



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/28 (2019.02); C07K 16/005 (2019.02); C07K 16/2818 (2019.02); A61K 35/00 (2019.02); A61K 39/395 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2017116847, 27.10.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
27.10.2015

Дата регистрации:  
02.03.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
27.10.2014 GB 1419084.7

(43) Дата публикации заявки: 30.11.2018 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 02.03.2020 Бюл. № 7

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 29.05.2017

(86) Заявка РСТ:  
SG 2015/050413 (27.10.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2016/068801 (06.05.2016)

Адрес для переписки:  
190000, Санкт-Петербург, ВОХ-1125,  
"ПАТЕНТИКА"

(72) Автор(ы):

ВАН Чэн-ай (SG),  
ОУ Хсуге Лин Джанис (SG),  
ЕО Сиок Пин (SG),  
ЛОУ Джианрон Лайнел (SG),  
ТАН Хви Чинь (SG)

(73) Патентообладатель(и):

ЭДЖЕНСИ ФО САЙЕНС,  
ТЕКНОЛОДЖИ ЭНД РЕСЁРЧ (SG)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: EP 1576014 A1, 21.09.2005. RU  
2007145419 A, 20.06.2009. AU 2013204861 A1,  
09.05.2013.

(54) АНТИТЕЛА К PD-1

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к антителу, которое специфично связывается с PD-1. Также раскрыты композиция, содержащая указанное антитело, нуклеиновая кислота, кодирующая указанное антитело, вектор и клетка-хозяин, содержащие указанную нуклеиновую кислоту. Раскрыты способы лечения рака и инфекционного заболевания, диагностики, отбора, обнаружения, усиления с помощью

указанного антитела, способ получения указанного антитела, способ размножения популяции Т-клеток и применение указанного антитела для приготовления лекарственного средства для обнаружения PD-1. Изобретение позволяет эффективно лечить заболевания, ассоциированные с PD-1. 18 н. и 3 з.п. ф-лы, 24 ил., 1 пр., 1 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*C07K 16/28* (2006.01)*C12N 15/13* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*A61K 35/00* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 31/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 16/28* (2019.02); *C07K 16/005* (2019.02); *C07K 16/2818* (2019.02); *A61K 35/00* (2019.02); *A61K 39/395* (2019.02)

(21)(22) Application: **2017116847, 27.10.2015**

(24) Effective date for property rights:  
**27.10.2015**

Registration date:  
**02.03.2020**

Priority:

(30) Convention priority:  
**27.10.2014 GB 1419084.7**

(43) Application published: **30.11.2018 Bull. № 34**(45) Date of publication: **02.03.2020 Bull. № 7**(85) Commencement of national phase: **29.05.2017**

(86) PCT application:  
**SG 2015/050413 (27.10.2015)**

(87) PCT publication:  
**WO 2016/068801 (06.05.2016)**

Mail address:  
**190000, Sankt-Peterburg, BOX-1125,  
"PATENTIKA"**

(72) Inventor(s):

**VAN Chen-aj (SG),  
OU Khsue Lin Dzhanis (SG),  
EO Siok Pin (SG),  
LOU Dzhianron Lajnel (SG),  
TAN Khvi Chin (SG)**

(73) Proprietor(s):

**EDZHENSI FO SAJENS, TEKNOLODZHI  
END RESERCH (SG)**

(54) **ANTIBODIES TO PD-1**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry, particularly to an antibody which specifically binds to PD-1. Also disclosed is a composition comprising said antibody, a nucleic acid encoding said antibody, a vector and a host cell containing said nucleic acid. Disclosed are methods of treating cancer and infectious disease,

diagnosing, selecting, detecting, amplifying using said antibody, a method for producing said antibody, a method of reproducing a population of T-cells and using said antibody for preparing a drug for detecting PD-1.

EFFECT: invention provides effective treatment of diseases associated with PD-1.

21 cl, 24 dwg, 1 tbl, 1 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с белком запрограммированной гибели клетки 1 (PD-1).

Уровень техники

5 Истощение Т-клеток это состояние, при котором происходит нарушение функций Т-клеток, возникающее при многих хронических инфекциях и раке. Указанное состояние характеризуется отсутствием надлежащей эффекторной функции Т-клеток, устойчивой экспрессией ингибиторных рецепторов и транскрипционным состоянием, которое отличается от такового для функциональных эффекторных Т-клеток или Т-клеток  
10 памяти. Истощение не позволяет оптимально контролировать инфекцию и опухоли. (E John Wherry., Nature Immunology 12, 492-499 (2011)).

