 6 после введения дозы у животных наблюдали слабый фоновый сигнал. В отличие от четкой опухолевой локализации, которая была очевидна при использовании антитела против PD-L1, при визуализации контрольного антитела в данной модели была видна только слабая фоновая активность. Визуализация четко указывает на высокое специфическое поглощение антитела против PD-L1 в PD-L1-позитивной опухоли человека и показывает локализацию меченного радиоактивной меткой ⁸⁹Zr антитела против PD-L1 в опухоли MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1^{Tg} у голый мыши NCr.

Во втором исследовании оценивали способность антитела против PD-L1 селективно нацеливаться на опухоли, экспрессирующие эндогенные уровни человеческого антигена PD-L1. В данном случае мыши, несущие опухоли меланомы LOX-IMVI человека, получали меченное ⁸⁹Zr антитело при дозах 0,3 и 1 мг/кг. Снова отбирали кровь, опухоль и ткани в день 6 после инъекции и вычисляли % ID/г для образцов. Среднее значение % ID/г для каждого антитела представлено в табл. 14.

Таблица 14

Среднее значение % ID/г в анализируемых тканях из второго исследования (опухоли LOX-IMVI)

Образец	⁸⁹ Zr-DFO-H1H8314N, 0,3 мг/кг		⁸⁹ Zr-DFO-H1H8314N, 1 мг/кг		⁸⁹ Zr-Антитело контрольного изотипа, 1 мг/кг	
	Среднее значение % ID/г	Ст. отклонение % ID/г	Среднее значение % ID/г	Ст. отклонение % ID/г	Среднее значение % ID/г	Ст. отклонение % ID/г
Печень	2,9	0,3	3,3	0,2	3,9	0,3
Селезенка	4,2	0,2	4,3	0,9	4,2	0,7
Почка	4,3	0,4	4,3	0,8	3,4	0,4
Кость	3,2	0,6	2,7	0,5	3,6	0,4
Легкое	5,7	1,0	6,6	1,6	5,9	1,2
Сердце	3,2	0,8	3,2	0,4	2,9	0,6
Кровь	8,1	1,4	9,5	1,0	11,1	6,2
Тимус	5,3	2,3	5,6	0,7	4,9	1,4
Опухоль LOX-IMVI	20,6	2,7	10,6	2,6	12,0	1,8
Тонкий кишечник	1,5	0,2	1,8	0,4	2,0	0,3

При более низкой дозе 0,3 мг/кг наблюдали четкое нацеливание на опухоль, а не на нормальные ткани, при этом наблюдали 20,6% ID/г в опухолях LOX-IMVI. Когда мыши получали более высокую дозу 1 мг/кг, наблюдали пониженное на 10,6% ID/г поглощение опухолью относительно уровня 0,3 мг/кг. Это говорит о том, что более высокая доза белка и, возможно, последующая более высокая доля немеченного антитела приводили к блокированию поглощения опухолью меченного ⁸⁹Zr антитела против PD-L1. В соответствии с этим ПЭТ визуализация, проведенная непосредственно перед исследованием биораспределения, также показала, что поглощение антитела против PD-L1 при дозе 1 мг/кг было примерно эквивалентно поглощению контрольного антитела. При более низкой дозе 0,3 мг/кг явное увеличение опухолевой локализации антитела против PD-L1 было очевидным по сравнению с контрольным антителом. В целом, изображения ПЭТ и данные биораспределения демонстрируют специфическое нацеливание на опухоли LOX-IMVI при дозе 0,3 мг/кг антитела против PD-L1.

Пример 7. Селективная локализация меченного радиоактивной меткой антитела против PD-L1 в hPD-L1 позитивных опухолях у мышей.

В данном примере описывается локализация *in vivo* меченного цирконием-89 конъюгата DFO-антитела против PD-L1 у мышей, гуманизированных по PD-L1. Иллюстративным антителом, использованным в данном примере, было H1H8314N, включающие в себя HCVR/LCVR согласно SEQ ID NO: 82/90.

Мышей, гуманизированных по PD-L1, модифицировали с использованием технологии VelociGene® (Valenzuela et al. 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659; публикация заявки на выдачу патента США № US 2016/0157469).

В качестве опухолевой линии использовали клеточную линию карциномы толстой кишки мыши, называемую MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1⁻/hPD-L1^{Tg}, сконструированную для экспрессии полноразмерного куриного овальбумина, слитого с eGFP, и для нокаута PD-L1 мыши из MC38 дикого типа, но надэкспрессирующую полноразмерный PD-L1 человека.

1×10⁶ клеток MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1⁻/hPD-L1^{Tg} имплантировали подкожно в левый бок самцов гуманизированных по PD-L1 мышей. Как только опухоли достигли среднего объема 50-150 мм³ (день ~7), мышей рандомизировали в группы и им вводили дозу либо меченного ⁸⁹Zr конъюгата DFO-антитела против PD-L1, либо меченного ⁸⁹Zr конъюгата DFO-не связывающее антитело контрольного изотипа. Мыши получали 50±1 мкКи меченного ⁸⁹Zr антитела с конечной дозой белка 1 или 3 мг/кг.

ПЭТ визуализацию локализации антител оценивали через 6 дней после введения антител. Для получения изображений использовали Sofie Biosciences G8 PET/CT (Sofie Biosciences и Perkin Elmer). Прибор предварительно откалибровывали для выявления ^{89}Zr до получения изображения. Энергетическое окно варьировало от 150 до 650 кэВ с восстановленным разрешением 1,4 мм в центре поля зрения. Мышей подвергали индукционной анестезии с использованием изофлурана и держали в непрерывном потоке изофлурана во время визуализации. Статические 10-минутные изображения получали с использованием программного обеспечения G8, а затем реконструировали с использованием предварительно сконфигурированных настроек. Данные изображений корректировали с учетом распада и других параметров. КТ-изображения получали после осуществления ПЭТ, а затем совместно регистрировали с ПЭТ-изображениями. Изображения готовили с использованием программного обеспечения VivoQuant для последующей обработки (invicro Imaging Services).

Для биораспределения мышей подвергали эвтаназии в конечный момент времени (через 5-6 дней после введения дозы) и собирали кровь с помощью пункции сердца. Опухоли и нормальные ткани затем вырезали и помещали в счетные трубки. Измеряли и регистрировали массу для каждого образца. Данные подсчета для ^{89}Zr в CPM затем собирали путем измерения образцов на автоматическом счетчике гамма-излучения (Wizard 2470, Perkin Elmer). Процент инъецированной дозы на грамм (% ID/г) рассчитывали для каждого образца с использованием стандартов, приготовленных из инъецируемого материала.

Результаты.

Гуманизированные по PD-L1 мыши, несущие опухоли MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}, получали меченный ^{89}Zr конъюгат DFO-антитело против PD-L1 при конечной дозе антитела 1 или 3 мг/кг. Кровь, опухоль и ткани собирали и взвешивали в день 6 после инъекции и вычисляли % ID/г для образцов на основании числа импульсов от каждого образца. Среднее значение % ID/г для дозы 1 и 3 мг/кг представлено в табл. 15 и табл. 16, соответственно.

Таблица 15

Среднее значение % ID/г в анализируемых тканях для антитела против PD-L1 при 1 мг/кг

Образец	Среднее значение % ID/г	Ст. отклонение % ID/г
Печень	8,6	1,5
Селезенка	14,1	1,1
Почка	7,8	1,0
Кость	4,5	1,4
Легкое	7,9	3,0
Сердце	4,3	1,1
Кровь	9,1	4,6
Тимус	9,7	3,5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-L1 ^{Tg}	34,1	18,0
Тонкий кишечник	2,4	0,9

При уровне дозы 1 мг/кг выражено четкое нацеливание на опухоли MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} с % ID/г 34,1% несмотря на экспрессию PD-L1 в нормальных тканях таких гуманизированных мышей. При этой дозе некоторая локализация меченого ^{89}Zr антитела против PD-L1 была очевидна в селезенке, где наблюдали поглощение антител 14,1% ID/г. Такое поглощение является закономерным из-за нормальной экспрессии PD-L1 человека вместо экспрессии PD-L1 мыши PD-L1 человека в селезенке. При дозе антитела 3 мг/кг локализация конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 в селезенке была снижена, поскольку поглощение теперь в среднем составляло 9,7% ID/г у мышей, получавших эту дозу антитела (табл. 16).

Таблица 16

Среднее значение % ID/г в анализируемых тканях для антитела против PD-L1 при 3 мг/кг

Образец	Среднее значение % ID/г	Ст. отклонение % ID/г
Печень	6,7	1,4
Селезенка	9,7	1,3
Почка	7,0	1,1
Кость	3,6	0,6
Легкое	11,0	1,0
Сердце	4,7	0,7

Кровь	12,4	2,1
Тимус	7,6	0,5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} hPD-L1 ^{Tg}	28,7	13,1
Тонкий кишечник	0,4	0,2

При дозе 3 мг/кг все еще наблюдали четкое нацеливание на опухоль со средним значением 28,7% ID/г, принимаемым опухолями MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg}. Следовательно, хотя при визуализации при дозе 3 мг/кг было очевидно уменьшение локализации в нормальной ткани, четкая локализация меченых антител против PD-L1 в опухолях MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} оставалась явной при данной дозе. В целом, эти результаты указывают на то, что четкое нацеливание на опухоли MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}hPD-L1^{Tg} было возможно у мышей, экспрессирующих PD-L1, на регулярных участках нормальной экспрессии в тканях.

Результаты исследований, выполняемых в данном случае, явно демонстрируют, что антитело против PD-L1, меченное ⁸⁹Zr, может значительной степени и специфически локализоваться в опухолях. Можно спрогнозировать сценарий, в котором антитело против PD-L1 используется при отборе больных с PD-L1-позитивными опухолями для последующего лечения ингибиторами сигнальной оси PD-1/PD-L1.

Пример 8. Процесс крупномасштабного производства для получения конъюгатов DFO-антитело против PD-L1.

В данном примере подробно описывается процесс крупномасштабного производства для получения антитела против PD-L1, подходящего для мечения радиоактивной меткой путем присоединения p-SCN-bn-дефероксамина (DFO) к антителу против PD-L1 (mAb, H4H8314N), описываемому в настоящем документе: (1) процессы ультрафильтрации и диафильтрации (UFDF) перед конъюгацией mAb удаляли вспомогательные средства, которые ингибируют процесс конъюгации; (2) после UFDF предварительной конъюгации проводили конъюгацию mAb с p-SCN-Bn-дефероксамин с получением конъюгатов DFO-mAb; и (3) UFDF после конъюгации для удаления остаточных солей обеспечивала подходящую концентрацию, уровень вспомогательных средств и pH конъюгированного моноклонального антитела. Полученные конъюгаты DFO-mAb затем обеспечивали в забуференном состоянии с улучшенной стабильностью для последующего составления.

(1) Ультрафильтрация и диафильтрация (UFDF) предварительной конъюгации.

Для 100 г антитела против PD-L1 заменяли буфер на 5 мМ раствор ацетатного буфера, имеющий pH 5,50, с использованием мембраны Sius Prostream (TangenX Technology Corporation) (емкость мембраны ≤500 г/м²) для удаления остаточных солей перед конъюгацией. Объем процесса уменьшали, чтобы дополнительно сконцентрировать антитело, затем антитело стерильно фильтровали с использованием мембраны Sartopore 2 (Sartorius), имеющей размер пор 0,45/0,2 мкм (гетерогенный двойной слой PES) или эквивалентный размер пор. Температуру ацетатного буфера поддерживали при целевой температуре 20±5°C. Растворы хорошо перемешивали.

(2) Конъюгация.

Концентрированное и отфильтрованное антитело (20 г) переносили в сосуд для конъюгации, содержащий систему карбонатного буфера без амина (56 мМ карбонат, 167 мМ хлорид натрия, pH 9,40), что приводило к незначительным уровням остаточного ацетата. DFO (25 мМ p-SCN-Bn-дефероксамин) сольбилизовали в DMSO и добавляли в сосуд для конъюгации вместе с дополнительным DMSO, так что DMSO присутствовал в конечном количестве 5%. DFO добавляли в молярном избытке при отношении DFO к mAb 4,5:1. Суммарный реакционный объем составлял 2,0 л. Буферную систему смешивали на протяжении добавления ингредиентов реакции и в течение всего времени реакции.

Температуру реакции контролировали в течение определенного времени с использованием уравнения, которое связывает температуру с временем реакции. В этом случае температуру реакции поддерживали при 18°C в течение 120 мин. Реакцию гасили добавлением 2М уксусной кислоты (23 мл/л), в результате чего pH раствора составляла 6.

(3) UFDF после конъюгации.

После стадии конъюгации погашенный раствор для конъюгации DFO-mAb подвергали буферному обмену на гистидиновый буфер (10 мМ гистидин, pH 5,50, с добавлением суперрафинированного полисорбата 80 0,0005% (масса/объем) в качестве защитного средства от сдвига) для удаления остаточных солей процесса, DMSO и не прореагировавшего DFO. После диафильтрации раствор концентрировали, а затем составляли. Гистидиновый буфер выбирали для длительного хранения белка при -80°C. Ту же самую мембрану Sius Prostream, упоминаемую в стадии (1), использовали в последней стадии UFDF. Полученный концентрированный раствор конъюгата DFO-mAb стерильно фильтровали с использованием фильтра Sartopore 2, упомянутого выше.