Истощение Т-клеток характеризуется постепенной и прогрессирующей потерей функций Т-клеток. Истощение хорошо описано при хронической инфекции вирусом лимфоцитарного хориоменингита и обычно развивается в условиях персистенции  
15 антигена, которые возникают после многих хронических инфекций, включая инфекции вирусом гепатита В, вирусом гепатита С и вирусом иммунодефицита человека, а также во время образования метастаз опухолей. Истощение является неоднородным патологическим состоянием, поскольку может проявляться определенный набор фенотипических и функциональных дефектов, и Т-клетки, которые подверглись  
20 истощению, отличаются от прототипических эффекторных Т-клеток, Т-клеток памяти, а также энергических Т-клеток. Истощенные Т-клетки чаще всего появляются во время злокачественных хронических инфекций, при этом интенсивность и продолжительность антигенной стимуляции являются критическими факторами, определяющими этот процесс. (Yi et al., Immunology Apr 2010; 129(4):474-481).

25 Циркулирующие опухолеспецифичные CD8<sup>+</sup> Т-клетки человека могут быть цитотоксическими и вырабатывают цитокины в условиях *in vivo*, это свидетельствует о том, что аутологичные и опухолеспецифичные CD8<sup>+</sup> Т-клетки человека могут достигать функциональной компетентности после интенсивной иммунотерапии, такой как прививка  
30 с использованием пептида, неполного адьюванта Фрейнда (IFA) и CpG, или после адоптивного переноса клеток. В отличие от клеток периферической крови Т-клетки из метастазов являются функционально неполноценными, при этом они характеризуются аномально низкой выработкой цитокинов и активацией ингибиторных рецепторов PD-1, CTLA-4 и TIM-3. Функциональная неполноценность является обратимой, поскольку  
35 Т-клетки, выделенные из ткани меланомы, могут восстановить выработку ИФН- $\gamma$  после кратковременного культивирования в условиях *in vitro*. Тем не менее, еще предстоит определить, затрагивает ли функциональное нарушение последующие молекулярные пути, вероятно, как это происходит при истощении или анергии Т-клеток, согласно результатам определения на животных моделях. (Baitsch et al., J Clin Invest. 2011;121(6):2350-2360).

40 Белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), который также называется CD279, представляет собой мембранный белок типа I, кодируемый в организме человека геном PDCD1. Он имеет два лиганда, PD-L1 и PD-L2.

Путь передачи сигналов с участием PD-1 является одним из ключевых иммунных  
45 ингибирующих посредников истощения Т-клеток. Блокирование этого пути может привести к активации, размножению Т-клеток и усилению эффекторных функций Т-клеток. Следовательно, PD-1 отрицательно регулирует ответы Т-клеток. PD-1 был идентифицирован как маркер истощенных Т-клеток при хронических патологических состояниях, и было показано, что блокирование взаимодействий PD-1:PD-1L частично

восстанавливает функцию Т-клеток. (Sakuishi et al., JEM Vol. 207, September 27, 2010, pp 2187-2194).

Ниволумаб (BMS-936558) представляет собой антитело к PD-1, которое было одобрено для лечения меланомы в Японии в июле 2014 года. Другие антитела к PD-1 описаны в WO 2010/077634, WO 2006/121168, WO 2008/156712 и WO 2012/135408.

Домен Т-клеточного иммуноглобулина-муцина 3 (TIM-3) представляет собой иммунный регулятор, активность которого, как установлено, повышена в истощенных CD8<sup>+</sup> Т-клетках (Sakuishi et al., JEM Vol. 207, September 27, 2010, pp 2187-2194). Первоначально было установлено, что TIM-3 селективно экспрессируется на клетках Th1 и Tc1, секретирующих ИФН-γ. Взаимодействие TIM-3 с его лигандом, галектином-9, индуцирует гибель TIM-3<sup>+</sup> Т-клеток. Антитела к TIM-3 описаны в Ngiow et al (Cancer Res. 2011 May 15;71(10):3540-51) и в US 8552156.

Оба белка, TIM-3 и PD-1, могут функционировать как отрицательные регуляторы ответов Т-клеток, и одновременное воздействие на оба пути передачи сигналов с участием TIM-3 и PD-1 является более эффективным для контроля роста опухоли, чем воздействие на один из путей по отдельности. (Sakuishi et al., JEM Vol. 207, September 27, 2010, pp 2187-2194; и Ngiow et al Cancer Res. 2011 May 15;71(10):3540-51).

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с PD-1. В настоящем изобретении также предложены полипептиды тяжелой цепи и легкой цепи. Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и полипептиды могут быть обеспечены в выделенной и/или очищенной форме и могут быть изготовлены в виде композиций, пригодных для использования в исследованиях, терапии и диагностике.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или полипептид может быть эффективным для восстановления функции Т-клеток в Т-клетках, например, CD8<sup>+</sup> Т-клетках, которые характеризуются истощением Т-клеток или анергией Т-клеток.

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом аминокислотная последовательность указанного антитела может содержать аминокислотные последовательности i)-iii) или аминокислотные последовательности iv)-vi), или предпочтительно аминокислотные последовательности i)-vi):

- |               |  |                     |
|---------------|--|---------------------|
| i) LC-CDR1:   | SGSSSNIKFNSVN  | (SEQ ID NO: 25)     |
| ii) LC-CDR2:  | SNNQRPS  | (SEQ ID NO: 26)     |
| iii) LC-CDR3: | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> WDDX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> GX <sub>6</sub> X <sub>7</sub> | (SEQ ID NO: 53)     |
| iv) HC-CDR1:  | GFTFSSYGMH   | (SEQ ID NO: 39) или |
| HC-CDR1:      | SYGMH  | (SEQ ID NO: 89)     |
| v) HC-CDR2:   | VISYDGSNKYYADSVKG  | (SEQ ID NO: 40)     |
| vi) HC-CDR3:  | DZ <sub>1</sub> GZ <sub>2</sub> GZ <sub>3</sub> YZ <sub>4</sub> YGZ <sub>5</sub> DZ <sub>6</sub>             | (SEQ ID NO: 54),    |

или его вариант, в котором одна или две, или три аминокислоты в одной или более



из указанных последовательностей (i)-(vi) заменены другой аминокислотой, где  $X_1=A$  или S,  $X_2=S$  или A,  $X_3=V, Y, F, D, S$  или A,  $X_4=L, Y, V$  или A,  $X_5=Y, R$  или H,  $X_6=S$  или T,  $X_7=V, I$  или M и  $Z_1=L$  или Y,  $Z_2=A$  или S,  $Z_3=P$  или Y,  $Z_4=Y$  или L,  $Z_5=K, M$  или L,  $Z_6=H$  или V.

Применительно ко всем аспектам настоящего изобретения в предложенных вариантах реализации настоящего изобретения, в которых HC-CDR1: SYGMH (SEQ ID NO: 89), указанная последовательность может входить в состав большей последовательности GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения LC-CDR3 представляет собой одну из следующих последовательностей: ASWDDVLYGSV (SEQ ID NO: 27), ASWDDYYYGTI (SEQ ID NO: 28), ASWDDYLRGTV (SEQ ID NO: 29), SAWDDYLHGTV (SEQ ID NO: 30), ASWDDYVRGTM (SEQ ID NO: 31), SSWDDFLRGTV (SEQ ID NO: 32), SSWDDDARGTI (SEQ ID NO: 33), AAWDDVYYGTI (SEQ ID NO: 34), ASWDDSLYGTV (SEQ ID NO: 35), AAWDDAYYGTI (SEQ ID NO: 36), ASWDDVYRGTV (SEQ ID NO: 37) или SSWDDSLYGTI (SEQ ID NO: 38). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения HC-CDR3 представляет собой одну из следующих последовательностей: DLGAGPYYYGKDH (SEQ ID NO: 41), DLGAGPYYYGKDV (SEQ ID NO: 42), DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 43), DLGAGPYYYGLDV (SEQ ID NO: 44), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 45), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 46), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 47), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 48), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 49), DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 50), DLGSGYYLYGMDV (SEQ ID NO: 51) или DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 52).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие гипервариабельные участки (CDR):

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDVLYGSV (SEQ ID NO: 27).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDYYYGTI (SEQ ID NO: 28).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDYLRGTV (SEQ ID NO: 29).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)  
 LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)  
 LC-CDR3: SAWDDYLHGTV (SEQ ID NO: 30).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)  
 LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)  
 LC-CDR3: ASWDDYVRGTM (SEQ ID NO: 31).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)  
 LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)  
 LC-CDR3: SSWDDFLRGTV (SEQ ID NO: 32).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)  
 LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)  
 LC-CDR3: SSWDDDARGTI (SEQ ID NO: 33).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)  
 LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)  
 LC-CDR3: AAWDDVYYGTI (SEQ ID NO: 34).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)  
 LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)  
 LC-CDR3: ASWDDSLYGTV (SEQ ID NO: 35).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)  
 LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)  
 LC-CDR3: AAWDDAYYGTI (SEQ ID NO: 36).