UV-DAR (цель 1,5) и определение концентрации белка выполняли, как описывается в примере 2.

Таблица 17

Молярные коэффициенты экстинкции и молекулярная масса

Антитело	MW (г моль ⁻¹)	ϵ_{280} (л г ⁻¹ см ⁻¹)	ϵ_{252} (л г ⁻¹ см ⁻¹)
H4H8314N	144984	211480	80172

Пример 9. Прогнозируемое воздействие радиоактивности на целый организм и ткани у субъектов-людей, получающих IV дозу конъюгата ⁸⁹Zr-DFO-антитело против PD-L1.

Цель следующего эксперимента состояла в том, чтобы оценить прогнозируемое облучение всего организма и тканей у субъектов-людей внутривенной (IV) дозой конъюгата ⁸⁹Zr-DFO-антитело против PD-L1. Примером антитела против PD-L1, использованного в меченном радиоактивной меткой конъюгате, было H4H8314N.

Характеристика радиоиммуноконъюгатов.

Иммуноконъюгат антитела против PD-L1 (DFO-Ab) и иммуноконъюгат контрольного изотипа (контрольного DFO-IgG4^P) метили радиоактивной меткой и очищали для применения в in vivo визуализации и исследованиях биораспределения. Анализ SEC-HPLC и in vitro анализ на основе клеток MC38/mPD-L1⁺/hPD-L1 (мышинных клеток аденокарциномы толстой кишки MC38, сконструированных для нокаута по PD-L1 мыши и стабильной экспрессии PD-L1 человека) проводили для характеристики полученных радиоиммуноконъюгатов.

Мономерная и радиохимическая чистота.

Для оценки мономерной и радиохимической чистоты проводили SEC-HPLC с использованием детекторов UV- и γ -эмиссии. Результаты для радиоиммуноконъюгатных препаратов конъюгата ⁸⁹Zr-DFO-антитело против PD-L1 и радиоиммуноконъюгата ⁸⁹Zr-DFO-IgG4^P контрольного изотипа показаны на фиг. 8.

Анализ хроматограмм поглощения при 280 нм проводили для оценки относительных количеств высокомолекулярного (HMW) и мономерного белка в радиоиммуноконъюгатных препаратах. Как показано в табл. 18, мономерные пики (считывание мономерной чистоты) составляют 99,6, 99,2 и 98,6%, соответственно, от суммарной площади пиков белка для препаратов конъюгата ⁸⁹Zr-DFO-антитело против PD-L1 и ⁸⁹Zr-DFO-IgG4^P контрольного изотипа; также выявляли низкие уровни HMW соединений (0,4, 0,8 и 1,4%, соответственно). Низкомолекулярные (LMW) соединения не наблюдали ни для одного из тестируемых образцов.

Анализ радиохроматограмм для γ -эмиссии проводили для оценки относительных количеств ⁸⁹Zr, включенных в радиоиммуноконъюгаты, по сравнению с невключенным ⁸⁹Zr (таким как свободный ⁸⁹Zr или ⁸⁹Zr, хелатированный свободными DFO-производными). Как кратко описано в табл. 18, пики для невключенного ⁸⁹Zr составляют $\leq 1,1\%$ от суммарной площади пиков γ -эмиссии, в то время как объединенные пики для меченный радиоактивной меткой мономерных и HMW соединений (считывание радиохимической чистоты) составляют 98,9, 99,5 и 99,5%, соответственно, от суммарной площади пиков γ -эмиссии для препаратов конъюгата ⁸⁹Zr-DFO-антитело против PD-L1 и ⁸⁹Zr-DFO-IgG4^P контрольного изотипа.

Таблица 18

Краткое описание данных SEC-HPLC

Номер пика	Соединение	Приблизительное время удерживания (минуты)	Площадь пика (%)	
			UV-хроматограмма	Радиохроматограмма
Исследование 1 ⁸⁹ Zr-DFO-H4H8314N				
1	HMW	13	0,4	1,1
2	Мономер	16	99,6	97,8
3	Невключенный ⁸⁹ Zr	26	нет данных	1,1
Исследование 2 ⁸⁹ Zr-DFO-H4H8314N				
1	HMW	14	0,8	1,3
2	Мономер	16	99,2	98,2
3	Невключенный ⁸⁹ Zr	26	нет данных	0,5
Контрольный ⁸⁹ Zr-DFO-IgG4 ^P				
1	HMW	13	1,4	1,5
2	Мономер	16	98,6	98,0
3	Невключенный ⁸⁹ Zr	26	нет данных	0,5

Числовые значения для анализа SEC-HPLC графически представлены на фиг. 8. UV-хроматограмма

представляет собой хроматограмму поглощения при 280 нм, а радиохроматограмма представляет собой хроматограмму интенсивности γ -эмиссии. HMW: высокомолекулярный; нет данных: не определяется.

Иммунореактивность.

Иммунореактивность, меру процента меченного радиоактивной меткой конъюгированного антитела, способного связывать его антиген, определяли путем инкубации конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 с клетками MC38/mPD-L1^{-/-}/hPD-L1. 2 тестируемые партии конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 продемонстрировали иммунореактивность 84,5 и 88,8% на клетках MC38/mPD-L1^{-/-}/hPD-L1 (табл. 19). Фоновую неспецифическую иммунореактивность 8,8% наблюдали для радиоиммуноконъюгата контрольного изотипа.

Таблица 19

Иммунореактивность меченного ^{89}Zr конъюгата DFO-антитело против PD-L1 и ^{89}Zr -DFO-IgG4^P контрольного изотипа

Радиоиммуноконъюгат	Иммунореактивность
конъюгат ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 (партия 1)	84,5%
конъюгат ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 (партия 2)	88,8%
^{89}Zr -DFO-IgG4 ^P контрольного изотипа	8,8%

В заключение, две отдельные партии конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 показали высокую иммунореактивность, процентное содержание мономера и радиохимическую чистоту.

Биораспределение ^{89}Zr -DFO-антитела против PD-L1 у мышей.

В этом эксперименте оценивали биораспределение радиоиммуноконъюгата антитела PD-L1 человека, конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1, с течением времени после введения одной внутривенной (IV) дозы 50 мкКи (1 мг/кг) PD-L1/PD-1-гуманизированным мышам (PD-1hu/huPD-L1hu/hu). Поскольку H4N8314N не связывает PD-L1 мыши, часть мышиногено PD-L1, кодирующего эктодомен PD-L1, заменили соответствующей человеческой последовательностью у мышей PD-1hu/huPD-L1hu/hu. В этом штамме эктодомен PD-1 мыши аналогичным образом гуманизирован. Эти мыши не подвергались иммуно/воспалительной провокации, и, поэтому, ожидается, что они будут иметь нестимулированные уровни экспрессии PD-L1 в иммунных клетках. Две группы по 8 животных в каждой умерщвляли через 6 дней (144 ч) или 10 дней (240 ч) после введения дозы, собирали кровь и собирали следующие ткани: сердце, легкие, печень, селезенку, почки, желудок, тонкий кишечник, слепую кишку, толстый кишечник, кость (бедренную), тимус, мышцу, мочевого пузыря и головной мозг. Процентное содержание радиоактивности в суммарной введенной инъекцией дозе (% ID), локализованной в определенных тканях или крови, определяли и указывали как среднее значение % ID на грамм (% ID/г) ткани. Перед умерщвлением получали изображения иммуно-ПЭТ/компьютерной томографии (КТ) через 1, 24, 48, 72, 144, 192 (только для 10-дневной группы) и 240 ч (только для 10-дневной группы) после введения дозы от тех же животных.

Относительно уровней ^{89}Zr в крови поглощение конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 в определенных тканях было незначительным в течение 10-дневного периода исследования, что оценивали с помощью анализа ткани *ex vivo* (табл. 20 и фиг. 9) и визуализации *in vivo*. По сравнению с кровью (9,4±2,2% ID/г) все собранные ткани, за исключением селезенки, демонстрировали более низкие уровни ^{89}Zr (≤6,7% ID/г) на день 6 после введения дозы. Небольшая степень опосредованного мишенью поглощения конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 (10,2±1,9% ID/г) наблюдали в селезенке, в соответствии с экспрессией PD-L1 в спленоцитах, что было продемонстрировано с помощью проточной цитометрии. Через 10 дней после введения дозы уровни ^{89}Zr в крови снижались в 7,8 раза по сравнению с днем 6 после введения дозы, что указывает на ответ антитела человека против антитела мыши (МАНА), влияющий на уровни конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1. Этот наблюдаемый ответ МАНА, вероятно, связан с тем фактом, что цель, PD-L1, экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках (Francisco, 2010), что приводит к презентации антитела человека иммунной системе мыши и последующему образованию МАНА. Параллельно уровни ^{89}Zr в печени были повышены в 4,1 раза на день 10 по сравнению с днем 6 после введения дозы, вероятно, в результате образования иммунного комплекса (IC) МАНА конъюгат ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 и последующего опосредованного печенью клиренса IC (Rojko, 2014). ПЭТ визуализация *in vivo* всего животного не выявила заметного тканеспецифического поглощения конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 за пределами низкого сигнала для селезенки и МАНА-опосредованного накопления в печени, описанного выше.

Таким образом, отмеченное опосредованное мишенью поглощение конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 в определенных тканях выше уровней ^{89}Zr в крови не наблюдали в течение 6-дневного периода у PD-L1/PD-1-гуманизированных мышей, которым вводили однократную IV дозу 1 мг/кг (50 мкКи) конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1, за исключением селезенки, где наблюдали небольшую степень опосредованного мишенью поглощения в соответствии с продемонстрированной экспрессией PD-L1 в спленоцитах. На данные, собранные после дня 6 и до конца исследования в день 10 после введения дозы, влиял ответ МАНА.

Таблица 20
Среднее значение данных биораспределения ex vivo

Ткань	Уровни ⁸⁹ Zr в день 6 после введения дозы (% ID/g)		Уровни ⁸⁹ Zr в день 10 после введения дозы (% ID/g)	
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
Кровь	9,4	2,2	1,2	1,4
Сердце	3,1	0,6	1,2	0,4
Легкие	5,9	0,7	2,6	0,7
Печень	4,9	1,9	20,2	7,8
Селезенка	10,2	1,9	12,1	3,0
Почки	5,3	1,1	3,9	1,3
Желудок	0,9	0,3	0,4	0,1
Тонкий кишечник	1,5	0,3	0,9	0,1
Слепая кишка	1,0	0,2	0,6	0,2
Толстый	1,4	0,3	0,7	0,2
Кость (бедренная)	6,3	2,1	6,9	1,4
Тимус	6,7	1,6	5,3	1,1
Мышца	0,9	0,1	0,5	0,1
Мочевой пузырь	4,3	2,1	1,7	0,9
Головной мозг	0,4	0,1	0,2	0,1

Сокращение: % ID/g = процент вводимой инъекцией дозы на грамм (ткани).

Оценки воздействия радиоактивности на весь организм и ткани у людей В этом эксперименте использовали данные ПЭТ/КТ-изображений четырех самцов PD-1/PD-L1-гуманизированных мышей и четырех самок PD-1/PD-L1-гуманизированных мышей, визуализированных через 1, 24, 48, 72, 144, 192 и 240 ч после однократной IV дозы 50 мКи (1 мг/кг) конъюгата ⁸⁹Zr-DFO-антитело против PD-L1. Данные, полученные при введении этой клинически значимой дозы, использовали при расчете оценок воздействия радиоактивности на человека. Данные о концентрации в тканях определяли с использованием анализа исследуемого объема (VOI).

Для оценки радиационной дозиметрии среднее время пребывания определяли для следующих участков: головной мозг, содержимое желудка, содержимое сердца, почки, печень, легкие, мышца, красный костный мозг, селезенка, содержимое мочевого пузыря и остальные части организма. Эти средние значения времени пребывания использовали в качестве входных данных в программном обеспечении OLINDA EXM 1.1 для оценки средних поглощенных тканью доз и эффективной дозы у людей.

Эффективную для человека дозу конъюгата ⁸⁹Zr-DFO-антитело против PD-L1 оценивали как 0,513 мЗв/МБк (миллизиверт/мегабеккерель) у взрослого мужчины и 0,622 мЗв/МБк у взрослой женщины. Органами, которые, как прогнозировали, имели самую высокую поглощенную дозу у людей, были селезенка и печень. Расчетная поглощенная доза в селезенке составляла 0,856 мЗв/МБк у взрослого мужчины и 1,12 мЗв/МБк у взрослой женщины. Расчетная поглощенная доза в печени составила 0,764 мЗв/МБк у взрослого мужчины и 0,974 мЗв/МБк у взрослой женщины.

Среднее значение скорректированного на распад процента вводимой инъекцией дозы на мл (DC % ID/мл) для мышей мужского и женского пола (n=4 самца, n=4 самки) для каждого VOI приведен в табл. 21.