5 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)  
 10 LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)  
 LC-CDR3: ASWDDVYRGTV (SEQ ID NO: 37).

15 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)  
 LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)  
 20 LC-CDR3: SSWDDSLYGTI (SEQ ID NO: 38).

20 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
 25 SYGMH (SEQ ID NO: 89)  
 HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)  
 HC-CDR3: DLGAGPYYYGKDH (SEQ ID NO: 41).

30 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
 SYGMH (SEQ ID NO: 89)  
 35 HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)  
 HC-CDR3: DLGAGPYYYGKDV (SEQ ID NO: 42).

40 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
 SYGMH (SEQ ID NO: 89)  
 HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)  
 45 HC-CDR3: DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 43).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
 SYGMH (SEQ ID NO: 89)  
 HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)  
 HC-CDR3: DLGAGPYYYYGLDV (SEQ ID NO: 44).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
 SYGMH (SEQ ID NO: 89)  
 HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)  
 HC-CDR3: DLGAGPYYYYGMDV (SEQ ID NO: 45).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
 SYGMH (SEQ ID NO: 89)  
 HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)  
 HC-CDR3: DLGAGPYYYYGMDV (SEQ ID NO: 46).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
 SYGMH (SEQ ID NO: 89)  
 HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)  
 HC-CDR3: DLGAGPYYYYGMDV (SEQ ID NO: 47).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
 SYGMH (SEQ ID NO: 89)  
 HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)  
 HC-CDR3: DLGAGPYYYYGMDV (SEQ ID NO: 48).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 49).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну варибельную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 50).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну варибельную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGSGYYLYGMDV (SEQ ID NO: 51).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать по меньшей мере одну варибельную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 52).

Антитело может содержать по меньшей мере одну варибельную область легкой цепи, содержащую CDR, представленные на фигурах 1 или 3. Антитело может содержать по меньшей мере одну варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR, представленные на фигурах 2 и 3.

Антитело может содержать по меньшей мере одну варибельную область легкой цепи ( $V_L$ ), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из одной из последовательностей SEQ ID NO: 1, 25, 26, 27 или 2, 25, 26, 28, или 3, 25, 26, 29, или 4, 25, 26, 30, или 5, 25, 26, 31, или 6, 25, 26, 32, или 7, 25, 26, 33, или 8, 25, 26, 34, или 9, 25, 26, 35, или 10, 25, 26, 36, или 11, 25, 26, 37, или 12, 25, 26, 38, или одну из аминокислотных последовательностей, представленных на фигуре 1, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, 25, 26, 27 или 2, 25, 26, 28, или 3, 25, 26, 29, или 4, 25, 26, 30, или 5, 25, 26, 31, или 6, 25, 26, 32, или 7, 25, 26, 33, или 8, 25, 26, 34, или 9, 25, 26, 35, или 10, 25, 26, 36, или 11, 25, 26, 37, или 12, 25, 26, 38, или аминокислотной последовательности цепи  $V_L$ ,

представленной на фигуре 1.

Антитело может содержать по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из одной из последовательностей SEQ ID NO: 13, 39 или 89, 40, 41, или 14, 39, или 89, 40, 42, или 15, 39, или 89, 40, 43, или 16, 39, или 89, 40, 44, или 17, 39, или 89, 40, 45, или 18, 39, или 89, 40, 46, или 19, 39, или 89, 40, 47, или 20, 39, или 89, 40, 48, или 21, 39, или 89, 40, 49, или 22, 39, или 89, 40, 50, или 23, 39, или 89, 40, 51, или 24, 39, или 89, 40, 52, или одну из аминокислотных последовательностей, представленных на фигуре 2, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, 39, 40, 41 или 14, 39, или 89, 40, 42, или 15, 39, или 89, 40, 43, или 16, 39, или 89, 40, 44, или 17, 39, или 89, 40, 45, или 18, 39, или 89, 40, 46, или 19, 39, или 89, 40, 47, или 20, 39, или 89, 40, 48, или 21, 39, или 89, 40, 49, или 22, 39, или 89, 40, 50, или 23, 39, или 89, 40, 51, или 24, 39, или 89, 40, 52, или аминокислотной последовательности цепи  $V_H$ , представленной на фигуре 2.

Антитело может содержать по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1, 25, 26, 27 или 2, 25, 26, 28, или 3, 25, 26, 29, или 4, 25, 26, 30, или 5, 25, 26, 31, или 6, 25, 26, 32, или 7, 25, 26, 33, или 8, 25, 26, 34, или 9, 25, 26, 35, или 10, 25, 26, 36, или 11, 25, 26, 37, или 12, 25, 26, 38, или одну из аминокислотных последовательностей, представленных на фигуре 1 (или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1, 25, 26, 27 или 2, 25, 26, 28, или 3, 25, 26, 29, или 4, 25, 26, 30, или 5, 25, 26, 31, или 6, 25, 26, 32, или 7, 25, 26, 33, или 8, 25, 26, 34, или 9, 25, 26, 35, или 10, 25, 26, 36, или 11, 25, 26, 37, или 12, 25, 26, 38, или одной из аминокислотных последовательностей цепи  $V_L$ , представленных на фигуре 1), и по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 13, 39 или 89, 40, 41, или 14, 39, или 89, 40, 42, или 15, 39, или 89, 40, 43, или 16, 39, или 89, 40, 44, или 17, 39, или 89, 40, 45, или 18, 39, или 89, 40, 46, или 19, 39, или 89, 40, 47, или 20, 39, или 89, 40, 48, или 21, 39, или 89, 40, 49, или 22, 39, или 89, 40, 50, или 23, 39, или 89, 40, 51, или 24, 39, или 89, 40, 52, или одну из аминокислотных последовательностей, представленных на фигуре 2 (или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 13, 39 или 89, 40, 41, или 14, 39, или 89, 40, 42, или 15, 39, или 89, 40, 43, или 16, 39, или 89, 40, 44, или 17, 39, или 89, 40, 45, или 18, 39, или 89, 40, 46, или 19, 39, или 89, 40, 47, или 20, 39, или 89, 40, 48, или 21, 39, или 89, 40, 49, или 22, 39, или 89, 40, 50, или 23, 39, или 89, 40, 51, или 24, 39, или 89, 40, 52, или одной из аминокислотных последовательностей цепи  $V_H$ , представленных на фигуре 2).

Антитела необязательно могут связываться с PD-1. Антитело может необязательно содержать компоненты аминокислотной последовательности, описанной выше. Антитело может представлять собой IgG. Согласно одному варианту реализации

настоящего изобретения предложен комплекс в условиях *in vitro*, необязательно выделенный, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, связанный с PD-1.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен выделенный полипептид варибельной области тяжелой цепи, причем указанный полипептид варибельной области тяжелой цепи содержит следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или  
SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DZ<sub>1</sub>GZ<sub>2</sub>GZ<sub>3</sub>YZ<sub>4</sub>YGZ<sub>5</sub>DZ<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 54),

где Z<sub>1</sub>=L или Y, Z<sub>2</sub>=A или S, Z<sub>3</sub>=P или Y, Z<sub>4</sub>=Y или L, Z<sub>5</sub>=K, M или L, Z<sub>6</sub>=H или V.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения HC-CDR3 представляет собой одну из последовательностей DLGAGPYYYGKDH (SEQ ID NO: 41), DLGAGPYYYGKDV (SEQ ID NO: 42), DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 43), DLGAGPYYYGLDV (SEQ ID NO: 44), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 45), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 46), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 47), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 48), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 49), DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 50), DLGSGYYLYGMDV (SEQ ID NO: 51) или DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 52).

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи и легкой цепи, в котором:

тяжелая цепь содержит HC-CDR1, HC-CDR2, HC-CDR3, последовательности которых по меньшей мере на 85% идентичны

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или SYGMH (SEQ ID NO: 89),

HC-CDR2 VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40),

HC-CDR3: представляет собой одну из последовательностей DZ<sub>1</sub>GZ<sub>2</sub>GZ<sub>3</sub>YZ<sub>4</sub>YGZ<sub>5</sub>DZ<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 54), DLGAGPYYYGKDH (SEQ ID NO: 41), DLGAGPYYYGKDV (SEQ ID NO: 42), DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 43), DLGAGPYYYGLDV (SEQ ID NO: 44), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 45), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 46), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 47), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 48), DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 49), DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 50), DLGSGYYLYGMDV (SEQ ID NO: 51) или DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 52), соответственно, где Z<sub>1</sub>=L или Y, Z<sub>2</sub>=A или S, Z<sub>3</sub>=P или Y, Z<sub>4</sub>=Y или L, Z<sub>5</sub>=K, M или L, Z<sub>6</sub>=H или V, и