Таблица 21
Данные биораспределения

	Среднее значение скорректированного на распад процента вводимой инъекцией дозы на мл (DC % ID/мл) (DC %ID/mL) $\pm$ SD									
Время (часы)	1		24		48		72		144	
Пол	Женский	Мужской	Женский	Мужской	Женский	Мужской	Женский	Мужской	Женский	Мужской
Головной мозг	1,365 $\pm$ 0,115	1,190 $\pm$ 0,050	0,903 $\pm$ 0,115	0,538 $\pm$ 0,071	0,640 $\pm$ 0,079	0,548 $\pm$ 0,218	0,685 $\pm$ 0,096	0,623 $\pm$ 0,224	0,465 $\pm$ 0,231	0,398 $\pm$ 0,073
Легкие	12,503 $\pm$ 1,146	12,498 $\pm$ 0,414	8,293 $\pm$ 0,635	7,155 $\pm$ 1,175	6,715 $\pm$ 0,370	5,888 $\pm$ 0,990	6,060 $\pm$ 0,708	5,558 $\pm$ 0,385	4,863 $\pm$ 0,316	4,585 $\pm$ 0,339
Печень	12,298 $\pm$ 0,664	12,078 $\pm$ 0,372	9,058 $\pm$ 0,793	7,200 $\pm$ 0,499	8,113 $\pm$ 0,969	6,125 $\pm$ 0,858	7,838 $\pm$ 0,932	6,203 $\pm$ 0,483	9,423 $\pm$ 1,885	6,208 $\pm$ 1,428
Сердце	27,688 $\pm$ 1,942	25,695 $\pm$ 0,934	15,685 $\pm$ 1,223	13,323 $\pm$ 1,133	12,088 $\pm$ 0,883	10,25 $\pm$ 1,335	11,740 $\pm$ 1,553	9,915 $\pm$ 0,171	8,140 $\pm$ 0,598	7,463 $\pm$ 0,768
Почки	11,430 $\pm$ 0,387	12,100 $\pm$ 0,872	7,345 $\pm$ 0,322	6,783 $\pm$ 0,811	6,418 $\pm$ 0,761	5,565 $\pm$ 0,680	6,475 $\pm$ 0,493	5,568 $\pm$ 0,550	5,643 $\pm$ 0,222	4,815 $\pm$ 0,450
Селезенка	15,263 $\pm$ 2,166	15,860 $\pm$ 0,974	14,135 $\pm$ 2,010	11,265 $\pm$ 1,706	13,675 $\pm$ 2,195	9,388 $\pm$ 1,389	13,655 $\pm$ 3,606	9,920 $\pm$ 1,414	15,105 $\pm$ 2,959	10,303 $\pm$ 1,102
Мочевой пузырь	6,045 $\pm$ 3,910	9,688 $\pm$ 4,991	1,653 $\pm$ 0,107	1,820 $\pm$ 0,283	1,443 $\pm$ 0,205	1,403 $\pm$ 0,160	1,318 $\pm$ 0,108	1,710 $\pm$ 0,346	1,115 $\pm$ 0,224	1,293 $\pm$ 0,430
Мышца	1,608 $\pm$ 0,182	1,435 $\pm$ 0,198	2,608 $\pm$ 0,196	1,780 $\pm$ 0,137	2,368 $\pm$ 0,259	1,955 $\pm$ 0,339	2,408 $\pm$ 0,181	2,148 $\pm$ 0,176	2,095 $\pm$ 0,168	1,918 $\pm$ 0,144
Желудок	3,238 $\pm$ 1,063	3,978 $\pm$ 0,632	2,875 $\pm$ 0,921	3,073 $\pm$ 0,566	2,478 $\pm$ 0,296	2,238 $\pm$ 0,487	2,260 $\pm$ 0,306	2,233 $\pm$ 0,491	2,380 $\pm$ 0,405	1,665 $\pm$ 0,148
Кость	3,683 $\pm$ 1,418	3,023 $\pm$ 0,244	3,310 $\pm$ 0,330	2,738 $\pm$ 0,171	4,600 $\pm$ 0,511	3,493 $\pm$ 0,716	4,850 $\pm$ 1,292	4,658 $\pm$ 1,399	8,993 $\pm$ 1,057	7,635 $\pm$ 0,872

Оцениваемые значения среднего времени пребывания (MRT) в человеке представлены в табл. 22 для каждого из органов-источников. MRT в остальных частях организма получали путем вычитания суммы всех значений времени пребывания в органе-источнике из обратной величины константы распада ^{89}Zr (Huang et al., Biodistribution, toxicity and radiation dosimetry studies of the serotonin transporter radioligand 4-[^{18}F]-ADAM in rats and monkeys. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010; 37: 545-555). Это является консервативной оценкой кумулятивной радиоактивности тканей.

Таблица 22
Среднее время пребывания (часы) в человеке

	Физический распад ¹		Биэкспоненциальная подгонка ²	
Орган/Ткань	Женский пол	Мужской пол	Женский пол	Мужской пол
Головной мозг	0,398	0,364	0,372	0,344
Содержимое желудка	0,511	0,476	0,492	0,480
Содержимое сердца	2,433	2,279	2,290	2,154
Почки	0,868	0,818	0,832	0,794
Печень	5,902	5,919	8,240	5,938
Легкие	2,508	2,772	2,411	2,642
Мышцы	17,635	23,677	13,348	17,182
Красный костный мозг	2,777	2,024	2,613	1,913
Селезенка	0,996	0,871	1,053	0,910
Содержимое мочевого пузыря	0,299	0,491	0,315	0,405
Остальные части организма	78,794	73,430	81,157	80,361

¹ Среднее время пребывания рассчитывали, исходя только из физического распада после момента времени - дня 6.

² Среднее время пребывания, рассчитывали по биэкспоненциальной подгонке данных.

Оцениваемые поглощенные тканью дозы для всех целевых органов для моделирующих объектов взрослых мужчин и взрослых женщин согласно OLINDA/EXM 1.1 представлены в табл. 23. Эффективная

доза, определенная Международной комиссией по радиологической защите (ICRP) (International Commission on Radiological Protection. 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60, Pergamon Press, New York, 1991), представляет собой величину, которую рассчитывают путем умножения поглощенной дозы для данного органа на весовой коэффициент стохастического риска и сложения всех взвешенных доз вместе. Оцениваемые эффективные дозы приведены в конце табл. 23. Эти значения представляют собой консервативную оценку поглощенных радиоактивных доз.

Таблица 23
Оцениваемые поглощенные человеческой тканью дозы и эффективная доза

Орган/Ткань	Физический распад ¹		Биэкспоненциальная подгонка ²	
	Взрослый мужчина (мЗв/МБк)	Взрослая женщина (мЗв/МБк)	Взрослый мужчина (мЗв/МБк)	Взрослая женщина (мЗв/МБк)
Надпочечники	0,561	0,702	0,567	0,726
Головной мозг	0,179	0,237	0,182	0,234
Молочные железы	0,366	0,459	0,379	0,466
Стенка желчного пузыря	0,601	0,692	0,610	0,751
Стенка LLI	0,519	0,652	0,530	0,651
Тонкий кишечник	0,563	0,600	0,582	0,605
Стенка желудка	0,575	0,714	0,584	0,718
Стенка ULI	0,553	0,685	0,571	0,700
Стенка сердца	0,789	0,973	0,781	0,964
Почка	0,650	0,773	0,641	0,774
Печень	0,764	0,974	0,764	1,220
Легкие	0,575	0,705	0,561	0,700
Мышца	0,396	0,481	0,381	0,464
Яичники	0,533	0,645	0,542	0,642
Поджелудочная железа	0,597	0,743	0,606	0,765
Красный костный мозг	0,480	0,591	0,483	0,587
Остеогенные клетки	0,604	0,777	0,625	0,779
Кожа	0,291	0,373	0,297	0,374
Селезенка	0,856	1,120	0,876	1,160
Яички	0,399	NA	0,407	NA
Тимус	0,481	0,605	0,484	0,601
Щитовидная железа	0,417	0,484	0,423	0,480
Стенка мочевого пузыря	0,580	0,496	0,559	0,494
Матка	0,545	0,638	0,554	0,636
Весь организм	0,440	0,550	0,440	0,554
Эффективная доза	0,513	0,622	0,516	0,625

¹ Поглощенные дозы, рассчитанные по МРТ, предполагающие только физический распад после момента времени - дня 6.

² Поглощенные дозы, рассчитанные по МРТ с биэкспоненциальной подгонкой данных.

Сокращения: LLI = нижний отдел толстого кишечника, ULI = верхний отдел толстого кишечника, нет данных = не определяли.

Оцениваемые поглощенные тканями человека дозы и эффективная доза для человека (табл. 23) по физическому распаду и способам биэкспоненциальной подгонки были подобными. Способ физического распада выбирали для получения конечного набора оцениваемых поглощенных человеческой тканью доз и эффективной дозы из-за явного ответа МАНА в данной мышинной модели. Следовательно, эффективную дозу для человека для конъюгата ⁸⁹Zr-DFO-антитело против PD-L1 оценивали как 0,513 мЗв/МБк у взрослого мужчины и 0,622 мЗв/МБк у взрослой женщины. Органами, которые, как прогнозировали, имеют самую высокую поглощенную дозу у людей, являются селезенка и печень. Оцениваемая поглощенная доза в селезенке составляла 0,856 мЗв/МБк у взрослого мужчины и 1,12 мЗв/МБк у взрослой женщины. Оцениваемая поглощенная доза в печени составляла 0,764 мЗв/МБк у взрослого мужчины и 0,974 мЗв/МБк у взрослой женщины.

Пример 10. Иммуно-ПЭТ визуализация PD-L1 в опухолях с использованием конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 у больных с запущенными злокачественными новообразованиями грудной клетки.

Основной целью данного исследования является определение безопасности и переносимости конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1, в котором антитело против PD-L1, используемое в меченном радиоактивной меткой конъюгате, представляет собой H4H8314N. Второстепенными целями исследования являются:

только часть А исследования: установление подходящей массовой дозы конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 и оптимального времени визуализации после инфузии, оцениваемых с помощью визуализации и забора крови после инфузии меченого вещества;

только часть В исследования: установление надежности теста/повторного теста в отношении измерений ПЭТ, оцениваемых по двум отдельным инфузиям меченого вещества при оптимальной массовой дозе и моменте времени визуализации, как определено в части А;

характеристика фармакокинетического (ПК) профиля конъюгата ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 на основании концентрации активности меченого вещества в плазме.

Это открытое исследование, состоящее из 2 частей, предназначенное для оценки безопасности и переносимости ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1. В части А исследования будет установлена подходящая массовая доза, доза активности ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 и оптимальное время визуализации после инфузии. Вариабельность теста/повторного теста ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 будет оцениваться в части В.

Все больные будут проходить процедуры скрининга. Больные, которые отвечают критериям приемлемости, будут подвергнуты ПЭТ с помощью ^{18}F -фтордезоксиглюкозы (^{18}F -FDG)/компьютерной томографии (КТ) и диагностическим КТ-сканирования для оценки жизнеспособности, локализации и размеров поражения. Эти сканирования не потребуются, если доступны изображения подходящего качества, полученные в течение 28 дней после предполагаемой первой дозы ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1.

Часть А.

Планируют, что три получающие последовательные дозы когорты будут лечиться открытым способом с помощью ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 при 5, 10 или 20 мг.

После инфузии ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 больные будут подвергаться ПЭТ/КТ-сканированиям в отношении ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 в день 1, день 4 ± 1 и день 7 ± 1 . Дополнительная визуализация может быть выполнена до 10 дня. Больные будут подвергаться оценкам безопасности и предоставлять образцы для гематологических, химических анализов, анализов иммунной безопасности, фармакокинетических показателей, анализа антител против лекарственного средства и анализа биомаркеров.

Больные будут продолжать проходить оценки безопасности, в том числе физическое обследование, показателей жизненно важных функций и документирование побочных эффектов (АЕ), вплоть до дня 21 после инфузии меченого вещества ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1.

Решения об увеличении дозы для определения подходящей дозы будут основываться на данных о безопасности и переносимости и оценке позитивности иммуно- позитронной эмиссионной томографии (iPET) и концентрации активности меченого вещества в плазме, как описано ниже.

Получающие дозу когорты в части А.

Планируют до 3 получающих возрастающую массовую дозу когорт. Каждая получающая массовую дозу когорты будет получать дозу с минимальным 48-чым интервалом между введениями дозы у каждого больного. По завершении ПЭТ/КТ-сканирования в день 7 ± 1 день для второго больного при данной массовой дозе будут рассмотрены все доступные данные визуализации, концентрация активности меченого вещества в плазме, клинической дозиметрии и безопасности. На основании этого обзора будет принято решение о:

расширении когорты из 6 больных, если есть положительный результат в отношении поглощения опухолью/опухолевой локализации по меньшей мере у 1 больного, как определено отношением опухоли к крови >1 ;

переходе к следующей получающей массовую дозу когорте, если имеется неподходящее поглощение опухолью и концентрация активности меченого вещества в плазме, с подходящим, определяемым с помощью стандартизированной величиной поглощения в крови (SUV) диапазоном от 1 до 5 в оптимальный момент времени визуализации;

переходе к следующей получающей массовую дозу когорте с более низкой массовой дозой на основании недостаточного поглощения опухолью и подходящей концентрации активности меченого вещества в плазме.

Если опухолевая локализация является неподходящей по меньшей мере у 2 больных при всех трех предложенных уровнях массовой дозы, и определено, что это происходит из-за низкого отношения сигнал-шум в изображении, доза активности будет увеличена максимум до 185 МБк для дальнейшего расширения ранее тестируемых получавших массовую дозу когорт.

Часть В.

Часть В исследования начнется после того, как в части А будет определена подходящая доза ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 и оптимальное время визуализации. В день 1 части В больные будут получать массовую дозу меченного вещества. После получения меченного вещества больные будут проходить сканирование в оптимальное время, определяемое в части А. Больные в части В будут получать вторую дозу меченного вещества и пройдут сканирование после интервала между дозами от 14 до 28 дней. Фактические сроки введения второй дозы меченного вещества после интервала будут определены на основании результатов, полученных в части А.

Больные будут подвергаться оценкам безопасности, включающим в себя физическое обследование, показатели жизненно важных функций и документирование нежелательных явлений (АЕ) во время и после визитов, при которых вводят меченное вещество ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1. Во время этих визитов больные будут предоставлять образцы для анализов РК, гематологии, химии и иммунной безопасности. Как для части А, так и для части В больные продолжают проходить оценки безопасности, включающие в себя физическое обследование, показатели жизненно важных функций и документирование АЕ, вплоть до 21 дня после последней инфузии меченного вещества ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1.

Продолжительность исследования.

Для части А: больные будут подвергаться периоду скрининга до 28 дней (4 недели) и периоду последующего наблюдения до 21 дня (приблизительно 3 недели) после инфузии дозы меченного вещества. Продолжительность часть А исследования составит приблизительно 7 недель, включая период скрининга.

Для части В: больные будут подвергаться периоду скрининга до 28 дней (4 недели) с интервалом между инфузиями до 28 дней (4 недели) и 21-дневному (3 недели) периоду последующей оценки безопасности, который включает в себя второй период сканирования. Суммарная продолжительность исследования для каждого больного будет составлять до 11 недель, включая период скрининга.

Конец исследования для данного исследования определяют как последний визит последнего пациента.

Для части А исследования планируют 3 уровня последовательных доз до 6 больных на когорту, с запланированными 3 когортами, всего до 18 больных. Для части В исследования будут включены до 10 больных. Для всего исследования планируют включение в исследование максимум 28 больных в одном участке исследования.

Целевая популяция больных.

Целевая популяция будет состоять из больных возрастом 18 лет и старше с прогрессирующими злокачественными новообразованиями грудной клетки и баллом ИНС PD-L1 при диагностической или последующей биопсии $\geq 1\%$ (положительный балл ИНС PD-L1 по анализу 22C3 PharmDx, Dako North America Inc.).

Для части А злокачественные новообразования грудной клетки будут ограничены до NSCLC, аденокарциномы желудочно-пищеводного перехода и рака желудка, с баллом PD-L1 $\geq 1\%$ по ИНС.

Для части В будут допущены все больные с прогрессирующими злокачественными новообразованиями грудной клетки и баллом PD-L1 $\geq 1\%$ по ИНС. Больные также должны иметь стабильное заболевание в соответствии с RECIST 1.1 между двумя последними исследованиями с помощью визуализации. Все нуждающиеся в терапии больные должны проходить стандартную терапию.

Лечение.

^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 представляет собой радиоиммуноконъюгат, образованный путем ковалентного конъюгирования бифункционального хелатора (p-SCN-Bn-DFO) с H4H8314N (моноклональным антителом против PD-L1) и мечения радиоактивной меткой ^{89}Zr этого соединения. ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 поставляют в водном буферном носителе.

Для части А ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 будут вводить IV в день 1 (исходный уровень). Для части В ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 будут вводить IV в день 1 и день 7 ± 3 . Фактические сроки второй дозы в части В будут определять по результатам в части А.

Меченное вещество - ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1 - будут вводить с уровнем дозы, значительно ниже предполагаемых кумулятивных уровней воздействия на людей на основании моделей РК, и ниже, чем уровни, при которых на данный момент имеющиеся средства на основе антител против PD-1 используют для лечения злокачественных опухолей. Данное исследование исключит больных, которых на данный момент лечат антителом против PD-L1, чтобы избежать конкуренции за цель.

Конечные точки.

Первичной конечной точкой в исследовании является частота и тяжесть возникающих при лечении нежелательных явлений (TEAE) до дня 21 после последней дозы инфузии меченого вещества у больных со злокачественными новообразованиями грудной клетки, которым вводили дозу ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1.

Только для части А: исследование установит подходящую массовую дозу и дозу активности ^{89}Zr -DFO-антитело против PD-L1, а также оптимальное время визуализации после инфузии, и с помощью

забора крови и визуализации в день 1, 4 и 7 после инфузии меченого вещества будут определять следующее:

- стандартизированное значение поглощения ^{89}Zr -ДФО-антитело против PD-L1 в пуле крови с последующим расчетом соотношений опухоли к крови во время визуализации;
- стандартизированные значения поглощения (SUV) по исследуемым участкам опухоли (ROI);
- максимальные SUV (SUV_{max}) с ROI опухоли;
- концентрацию активности меченого вещества в плазме, выраженную в виде SUV, с расчетом площади под кривой до дня 7 (AUC₀₋₇).

Только для части В: исследование установит достоверность теста/повторного теста в отношении измерений ПЭТ ^{89}Zr -ДФО-антитело против PD-L1, и из измерений 2 отдельных инфузий меченого вещества при подходящей массовой дозе и оптимальных моментов времени визуализации, определенных из части А, будут определять следующее:

- SUV пула крови с последующим расчетом соотношения опухоли к крови;
- SUV по ROI опухоли;
- SUV_{max} в ROI опухоли;
- биораспределение ^{89}Zr -ДФО-антитело против PD-L1.

Полученные данные будут показывать безопасность и переносимость ^{89}Zr -ДФО-антитело против PD-L1 у людей.

Варианты осуществления и примеры, описанные выше, предназначены исключительно для иллюстрации и не являются ограничивающими. Специалисты в данной области техники узнают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных соединений, материалов и процедур. Все такие эквиваленты считаются попадающими в объем прилагаемой формулой изобретения и охватываются ею.

Перечень последовательностей

<110> Регенерон Фармацевтикалс, Инк.
Келли Маркус
Ма Дангше
Олсон Виллиам
Турстон Гевин

<120> МЕЧЕННЫЕ РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКОЙ АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-L1 ДЛЯ ИММУНО-ПЭТ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

<130> 10305WO01

<140> TBD

<141> 2017-12-01

<160> 344

<170> Патентная версия 3.5

<210> 1

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 1

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagt aggtttttgga tgagctgggt ccgccaggct	120
ccaggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaaccaag atggaactga gaaatactat	180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccggggac acggctgtgt attactgtgc gaatacgtat	300

tacgattttt ggagtgggtca ctttgactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360

tca 363

<210> 2
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Asn Ile Asn Gln Asp Gly Thr Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 3

ggattcacct ttagtaggtt ttgg

24

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe Trp

1 5

<210> 5

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 5

ataaассаag atggaactga gaaa

24

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 6

Ile Asn Gln Asp Gly Thr Glu Lys

1 5

<210> 7

<211> 42

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 7

gcgaatacgt attacgattt ttggagtggg cactttgact ac

42

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 8

Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly His Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 9
 gacatccaga tgaccacagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggccagtc gagtattagt aattgggttg cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatcatagtt attcgtagac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Ser Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 11
cagagtatta gtaattgg

18

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 12

Gln Ser Ile Ser Asn Trp
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 13
aaggcgtct

9

<210> 14
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 14

Lys Ala Ser
1

<210> 15
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 15
caacagtatc atagttattc gtacact

27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 16

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Ser Tyr Thr
1 5

<210> 17

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 17

```
caggagcacc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgaag cgtctggatt caccttcagt aactttggca tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct ttatgggtctg atggaagtaa taaatactat      180
gcagactccg tgaagggtcg agtcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtct attactgtgc gagagggaga      300
ggagcccccg gtattccgat ttttgggtac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc      360
tca                                          363
```

<210> 18

<211> 121

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 18

Gln Glu His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ala Leu Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Gly Ala Pro Gly Ile Pro Ile Phe Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>	19
<211>	24
<212>	ДНК
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

```
<400> 19
ggattcacct tcagtaactt tggc
```

24

<210>	20
<211>	8
<212>	PRT
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly
1 5

<210>	21
<211>	24
<212>	ДНК
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

```
<400> 21
ttatggtctg atggaagtaa taaa
```

24

<210>	22
<211>	8
<212>	PRT
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 22

Leu Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys

1

5

<210> 23
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 23
 gсgаgаgggа gаggаgсссс сggтattссg atttttgggt ас 42

<210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 24

Alа Arg Gly Arg Gly Alа Pro Gly Ile Pro Ile Phe Gly Tyr
 1 5 10

<210> 25
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 25
 gасatссgаgа tgасссgаtс tссatссtсс сtgтсtgcаt сtgттggаgа саgаgtсacc 60
 atсacttgсс gggсaаgtса gggсattаgа аatgatttag gсtggtatса gсаgааaccа 120
 gggааagссс сtaаgсgссt gatсtatact gсatссagтт tgсaaаgtgg ggtсссatса 180
 аgattсagсg gсagtggatс tgggасаgаа ttсactсtса саatсagсag ссtacаgссt 240
 gааgattttg саacttatta сtgтсtасaa сataаtagтт accсtсtсac attсggсgga 300
 gggассаagg tggсgatсaa а 321

<210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Ala Ile Lys
 100 105

<210> 27
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 27
 cagggcatta gaaatgat

18

<210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 28

Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 29
 actgcatcc

9

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 30

Thr Ala Ser
 1

<210> 31
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 31
 ctacaacata atagttaccs tctcaca

27

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 32

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 33
 <211> 390
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 33
 gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagga aaactgatgg tgggacaaca 180
 gactacgctg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaatagc 240
 ctgcatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
 gatgatattg tagttgtacc agctgttatg aggggaatact acttcggtat ggacgtctgg 360
 ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 390

<210> 34
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Arg Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu His Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Val Met Arg Glu
 100 105 110

Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
 130

<210> 35
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 35

ggattcactt tcagtaacgc ctgg

24

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp
1 5

<210> 37

<211> 30

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 37

attaataagga aaactgatgg tgggacaaca

30

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 38

Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr
1 5 10

<210> 39

<211> 63

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 39

accacagatg atattgtagt tgtaccagct gttatgaggg aatactactt cggtatggac

60

gtc

63

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 40

Thr Thr Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Val Met Arg Glu Tyr Tyr
1 5 10 15

Phe Gly Met Asp Val
20

<210> 41
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 41
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc ggacaagtca gggcattaga aatgatttag gctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataataatt acccgtagac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 43
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 43
 cagggcatta gaaatgat

18

<210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 44

Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 45
 gctgcatcc

9

<210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 46

Ala Ala Ser
 1

<210> 47
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 47
ctacagcata ataattaccc gtacact

27

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 48

Leu Gln His Asn Asn Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 49
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 49
caggtgcaat tgggtgcagtc tggggcgagg gtgaagaagc ctggggcctc agtgcaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata ctcccttcacc ggctactata tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag gacttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtggcac caaaaagtat 180
gcacacaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcga cacagcctac 240
atgattttga gcagtctgat atccgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatgag 300
gactggaact ttgggagctg gttcgactcc tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360
tca 363

<210> 50
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 50

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Thr Lys Lys Tyr Ala His Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Ile Leu Ser Ser Leu Ile Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Phe Gly Ser Trp Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 51
ggataactcct tcaccggcta ctat

24

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 52

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 53
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 53
atcaaccsta acagtggcac caaa

24

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 54

Ile Asn Pro Asn Ser Gly Thr Lys

1 5

<210> 55

<211> 42

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 55

gcgagagatg aggactggaa ctttgggagc tggttcgact cc

42

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 56

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Phe Gly Ser Trp Phe Asp Ser

1 5 10

<210> 57

<211> 336

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 57

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttgga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aaccctcgta caccgtgatg gaaacacgta cttgagttgg 120

attcagcaga ggccaggcca gcctccgaga ctctcatatt ataaggtttc taatcagttc 180

tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggctt tatttctgca tgcaagctac acattttccg 300

atcaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaa 336

<210> 58

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 58

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val His Gly
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Ile Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Gln Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Phe Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Thr His Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 59

<211> 33

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 59

caaaccctcg tacacggtga tggaaacacg tac

33

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 60

Gln Thr Leu Val His Gly Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 61

<211> 9

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 61

aaggtttct

9

<210> 62

<211> 3

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 62

Lys Val Ser

1

<210> 63

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 63

atgcaagcta cacattttcc gatcacc

27

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 64

Met Gln Ala Thr His Phe Pro Ile Thr

1

5

<210> 65

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 65

caggtacacc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tacattgggt gcgacaggcc 120

cctggacacg ggcttgagtg gatgggatgg ctcaacccta atactggtac cacaaagtat 180

atacagaact ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccagcag cacagcctac 240
 atggagctga ccaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatgag 300
 gactggaatt atgggagctg gttcgacacc tggggccagg gaaccctggg cacagtctcc 360
 tca 363