легкая цепь содержит LC-CDR1, LC-CDR2, LC-CDR3, последовательности которых по меньшей мере на 85% идентичны

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25),

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26),

LC-CDR3: представляет собой одну из последовательностей X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>WDDX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>GX<sub>6</sub>X<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 53), ASWDDVLYGSV (SEQ ID NO: 27), ASWDDYYGTY (SEQ ID NO: 28), ASWDDYLRGTV (SEQ ID NO: 29), SAWDDYLHGTV (SEQ ID NO: 30), ASWDDYVRGTM (SEQ ID NO: 31), SSWDDFLRGTV (SEQ ID NO: 32), SSWDDDDARGTI (SEQ ID NO: 33), AAWDDVYYGTI (SEQ ID NO: 34), ASWDDSLYGTV (SEQ ID NO: 35), AAWDDAYYGTI

(SEQ ID NO: 36), ASWDDVYRGTV (SEQ ID NO: 37) или SSWDDSLYGTI (SEQ ID NO: 38), соответственно, где  $X_1=A$  или S,  $X_2=S$  или A,  $X_3=V$ , Y, F, D, S или A,  $X_4=L$ , Y, V или A,  $X_5=Y$ , R или H,  $X_6=S$  или T,  $X_7=V$ , I или M.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения степень идентичности последовательностей может составлять 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно выделенный, содержащий последовательность вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи, в котором: последовательность тяжелой цепи по меньшей мере на 85% идентична одной из последовательностей тяжелой цепи, представленных в SEQ ID NO: 13-24 (фигура 2), и последовательность легкой цепи по меньшей мере на 85% идентична одной из последовательностей легкой цепи, представленных в SEQ ID NO: 1-12 (фигура 1).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения степень идентичности последовательностей может составлять 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид дополнительно содержит последовательности каркаса вариабельной области тяжелой цепи между CDR согласно схеме HCFR1:HC-CDR1:HCFR2:HC-CDR2:HCFR3:HC-CDR3:HCFR4. Последовательности каркаса могут быть получены из консенсусных последовательностей каркаса человека.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен выделенный полипептид вариабельной области легкой цепи, необязательно в комбинации с полипептидом вариабельной области тяжелой цепи, описанной в настоящем документе, при этом полипептид вариабельной области легкой цепи содержит следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3:  $X_1X_2WDDX_3X_4X_5GX_6X_7$  (SEQ ID NO: 53),

где  $X_1=A$  или S,  $X_2=S$  или A,  $X_3=V$ , Y, F, D, S или A,  $X_4=L$ , Y, V или A,  $X_5=Y$ , R или H,  $X_6=S$  или T,  $X_7=V$ , I или M.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения LC-CDR3 представляет собой одну из последовательностей ASWDDVLYGSV (SEQ ID NO: 27), ASWDDYYYGTI (SEQ ID NO: 28), ASWDDYLRGTV (SEQ ID NO: 29), SAWDDYLHGTV (SEQ ID NO: 30), ASWDDYVRGTM (SEQ ID NO: 31), SSWDDFLRGTV (SEQ ID NO: 32), SSWDDDARGTI (SEQ ID NO: 33), AAWDDVYYGTI (SEQ ID NO: 34), ASWDDSLYGTI (SEQ ID NO: 35), AAWDDAYYGTI (SEQ ID NO: 36), ASWDDVYRGTV (SEQ ID NO: 37) или SSWDDSLYGTI (SEQ ID NO: 38).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид дополнительно содержит каркасные последовательности вариабельной области легкой цепи между CDR в соответствии со схемой LCFR1:LC-CDR1:LCFR2:LC-CDR2:LCFR3:LC-CDR3:LCFR4. Каркасные последовательности могут быть получены из консенсусных каркасных последовательностей человека.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может дополнительно содержать константную область



человека. Например, константную область, выбранную из одной из областей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент может дополнительно содержать константную область

5 мыши. Например, константную область, выбранную из одной из областей IgG1, IgG2A, IgG2B и IgG3.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, необязательно выделенный, который способен связываться с PD-1 и который представляет собой биспецифичное антитело или

10 биспецифичный антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичное антитело или биспецифичный антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, способный связываться с PD-1, как описано в настоящем документе, и дополнительно содержит домен связывания антигена, который способен связываться

15 с другим белком-мишенью, например, белком-мишенью, отличным от PD-1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок-мишень представляет собой поверхностный рецептор клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок-мишень представляет собой поверхностный рецептор клеток, экспрессируемый на поверхности иммунных клеток, например, Т-клеток.