<210> 66
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 66

Gln Val His Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Leu Asn Pro Asn Thr Gly Thr Thr Lys Tyr Ile Gln Asn Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Thr Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Gly Ser Trp Phe Asp Thr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 67
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 67

ggatacacct tcaccggcta ctat

24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 68

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 69
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 69
 ctcaaccsta atactggtac caca

24

<210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 70

Leu Asn Pro Asn Thr Gly Thr Thr
 1 5

<210> 71
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 71
 gcgagagatg aggactggaa ttatgggagc tggttcgaca cc

42

<210> 72
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 72

Ala Arg Asp Glu Asp Trp Asn Tyr Gly Ser Trp Phe Asp Thr

1

5

10

<210> 73

<211> 336

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 73

gatattgtaa tgaccsagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtc aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaatatt ataagatttc taaccgattc 180

tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac gctgaaaatc 240

agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggt tattactgca tgcaagctac acattttccg 300

atcaccttcg gccaaggga acgactggag attaga 336

<210> 74

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 74

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Pro Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

Thr His Phe Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Arg

100 105 110

<210> 75
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 75
 csaagcctcg tacacagtga tggaacacc tac

33

<210> 76
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 76

Pro Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 77
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 77
 aagatttct

9

<210> 78
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 78

Lys Ile Ser
 1

<210> 79
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 79
 atgcaagcta cacattttcc gaccacc

27

<210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 80

Met Gln Ala Thr His Phe Pro Ile Thr
 1 5

<210> 81
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 81
 gaggtgcagc tgggtggaatc tgggggaggt gtggtgcggc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacttttgat gattatggca tgacctgggt ccgccaagct 120
 ccagggaggg gcctggaatg ggtctctggt attcattggc atggtaaacg cacagggttat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccata tccagagaca acgccaagaa atccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgaa aggcgaggac acggccttgt atcattgtgt gaggggggga 300
 atgagtacag gggactgggt cgacccttgg ggccaggga ccttgggtcat cgtctcctca 360

<210> 82
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile His Trp His Gly Lys Arg Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

045226

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Gly Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 83
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 83
ggattcactt ttgatgatta tggc

24

<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

<210> 85
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 85
attcattggc atggtaaасg саса

24

<210> 86
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 86

Ile His Trp His Gly Lys Arg Thr
1 5

<210> 87
<211> 39
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 87
gtgagggggg gaatgagtac aggggactgg ttcgacccc 39

<210> 88
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 88

Val Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 89
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 89
gacatccaga tgaccscagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctctaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattaac agttatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgtt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
agggttcagtg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca ccatcagcaa tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 90
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 90

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 91
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 91
 cagagcatta acagttat

18

<210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 92

Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 93

gttgcatcc

9

<210> 94
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 94

Val Ala Ser
 1

<210> 95
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 95
 caacagagtt acagtacccc tccgatacc

30

<210> 96
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 96

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 97
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 97
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggt gtgggtacggc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgacctgggt ccgccaagtt 120
 ccagggaaagg ggctggagtg ggtctctggt attcattgga gtggtagaag cacagggttat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaataa acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagggggggga 300
 atgagtacgg gggactgggt cgaccctcgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 98
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 98

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile His Trp Ser Gly Arg Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 99
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 99

ggattcacct ttgatgatta tggc

24

<210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

<210> 101

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 101

attcattgga gtggtagaag caca

24

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 102

Ile His Trp Ser Gly Arg Ser Thr
1 5

<210> 103

<211> 39

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 103

gscgagggggg gaatgagtagc ggggggactgg ttcgacccc

39

<210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 104

Ala Arg Gly Gly Met Ser Thr Gly Asp Trp Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 105

<211> 324

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 105

```

gacatccaga tgaccscagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc      300
caagggacac gactggagat taaa                                             324

```

<210> 106

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 106

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
          85           90           95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 107

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 107
cagagcatta gcagctat

18

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 108

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 109
gttgcatcc

9

<210> 110
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 110

Val Ala Ser
1

<210> 111
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 111
caacagagtt acagtacccc tccgatacc

30

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 112

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 113

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 113

```
gaggtgcagt tggaggagtc tggaggagtc ttgggtccagc ctgggggggtc cctaagactc      60
tcctgtgcag cctctggggt caccgtcggt agtaactaca tgaactgggt ccgtcaggct      120
ccaggaagg gactggagtg ggtctcagtt atttatagtg gtggtagtag atactacgca      180
gattccgtga agggccgatt caccatctcc agactcactt ccaagaacac actgtatctt      240
caaatgagca gcctgagacc tgaggacacg gccgtgtatt attgtgagag agggattagg      300
ggtctggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct ctcca                        345
```

<210> 114

<211> 115

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 114

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Gly Ser Asn
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Leu Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 115
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 115
 gggttcaccg tcggtagtaa ctac

24

<210> 116
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 116

Gly Phe Thr Val Gly Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 117
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 117
 atttatagtg gtggtagtas a

21

<210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 118

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 119
 <211> 27

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 119
 gcgagagggg ttaggggtct ggacgtc

27

<210> 120
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 120

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val
 1 5

<210> 121
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 121
 gacatccaga tgaccscagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gaccattaac atctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggagagccc ctaggctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaccag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 122
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 122

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Asn Ile Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 123
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 123
 cagaccatta acatctat

18

<210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 124

Gln Thr Ile Asn Ile Tyr
 1 5

<210> 125
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 125
 gctgcatcc

9

<210> 126
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 126

Ala Ala Ser
1

<210> 127
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 127
caccagagtt acagtacccc tccgatacc

30

<210> 128
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 128

His Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 129
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 129
gaggaacggt tgggtggagtc tggaggagac ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggcat caccgtcggg actaattata tgaactgggt ccgccagggt 120
ccagggaagg gactggagtg ggtctcagtt atttctagcg gtggtaatac aactacgca 180
gactccgtga agggccgatt cattatgtcc agacaaactt ccaaaaacac gctgtatctt 240
cagatgaata gcctggaaac tgaggacacg gccgtatatt attgtgagag ggggatcaga 300
ggtttggacg tctggggcca agggaccatg gtcaccgtct cctca 345

<210> 130
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 130

Glu Glu Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Val Gly Thr Asn
 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Ile Met Ser Arg Gln Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Glu Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 131

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 131

ggcatcaccg tcggtactaa ttat

24

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 132

Gly Ile Thr Val Gly Thr Asn Tyr
 1 5

<210> 133
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 133
 atttctagcg gtggtaatac a

21

<210> 134
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 134

Ile Ser Ser Gly Gly Asn Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 135
 gscaggggga tcaagaggttt ggacgtc

27

<210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 136

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val
 1 5

<210> 137
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 137
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc

60

atcacttgcc gggcaagtca gagcatgagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggagagccc ctaagctcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 138
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 138

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Met Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 139
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 139

cagagcatga gcagctat

18

<210> 140
 <211> 6

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 140

Gln Ser Met Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 141
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 141
 gctgcatcc

9

<210> 142
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 142

Ala Ala Ser
 1

<210> 143
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 143
 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 144
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 144

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 145
 <211> 354
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 145
 caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagatgc ctgggtcctc ggtgagggtc 60
 tcctgcaagg cttctggagg catcttcagc agttctacta tcagttgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgaatg gatgggagag atcatccctg tctttgggtac agtaaaactac 180
 gcacagaagt tccaggacag agtcataatt accgcggacg aatctacgac tacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgaa atctggggac acggccgtat atttctgtgc gcgaaattgg 300
 ggattaggct ctttttatat ctgggggcaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 146
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 146

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Met Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ile Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Ile Phe Thr Ala Asp Glu Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Lys Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Asn Trp Gly Leu Gly Ser Phe Tyr Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 147
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 147
 ggaggcacatct tcagcagttc tact

24

<210> 148
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 148

Gly Gly Ile Phe Ser Ser Ser Thr
 1 5

<210> 149
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 149
 atcatccctg tctttggtac agta

24

<210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 150

Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Val
 1 5

<210> 151
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 151

gcgcgaaatt ggggattagg ctctttttat atc

33

<210> 152
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 152

Ala Arg Asn Trp Gly Leu Gly Ser Phe Tyr Ile
 1 5 10

<210> 153
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 153

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagttttaac ttcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcaa caggctggag 240
 cctgaagatt ttggagtgtt ttattgtcag cagtatgaaa gcgcaccttg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaat caaa 324

<210> 154
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 154

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Phe Asn Phe Asn
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Gly Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Ser Ala Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 155
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 155
cagagtttta acttcaacta c

21

<210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 156

Gln Ser Phe Asn Phe Asn Tyr
1 5

<210> 157
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 157
ggtgcatcc

9

<210> 158
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 158

Gly Ala Ser

1

<210> 159
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 159
 cagcagtatg aaagcgcacc ttggacg

27

<210> 160
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 160

Gln Gln Tyr Glu Ser Ala Pro Trp Thr
 1 5

<210> 161
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 161
 gaggtgcagc ttgtagagtc tgggggagac ttggtacatc ctggcaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggttt cccctttgat gagtatgcc a tgcactgggt ccggcaagtt 120
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga gtaataataa cataggctat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaataa ctccctgtat 240
 ctacaaatga acagtctgag acctgaggac acggcctttt attactgtgc aaaatctgga 300
 atctttgact cctgggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 162
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 162

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val His Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asp Glu Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Ser Asn Asn Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Gly Ile Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 163
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 163
ggttttccsst ttgatgagta tgcc

24

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 164

Gly Phe Pro Phe Asp Glu Tyr Ala
1 5

<210> 165
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 165
attagttgga gtaataataa cata 24

<210> 166
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 166

Ile Ser Trp Ser Asn Asn Asn Ile
1 5

<210> 167
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 167
gcaaaatctg gaatctttga ctcc 24

<210> 168
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 168

Ala Lys Ser Gly Ile Phe Asp Ser
1 5

<210> 169
<211> 315
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 169
gacatccaga tgaccsagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaagctcc tgatctatgc tgcattccagt ttgcaaagtg ggggtcccatc acggttcagt 180
ggcgggtggat ctgggacaga ttctactctc accatcagca gtctgcgacc tgaagatttt 240
gcaacttact actgtcaaca gagttactgt acccctccga tcaccttcgg ccaagggaca 300

cgactggaga ttaaa

315

<210> 170
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 170

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala
 35 40 45

Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser
 50 55 60

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Phe
 65 70 75 80

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Cys Thr Pro Pro Ile Thr Phe
 85 90 95

Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 171
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 171

cagagcatta gcagctat

18

<210> 172
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 172

Gln Ser Ile Ser Tyr
1 5

<210> 173
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 173
gctgcatcc

9

<210> 174
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 174

Ala Ala Ser
1

<210> 175
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 175
caacagagtt actgtacccc tccgatacc

30

<210> 176
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 176

Gln Gln Ser Tyr Cys Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 177
<211> 354
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 177

```

gaggtgcagc tggtaggagtc cgggggagggc gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt cggccaggct      120
ccaggcaagg gactggagtg ggtgacactt atatcatatg agggaaggaa taaatactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaataga acagcctgag agctgaggac acggctgtat attactgtgc gaaagatagg      300
accctttacg gtatggagct ctgggggcaa ggaaccacgg tcaccgtctc ctca      354

```

<210> 178

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 178

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1              5              10              15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
                20              25              30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35              40              45

Thr Leu Ile Ser Tyr Glu Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
        50              55              60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85              90              95

Ala Lys Asp Arg Thr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
                100              105              110

Thr Val Thr Val Ser Ser
        115

```

<210> 179

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая
 <400> 179
 ggattcacct tcagtagtta tggc

24

<210> 180
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая
 <400> 180

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 181
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 181
 atatcatatg agggaaggaa taaa

24

<210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 182

Ile Ser Tyr Glu Gly Arg Asn Lys
 1 5

<210> 183
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 183
 gcgaaagata ggacccttta cggtatggac gtc

33

<210> 184
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 184

Ala Lys Asp Arg Thr Leu Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 185

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 185

caggtcacct tgagggagtc tggtcctgcg ctggtgaaaa ccacacagac cctcacactg 60
 acctgcacct tctctgggtt ctcaactcagc actaatagaa tgtgtgtgac ctggatccgt 120
 cagccccag ggaaggccct ggagtggctt gcgcgcattg attgggatgg tgtaaatac 180
 tacaacacat ctctgaagac caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccagggtg 240
 gtccttaca tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca ctttttactg tgcacggtcg 300
 acttcgttga ctttttacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 186

<211> 121

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 186

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Thr Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Asn
 20 25 30

Arg Met Cys Val Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Gly Val Lys Tyr Tyr Asn Thr Ser
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Phe Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Thr Ser Leu Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 187
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 187
gggttctcac tcagcactaa tagaatgtgt

30

<210> 188
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 188

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Asn Arg Met Cys
1 5 10

<210> 189
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 189
attgattggg atggtgttaa a

21

<210> 190
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 190

Ile Asp Trp Asp Gly Val Lys
1 5

<210> 191
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 191
 gcacggtcga cttcgttgac tttttactac tttgactac

39

<210> 192
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 192

Ala Arg Ser Thr Ser Leu Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 193
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 193
 gacatccaga tgaccscagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 194
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 194

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 195
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 195
cagagcatta gcagctat

18

<210> 196
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 196

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 197
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 197
gctgcatcc

9

<210> 198
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 198

Ala Ala Ser
 1

<210> 199
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 199
 caacagagtt acagtacccc tccgatacc

30

<210> 200
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 200

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 201
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 201
 gaggtgcagc tggaggagtc tggaggagtc ttggtccagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctgagtt caccgtcggt accaaccaca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gactggagtg ggtctcagtt atttatagcg gtggtaacac attctacgca 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacacactt ccaagaacac gctgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgacagc agaggacacg gccgtatatt actgtgcgcg aggattgggg 300
 ggtatggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctca 345

<210> 202

<211> 115
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 202

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Val Gly Thr Asn
 20 25 30

His Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Leu Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 203
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 203
 gagttcaccg tcggtaccaа ccac

24

<210> 204
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 204

Glu Phe Thr Val Gly Thr Asn His
1 5

<210> 205
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 205
atttatagcg gtggtaacac a

21

<210> 206
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 206

Ile Tyr Ser Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 207
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 207
gcgcgaggat tggggggtat ggacgtc

27

<210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 208

Ala Arg Gly Leu Gly Gly Met Asp Val
1 5

<210> 209
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 209
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtca ggtcattagc aattatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagttc ctaggctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tataacagtg cccctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa a 321

<210> 210
<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 210

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 211
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 211

caggtcatta gcaattat

18

<210> 212
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 212

Gln Val Ile Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 213
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 213
 gctgcatcc

9

<210> 214
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 214

Ala Ala Ser
 1

<210> 215
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 215
 caaaagtata acagtgcscsc tcggacg

27

<210> 216
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 216

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg Thr
1 5

<210> 217
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 217
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ggggggagtc cctgagactt 60
tactgtgcag cctctggatt cacctttagt aaatattgga tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaaggag atggaagtga gaaatactat 180
gtggactctg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactatat 240
ctacaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagattat 300
tggggatcag gctactactt tgacttctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 218
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 218

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Arg Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Tyr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gly Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Trp Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 219
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 219
ggattcacst ttagtaaata ttgg

24

<210> 220
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 220

Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr Trp
1 5

<210> 221
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 221
ataaaggag atggaagtga gaaa

24

<210> 222
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 222

Ile Lys Gly Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 223
<211> 39
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 223

gcgagagatt attggggatc aggctactac tttgacttc

39

<210> 224

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 224

Ala Arg Asp Tyr Trp Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe

1

5

10

<210> 225

<211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 225

gacatccaga tgaccscagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gaacattaac aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tccaaaatgc ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacaata ccccgctcac tttcggcggg 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 226

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 226

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ala Ala Ser Ser Phe Gln Asn Ala Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 227
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 227
 cagaacatta acaactat

18

<210> 228
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 228

Gln Asn Ile Asn Asn Tyr
 1 5

<210> 229
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 229
 gctgcatcc

9

<210> 230
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 230

Ala Ala Ser

1

<210> 231

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 231

саасагагтт асаатаcccc гсгсаст

27

<210> 232

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 232

Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Leu Thr

1

5

<210> 233

<211> 390

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 233

gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagt ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctattgga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat 180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240

ctgcaaataga acagcctgag agccgatgac acggctgtgt attactgtgc gagagatgat 300

attgtagtag taccagctcc tatgggatat tactactact acttcggtat ggacgtctgg 360

ggccaaggga ccacgggtcac cgtctcctca 390

<210> 234

<211> 130

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 234

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Pro Met Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 235

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 235

ggattcacct ttagtagcta ttgg

24

<210> 236

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 236

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp

1

5

<210> 237
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 237
 ataaagсаag atggaagtga gaаа

24

<210> 238
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 238

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
 1 5

<210> 239
 <211> 69
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 239
 gсgаgаgatg atattgtagt agtaccagct cctatgggat attactacta ctacttcggt

60

atggacgtc

69

<210> 240
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 240

Ala Arg Asp Asp Ile Val Val Val Pro Ala Pro Met Gly Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15

Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val
 20

<210> 241
 <211> 321

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 241

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggatatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct      240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtagac ttttggccag      300
gggaccaagc tggagatcaa a                                           321

```

<210> 242

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 242

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

```

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
          20           25           30

```

```

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
    35           40           45

```

```

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50           55           60

```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

```

```

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Tyr
          85           90           95

```

```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 243

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 243
cagggcatta gaaatgat

18

<210> 244
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 244

Gln Gly Ile Arg Asn Asp
1 5

<210> 245
<211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 245
gctgcatcc

9

<210> 246
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 246

Ala Ala Ser
1

<210> 247
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 247
ctacagcata atagttaccc gtacact

27

<210> 248
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 248

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 249

<211> 369

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 249

gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggttcagc ctggcaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gatatttgcca tgcactgggt cgcacaagct 120

ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga ctggtggtaa catggactat 180

gcgaactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagagg acgccaagaa ttccctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgag agctgcggac acggccttgt attactgtgt aaaagatata 300

agggggatag tggctacggg gggggcctttt gatattctggg gccgagggac aatggtcacc 360

gtctcttca 369

<210> 250

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 250

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Phe

20

25

30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Gly Ile Ser Trp Thr Gly Gly Asn Met Asp Tyr Ala Asn Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Lys Asp Ile Arg Gly Ile Val Ala Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 251
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 251
 ggattcacct ttgatgattt tgcc

24

<210> 252
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 252

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Phe Ala
 1 5

<210> 253
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 253
 attagttgga ctggtggtaa catg

24

<210> 254
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 254

Ile Ser Trp Thr Gly Gly Asn Met
 1 5

<210> 255
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 255
 gtaaaagata taaggggggat agtgggtacg gggggggcctt ttgatatc

48

<210> 256
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 256

Val	Lys	Asp	Ile	Arg	Gly	Ile	Val	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile
1				5				10					15		

<210> 257
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 257	
gacatccaga tgaccscagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atctcttgcc gggcaagtca gaccattagc acttatttaa attgggtttca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgtt gtgtccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag agttacagta cccattcac tttcggcct	300
gggaccsaaag tggatatcaa a	321

<210> 258
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 258

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Val Val Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 259
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 259
 cagaccatta gcacttat

18

<210> 260
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 260

Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 261
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 261
 gttgtgtcc

9

<210> 262
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 262

Val Val Ser
 1

<210> 263
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 263
 caacagagtt acagtacccc attcact

27

<210> 264
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 264

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 265
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 265
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtccagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccgtcggt accaactaca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gactggagtg gatctcagtt atttatagcg gtggtagcac attctacgca 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacagactt cccagaacac gctgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagacc tgaggacacg gccgtatatt actgtgagag aggtatacgt 300
 ggttttgata tctggggcca agggacaatg gtcaccgtct cttca 345

<210> 266

<211> 115
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 266

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn
 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gln Thr Ser Gln Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 267
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 267

ggattcaccg tcggtaccaа ctac

24

<210> 268
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 268

Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn Tyr
1 5

<210> 269
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 269
atttatagcg gtggtagcac a

21

<210> 270
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 270

Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 271
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 271
gcgagaggtta tacgtggttt tgatatac

27

<210> 272
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 272

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile
1 5

<210> 273
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 273
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 274
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 274

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 275
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 275

cagagcatta gcagctat

18

<210> 276
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 276

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 277
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 277
 gctgcatcc

9

<210> 278
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 278

Ala Ala Ser
 1

<210> 279
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 279
 caacagagtt acagtacccc tccgatacc

30

<210> 280
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 280

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 281
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 281
gaggtgcagc tggaggagtc tggaggagtc ttgggtccagc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctgggtt taccatcagt accaactaca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtcgcagtt atttatagca gtgggtccac atactatatc 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agactcactt ccaagaacac ggtgtatctt 240
caaatgagca gcctgaattc tgaagacacg gccgtgtatt actgtgagag ggggatcagg 300
ggttttgata ttgggggcca agggacaatg gtcaccgtct ctcca 345

<210> 282
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 282

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Thr Asn
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Tyr Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ile Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Leu Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Asn Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 283
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 283
gggtttacca tcagtaccсаа ctac

24

<210> 284
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 284

Gly Phe Thr Ile Ser Thr Asn Tyr
1 5

<210> 285
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 285
atttatagca gtggttccac a

21

<210> 286
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 286

Ile Tyr Ser Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 287
<211> 27
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 287

gсgagggggga tcagggggttt tgatatt

27

<210> 288

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 288

Ala Arg Gly Ile Arg Gly Phe Asp Ile

1

5

<210> 289

<211> 372

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 289

gaagtgcagc tgggtggagtc gggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccattgat gatagtgcc tgcactgggt ccggcaaact 120

ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga aaagtggtag cataggttat 180

gсggactctg tgagggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ttccctctat 240

ctgcaaatga acagtctgag agttgaggac acggccttgt attactgtgt aaaagatata 300

aggggcaact ggaactacgg gggaaactgg ttcgaccctt ggggccaggg aaccctggtc 360

actgtctcct ca 372

<210> 290

<211> 124

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 290

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asp Asp Ser

20

25

30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Lys Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Lys Asp Ile Arg Gly Asn Trp Asn Tyr Gly Gly Asn Trp Phe Asp
 100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 291
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 291
 ggattcacca ttgatgatag tgcc

24

<210> 292
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 292

Gly Phe Thr Ile Asp Asp Ser Ala
 1 5

<210> 293
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 293
 attagttgga aaagtggtag cata

24

<210> 294

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 294

Ile Ser Trp Lys Ser Gly Ser Ile
 1 5

<210> 295
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 295
 gtaaaagata taaggggcaa ctggaactac gggggaaact ggttcgaccc c 51

<210> 296
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 296

Val Lys Asp Ile Arg Gly Asn Trp Asn Tyr Gly Gly Asn Trp Phe Asp
 1 5 10 15

Pro

<210> 297
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 297
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcatgtgaag cctctggggt caccgtcggg gtcaaccaca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg gtctggagtg ggtctcagtt attttcagta gtggtaggac attctacgga 180
 gactacgtga aggggagatt aaccatcttc agacaaacct cccagaacac ggtgtatctt 240
 caaatgaata gcctgagaag tgaggacacg gccatatatt actgtgcgag agggattggc 300
 gggttgagca tctggggccg agggacaatg gtcaccgtct ctcca 345

<210> 298
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 298

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Val Gly Val Asn
 20 25 30

His Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Phe Ser Ser Gly Arg Thr Phe Tyr Gly Asp Tyr Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Leu Thr Ile Phe Arg Gln Thr Ser Gln Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Ile Gly Gly Leu Asp Ile Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 299
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 299

gggttcaccg tcggtgtcaa ccac

24

<210> 300
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 300

Gly Phe Thr Val Gly Val Asn His
1 5

<210> 301

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 301

attttcagta gtggtaggac a

21

<210> 302

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 302

Ile Phe Ser Ser Gly Arg Thr
1 5

<210> 303

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 303

gcgagaggga ttggcggttt ggacatc

27

<210> 304

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 304

Ala Arg Gly Ile Gly Gly Leu Asp Ile
1 5

<210> 305

<211> 369

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 305

```

gaagtgcagc tggtaggagtc tgggggagggc ttgggttcagc ctggcaggtc cctaagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcct tgcactgggt ccggcaagct      120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga ctggtggtac tatagactat      180
gcggaactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat      240
ctgcaaatga gcagtctgag aactgaggac acggccatat attactgtac aagagatatc      300
cgggggaact ggaagtacgg aggtctgggtc gaccctggg gccaggggaac cctggtcacc      360
gtctcctca                                     369

```

<210> 306

<211> 123

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 306

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
          20           25           30

Ala Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

Ser Gly Ile Ser Trp Thr Gly Gly Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65           70           75           80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
          85           90           95

Thr Arg Asp Ile Arg Gly Asn Trp Lys Tyr Gly Gly Trp Phe Asp Pro
          100          105          110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 307

<211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 307
 ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 308
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 308

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 309
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 309
 attagttgga ctggtggtac tata

24

<210> 310
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 310

Ile Ser Trp Thr Gly Gly Thr Ile
 1 5

<210> 311
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 311
 acaagagata tccgggggaa ctggaagtac ggaggctggt tcgacccc

48

<210> 312
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 312

Thr	Arg	Asp	Ile	Arg	Gly	Asn	Trp	Lys	Tyr	Gly	Gly	Trp	Phe	Asp	Pro
1				5					10					15	

<210> 313
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 313

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggtgactgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggata	caccttcacc	gcctactata	tgcactgggt	gcgacaggcc	120
cctgggtcaag	gacttgactg	gatgggatgg	atcagcccta	acagtgggtt	cacaaactat	180
gcacagaagt	ttcagggcag	ggtcaccatg	accagggaca	cgtccatcaa	cacattttat	240
atggagctga	gtggactgag	atctgacgac	acggccgtat	attactgtgc	gcgagagggt	300
tctactcacc	acaattcttt	cgacccttgg	ggccaggga	ccctggtcac	cgtctcctca	360

<210> 314
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 314

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Thr	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ala	Tyr
			20					25					30		

Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Asp	Trp	Met
		35					40					45			

Gly	Trp	Ile	Ser	Pro	Asn	Ser	Gly	Phe	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50						55				60				

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Asn	Thr	Phe	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Glu	Gly	Ser	Thr	His	His	Asn	Ser	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