20 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок-мишень может быть членом семейства CD28. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения член семейства CD28 выбран из TIM-3, LAG3, ICOS, CTLA4, BTLA или CD28.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена композиция,

25 например, фармацевтическая композиция или лекарственное средство. Композиция может содержать антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, описанный в настоящем документе, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество, адъювант или разбавитель.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена выделенная

30 нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, описанный в настоящем документе. Нуклеиновая кислота может содержать последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 или 88 (фигура 4), или кодирующую последовательность, которая является вырожденной как

35 результат генетического кода, или может содержать нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична указанной последовательности, возможно, идентична на 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен вектор, содержащий

40 нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая вектор. Например, клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку или клетку млекопитающего, например, клетку яичника китайского хомяка (СНО) или клетку человека, или может представлять собой прокариотическую клетку, например, E. coli.

45 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанного в настоящем документе, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, описанной в настоящем документе, в условиях, подходящих для экспрессии

вектора, кодирующего антитело или антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента или полипептида.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид для применения в терапии или в способе  
5 лечения. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, описанный в настоящем документе, для применения в лечении нарушения функционирования Т-клеток. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанного в настоящем документе,  
10 в производстве лекарственного средства или фармацевтической композиции для применения в лечении нарушения функционирования Т-клеток.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ усиления функции Т-клеток, включающий введение антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанного в настоящем документе, в Т-клетку с нарушенными  
15 функциями. Способ можно осуществлять в условиях *in vitro* и в условиях *in vivo*.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения нарушения функционирования Т-клеток, включающий введение антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанного в настоящем документе, пациенту, страдающему нарушением функционирования Т-клеток.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ модулирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанного в настоящем документе, так, что у субъекта модулируется иммунный ответ.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ ингибирования  
25 размножения опухолевых клеток у субъекта, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанного в настоящем документе.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ, который включает приведение образца, содержащего или предположительно содержащего PD-1, в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем  
30 документе, и детектирование образования комплекса антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с PD-1.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ диагностики заболевания или состояния у субъекта, причем способ включает приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем документе, в условиях *in vitro* и детектирование образования  
35 комплекса антитела или антигенсвязывающего фрагмента с PD-1.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ отбора или стратификации субъекта для лечения с использованием агентов, нацеленных к PD-1, причем способ включает приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, в соответствии с настоящим изобретением, в условиях *in vitro* и детектирование образования комплекса антитела или антигенсвязывающего фрагмента с PD-1.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, для  
45 детектирования PD-1 в условиях *in vitro*. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, в качестве диагностического агента в условиях *in*

vitro.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ размножения популяции Т-клеток, причем указанный способ включает приведение Т-клеток в контакт с антителом, его антигенсвязывающим фрагментом или полипептидом в соответствии с настоящим изобретением в условиях *in vitro* или *ex vivo*.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего нарушение функционирования Т-клеток, причем указанный способ включает культивирование Т-клеток, полученных из образца крови субъекта, в присутствии антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида согласно настоящему изобретению, чтобы размножить популяцию Т-клеток, сбор размноженных Т-клеток, а также введение размноженных Т-клеток субъекту, нуждающемуся в лечении.

В способах согласно настоящему изобретению антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид могут быть представлены в виде композиции, описанной в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело может представлять собой клон антитела А3, А10, В6, С4, D4, Е1, F2, G1, G2, G10, Н4 или Н9, описанный в настоящем документе.

#### Описание

#### Антитела

Антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно связываются с PD-1 (антиген), предпочтительно с PD-1 человека или макаки-резуса, необязательно с величиной  $K_d$ , которая находится в диапазоне от 0,1 до 2 нМ.