<220>
<223> синтетическая

24

<220>
<223> синтетическая

Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr Tyr
1 5

<220>
<223> синтетическая

24

<220>
<223> синтетическая

- 132 -

Ile Ser Pro Asn Ser Gly Phe Thr
1 5

<210> 319
<211> 39
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 319
gcgcgagagg gttctactca ccacaattct ttcgacccc

39

<210> 320
<211> 13
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 320

Ala Arg Glu Gly Ser Thr His His Asn Ser Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 321
<211> 342
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 321
gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtccaac cggggggggtc cctgaggctc 60
tcctgtgcag cctctgggtt caccgtcggt actaacttca tgaattgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagcg atttatagcg gtggtaccgc taactacgca 180
gactccgtga agggccgatt caccatttcc agagacactt ccagggaacac gctgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagaac tgaggacacg gccgtttatt attgtgcgag agggggggggt 300
atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct ca 342

<210> 322
<211> 114
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 322

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

045226

1					5					10					15				
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Val	Gly	Thr	Asn				
			20				25						30						
Phe	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
			35				40						45						
Ser	Ala	Ile	Tyr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys				
			50				55						60						
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Arg	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu				
65					70				75				80						
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala				
			85						90						95				
Arg	Gly	Gly	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val				
			100						105						110				

Ser Ser

<210>	323
<211>	24
<212>	ДНК
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

```
<400> 323
gggttcaccg tcggtactaa cttc
```

24

<210>	324
<211>	8
<212>	PRT
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая

<400> 324

Gly Phe Thr Val Gly Thr Asn Phe
1 5

<210>	325
<211>	21
<212>	ДНК
<213>	Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> синтетическая

<400> 325

atttatagcg gtggtaccgc t

21

<210> 326

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 326

Ile Tyr Ser Gly Gly Thr Ala

1 5

<210> 327

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 327

gсgagagggg ggggtatgga cgtc

24

<210> 328

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 328

Ala Arg Gly Gly Gly Met Asp Val

1 5

<210> 329

<211> 354

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 329

caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcaac acctatgttc tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagag atcatcccta tcttaggtgc agcaaactac 180

gcacagaact tccagggcag agtcactttt accacggacg aatccacgaa tacagcctac 240

atggacctga gcagcctaag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgg 300

acctccgggg ggttcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaactgtctc ctca 354

<210> 330

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 330

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Val Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Thr Ser Gly Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 331

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 331

ggaggcacct tcaacaccta tggt

24

<210> 332

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 332

Gly Gly Thr Phe Asn Thr Tyr Val

1

5

<210> 333

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 333

atcatcccta tcttaggtgc agca

24

<210> 334

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 334

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ala Ala

1

5

<210> 335

<211> 33

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 335

gscagagatc ggacstccgg ggggttcgac ccc

33

<210> 336

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая

<400> 336

Ala Arg Asp Arg Thr Ser Gly Gly Phe Asp Pro

1

5

10

<210> 337

<211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 337
 caggttcagc tggatgcagtc tggagctgag gtggagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta catctttacc cactatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag gacttgagtg ggtgggctgg atcagccctt acaatgggta cacagactat 180
 gcacagaaac tccagggcag agtcaccttg accacagaca catccacgac cacagcctac 240
 atggagctga ggaacctgag atctgacgac acggccatgt attactgttc gagagggagg 300
 ggcccttact ggtccttcga tctctggggc cgtggcaccc tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 338
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 338

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr His Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Asn Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Arg Gly Arg Gly Pro Tyr Trp Ser Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 339
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 339
 ggttacatct ttaccsacta tggt

24

<210> 340
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 340

Gly Tyr Ile Phe Thr His Tyr Gly
 1 5

<210> 341
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 341
 atcagccctt acaatgggta caca

24

<210> 342
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 342

Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Tyr Thr
 1 5

<210> 343
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 343
 tcgagaggga ggggscctta ctggtccttc gatctc

36

<210> 344
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая

<400> 344

Ser Arg Gly Arg Gly Pro Tyr Trp Ser Phe Asp Leu
 1 5 10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают мономерный человеческий лиганд 1 программируемой смерти клетки (PD-L1), хелатирующий фрагмент и позитронный излучатель, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3, соответственно) в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID NO: 82 и три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR) (LCDR1, LCDR2 и LCDR3, соответственно) в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 90.

2. Меченный радиоактивной меткой конъюгат по п.1, при этом указанный конъюгат включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают PD-L1, при этом указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с одним или несколькими фрагментами формулы (A)

-L-M_z

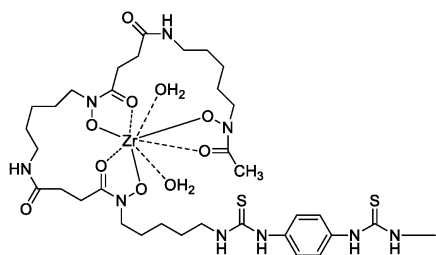
(A),

в которой L представляет собой хелатирующий фрагмент; M представляет собой позитронный излучатель; и z независимо в каждом случае равняется 0 или 1; и при этом по меньшей мере один из z равняется 1.

3. Меченный радиоактивной меткой конъюгат по п.1 или 2, при этом хелатирующий фрагмент включает в себя дезферриоксамин.

4. Меченный радиоактивной меткой конъюгат по любому из пп.1-3, в котором позитронный излучатель представляет собой ⁸⁹Zr.

5. Меченный радиоактивной меткой конъюгат по любому из пп.2-4, в котором -L-M представляет собой



в котором Zr представляет собой позитронный излучатель ⁸⁹Zr.

6. Меченный радиоактивной меткой конъюгат по любому из пп.1-5, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связаны с одним, двумя или тремя фрагментами формулы (A).

7. Меченный радиоактивной меткой конъюгат по любому из пп.1-6, в котором антитело обладает одним или несколькими свойствами, выбранными из группы, состоящей из:

(a) связывания мономерного PD-L1 с равновесной константой диссоциации связывания (K_D) менее чем приблизительно 310 пМ, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C;

(b) связывания мономерного PD-L1 человека с K_D менее чем приблизительно 180 пМ в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C;

(c) связывания димерного PD-L1 человека с K_D менее чем приблизительно 15 пМ, как измерено в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C; и

(d) связывания димерного PD-L1 человека с K_D менее чем приблизительно 8 пМ в анализе с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

8. Меченный радиоактивной меткой конъюгат по любому из пп.1-7, в котором антитело содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

9. Меченный радиоактивной меткой конъюгат по любому из пп.1-7, в котором антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи HCVR согласно SEQ ID NO: 82 и аминокислотную последовательность легкой цепи LCVR согласно SEQ ID NO: 90.

10. Способ визуализации ткани, которая экспрессирует PD-L1, предусматривающий введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела по любому из пп.1-9 в ткань и визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ).

11. Применение меченого радиоактивной меткой конъюгата по любому из пп.1-9 в способе лечения опухоли, предусматривающем:

(а) отбор субъекта с солидной опухолью;

(б) определение того, что солидная опухоль является PD-L1-позитивной путем введения меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела субъекту; и визуализацию экспрессии меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ), при этом наличие меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли указывает на то, что опухоль является PD-L1-позитивной; и

(с) введение одной или нескольких доз ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1 субъекту, нуждающемуся в этом.

12. Применение по п.11, при котором субъекту вводят 0,1-10 мг/кг меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела.

13. Применение по п.11 или 12, при котором меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела вводят субъекту подкожно или внутривенно.

14. Применение по пп.11-13, при котором ПЭТ визуализацию осуществляют через 2-7 дней после введения меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела.

15. Применение по любому из пп.11-14, при котором стадию (b) выполняют перед лечением субъекта ингибитором сигнальной оси PD-1/PD-L1.

16. Применение по любому из пп.11-14, дополнительно предусматривающее:

(а) введение меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела после лечения субъекта по меньшей мере с одной дозой ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1; и

(б) визуализацию экспрессии меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли с помощью ПЭТ визуализации, при этом снижение от исходного уровня на участке экспрессии меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела в опухоли указывает на регрессию опухоли.

17. Применение по п.16, при котором субъекту вводят меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела через 1-20 недель после введения ингибитора сигнальной оси PD-1/PD-L1.

18. Применение по любому из пп.11-17, при котором опухоль выбрана из группы, состоящей из рака крови, рака головного мозга, почечноклеточного рака, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака молочной железы, печеночноклеточной карциномы, рака кости, рака толстого кишечника, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака толстой и прямой кишки, мезотелиомы, В-клеточной лимфомы и меланомы.

19. Применение по любому из пп.11-18, при котором ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 представляет собой антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

20. Применение по п.19, при котором антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и REGN2810.

21. Применение по любому из пп.11-18, при котором ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1 представляет собой антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

22. Применение по п.21, при котором антитело против PD-L1 представляет собой атезолизумаб.

23. Применение по п.21, при котором антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR согласно SEQ ID NO: 82 и LCVR согласно SEQ ID NO: 90.

24. Применение по п.21, при котором антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три HCDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три LCDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 84; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 86; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 88; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 92; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 94, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 96.

25. Применение меченого радиоактивной меткой конъюгата по любому из пп.1-9 для мониторинга эффективности противоопухолевой терапии, включающего (а) введение меченного радиоактивной меткой конъюгата субъекту, нуждающемуся в этом; и (б) визуализацию экспрессии PD-L1 с помощью визуализации позитронной эмиссионной томографией (ПЭТ).

26. Применение по п.25, при котором мониторинг дополнительно включает (с) визуализацию опу-

холи с помощью компьютерной томографии (КТ).

27. Применение по п.25, где противоопухолевая терапия включает ингибитор сигнальной оси PD-1/PD-L1, ингибитор LAG3 или ингибитор CTLA4.

28. Применение по п.25, при котором субъекту вводят 0,1-10 мг/кг меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела.

29. Применение по п.28, при котором меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела составлен для подкожного или внутривенного введения.

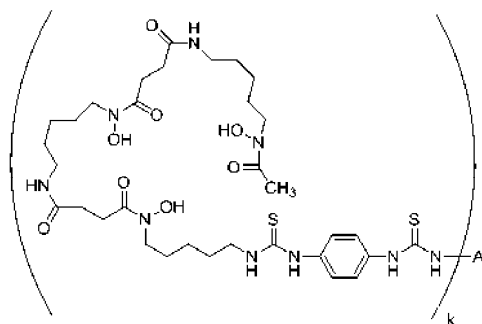
30. Применение по п.25, при котором ПЭТ визуализацию осуществляют через 2-7 дней после введения меченного радиоактивной меткой конъюгата антитела.

31. Применение по п.25, при котором определение исходного уровня экспрессии PD-L1 проводится до лечения субъекта противоопухолевой терапией.

32. Применение по любому из пп.25-31, при котором опухоль выбрана из группы, состоящей из рака крови, рака головного мозга, почечноклеточного рака, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака молочной железы, печеночноклеточной карциномы, рака кости, рака толстого кишечника, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака толстой и прямой кишки, мезотелиомы, В-клеточной лимфомы и меланомы.

33. Применение по любому из п.25, при котором снижение экспрессии PD-L1 указывает на регрессию опухоли.

34. Соединение формулы (III):



при этом А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают PD-L1, включающий:

HCDR1, включающей SEQ ID NO: 84;

HCDR2, включающей SEQ ID NO: 86;

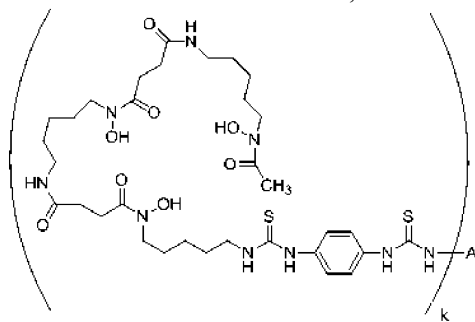
HCDR3, включающей SEQ ID NO: 88;

LCDR1, включающей SEQ ID NO: 92; LCDR2, включающей SEQ ID NO: 94; и

LCDR3, включающей SEQ ID NO: 96; и

k равняется целому числу от 1 до 30.

35. Меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела, включающий:

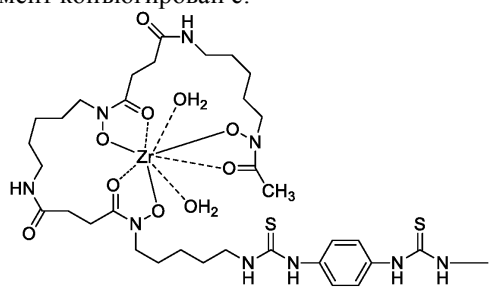


где А представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий PD-L1, включающий три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84; HCDR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; HCDR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; LCDR1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; LCDR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и LCDR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и где

k равняется целому числу от 1 до 30.

36. Меченный радиоактивной меткой конъюгат антитела, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий человеческий лиганд 1 программируемой смерти клетки (PD-L1), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR1 включает аминокислотную

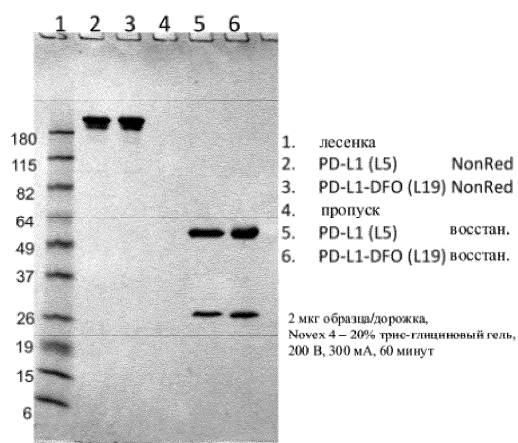
последовательность SEQ ID NO: 84; HCDR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; HCDR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; LCDR1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; LCDR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и LCDR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с:



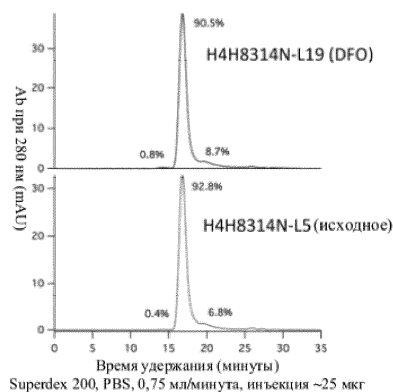
в котором Zr представляет собой позитронный излучатель ^{89}Zr .

Характеристика H4H8314N-DFO

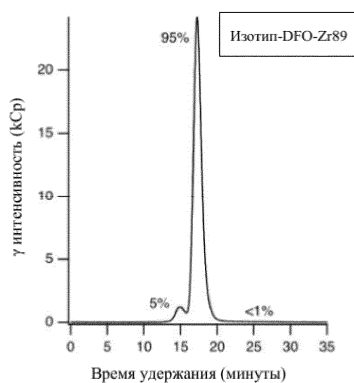
SDS-PAGE: подобные профили подвижности исходного антитела против PD-L1 и конъюгата с DFO



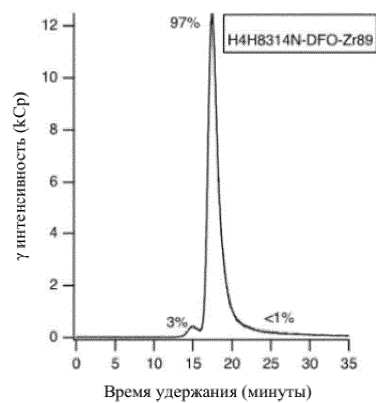
SEC: < 1% агрегата



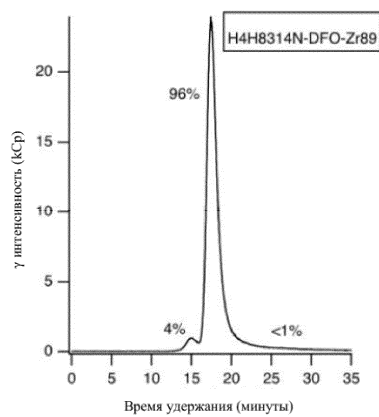
Фиг. 1



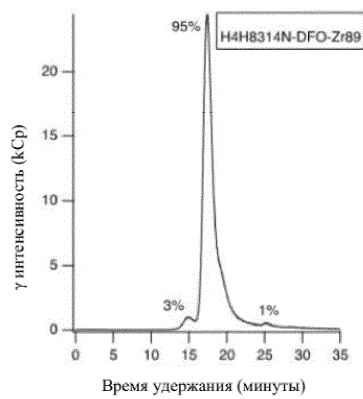
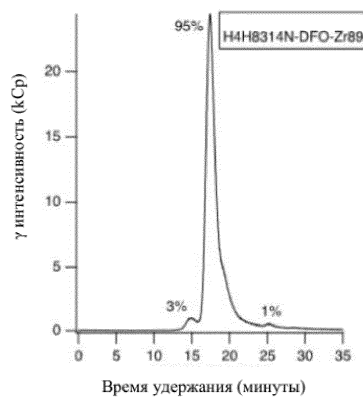
Фиг. 2A



Фиг. 2В

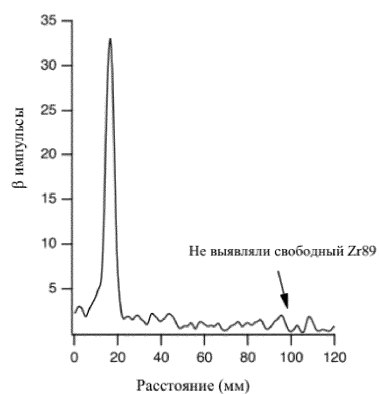
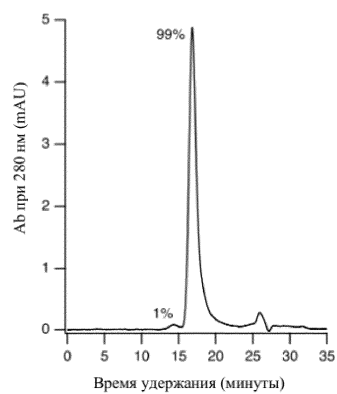


Фиг. 3



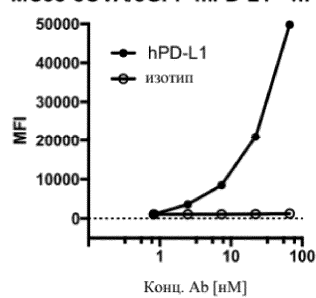
Фиг. 4

045226



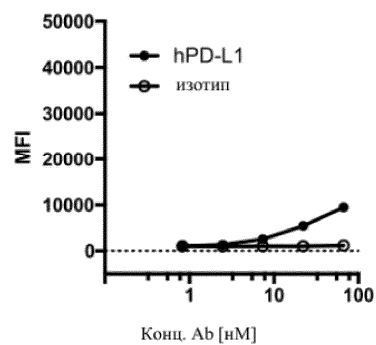
Фиг. 5

MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}



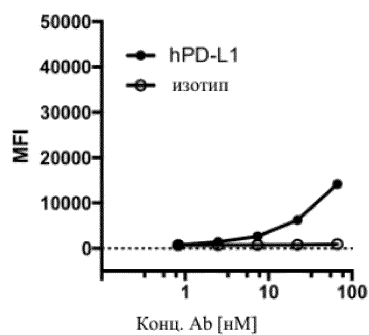
Фиг. 6А

LOX-IMVI



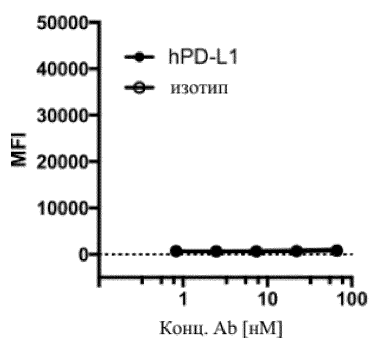
Фиг. 6В

MDA-MB-231

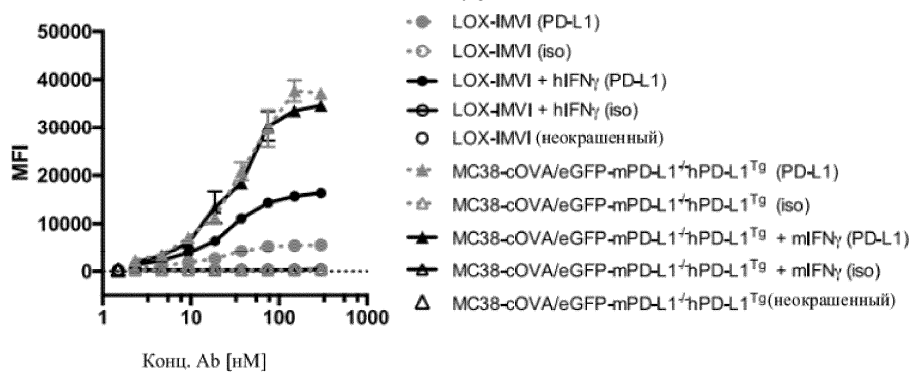


Фиг. 6С

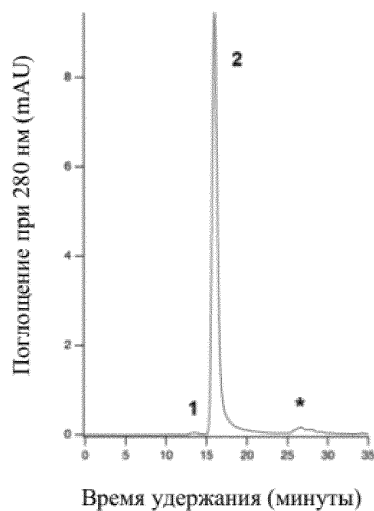
SK-Br-3



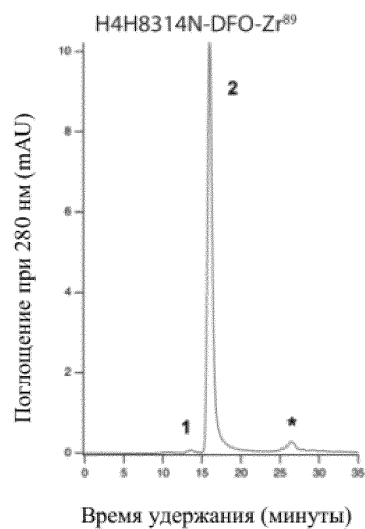
Фиг. 6D



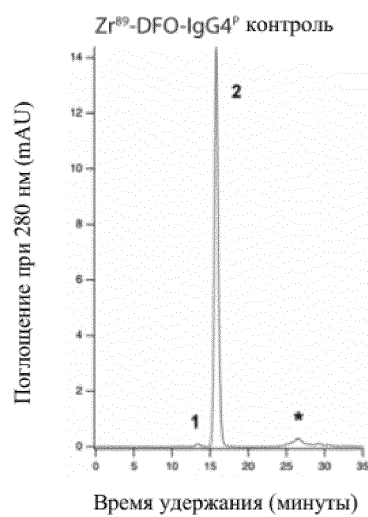
Фиг. 7

H4H8314N-DFO-Zr⁸⁹

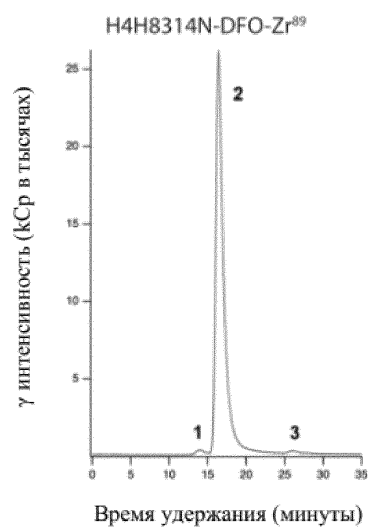
Фиг. 8А



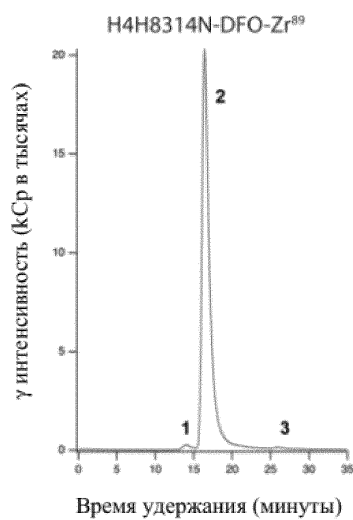
Фиг. 8B



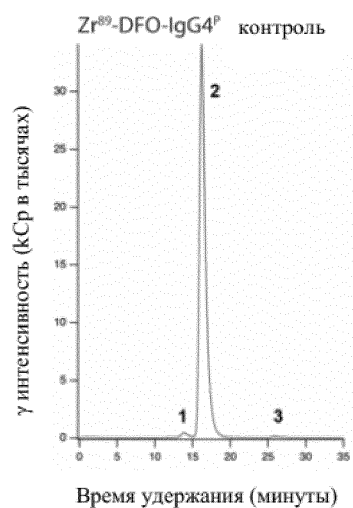
Фиг. 8C



Фиг. 8D

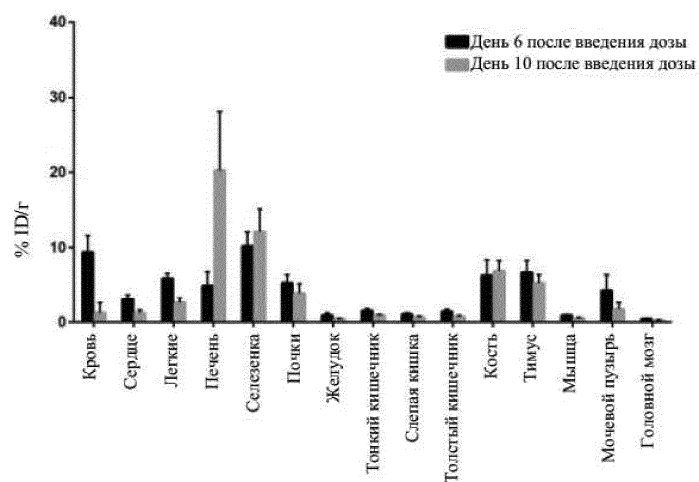


Фиг. 8E



Фиг. 8F

Биораспределение H4H8314N-DFO-Zr⁸⁹ в тканях, собранных
у мышей *PD-1^{hu/hu}* *PD-L1^{hu/hu}*



Фиг. 9