Согласно любому аспекту настоящего изобретения антитело предпочтительно специфично связывается с PD-1 (например, человека или макаки-резуса) по сравнению с другими членами семейства CD28 (предпочтительно из того же организма), например, одним или более или любым из TIM-3 (HAVCR2), LAG3 (CD223), ICOS (CD278), CTLA4 (CD 152), BTLA (CD272) или CD28.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть предложены в выделенной форме.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут обладать по меньшей мере одним из следующих свойств:

а) связываться с PD-1 человека с величиной  $K_d$  1 мкМ или менее, предпочтительно с величиной  $K_D \leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 800$  пМ,  $\leq 700$  пМ,  $\leq 600$  пМ,  $\leq 500$  пМ,  $\leq 400$  пМ,  $\leq 300$  пМ,  $\leq 200$  пМ или  $\leq 100$  пМ;

б) по существу не связываться с TIM-3, LAG3, ICOS, CTLA4, BTLA или CD28 человека;

с) увеличивать пролиферацию Т-клеток в количественном исследовании реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ) (например, см. Bromelow et al J. Immunol Methods, 2001 Jan 1;247(1-2):1-8);

д) увеличивать выработку ИФН- $\gamma$  в количественном исследовании СКЛ; или

е) увеличивать секрецию интерлейкина-2 (ИЛ-2) в количественном исследовании СКЛ.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела могут быть способны увеличивать выработку ИФН- $\gamma$  в количественном исследовании СКЛ в зависимости от дозы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела могут быть способны увеличивать выработку ИФН- $\gamma$  в количественном исследовании СКЛ лимфоцитами, экспрессирующими один или более маркеров истощения, например, PD-1.

Под термином «антитело» понимают его фрагмент или его производное или синтетическое антитело или фрагмент синтетического антитела.

С учетом современных методик в отношении технологии моноклональных антител, антитела могут быть получены для большинства антигенов. Антигенсвязывающий участок может быть частью антитела (например, фрагмент Fab) или фрагментом синтетического антитела (например, одноцепочечный фрагмент Fv [scFv]). Подходящие моноклональные антитела к выбранным антигенам могут быть получены с помощью известных методик, например, тех, которые описаны в "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) и в "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", JGR Hurrell (CRC Press, 1982). Химерные антитела обсуждаются Neuberger et al (1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799).

Моноклональные антитела (MAT) могут быть использованы в способах согласно настоящему изобретению и представляют собой гомогенную популяцию антител, специфично нацеленных к одному эпитопу на антигене.

Поликлональные антитела можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Предпочтительными являются моноспецифичные поликлональные антитела. Подходящие поликлональные антитела могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в данной области техники.

Антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как фрагменты Fab и Fab<sub>2</sub>, также могут быть использованы/обеспечены в виде модифицированных антител и фрагментов антител. Вариабельная область тяжелой цепи (V<sub>h</sub>) и вариабельная область легкой цепи (V<sub>l</sub>) антитела участвуют в распознавании антигена, этот факт был впервые обнаружен в первоначальных экспериментах с использованием протеазного расщепления.

Дальнейшее подтверждение было найдено с применением «гуманизации» антител грызунов. Вариабельные области грызунов могут быть гибридизованы с константными областями человека так, что полученное антитело сохраняет антигенную специфичность исходного антитела грызуна (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

Антигенная специфичность обеспечивается вариабельными областями и не зависит от константных областей, как известно из экспериментов с использованием бактериальной экспрессии фрагментов антител, все из которых содержат одну или более вариабельных областей. Перечисленные молекулы включают Fab-подобные молекулы (Better et al (1988) Science 240, 1041); молекулы Fv (Skerra et al (1988) Science 240, 1038); одноцепочечные молекулы Fv (scFv), в которых партнерские домены V<sub>h</sub> и V<sub>l</sub> связаны посредством гибкого олигопептида (Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) и однодоменные антитела (dAbs), содержащие выделенные вариабельные области (Ward et al (1989) Nature 341, 544). Общий обзор методик синтеза фрагментов антител, которые сохраняют свои специфичные сайты связывания, можно найти в Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299.

Под термином «молекулы scFv» подразумевают молекулы, в которых партнерские домены V<sub>h</sub> и V<sub>l</sub> ковалентно связаны, например, с помощью гибкого олигопептида.

Фрагменты антител Fab, Fv, scFv и dAb могут быть экспрессированы клетками E. coli и могут быть секретируются из них, обеспечивая тем самым легкий способ получения больших количеств указанных фрагментов.

Целые антитела и фрагменты F(ab')<sub>2</sub> являются «двухвалентными». Под термином «двухвалентный» подразумевают, что указанные антитела и фрагменты F(ab')<sub>2</sub> содержат два антигенсвязывающих сайта. Напротив, фрагменты Fab, Fv, scFv и dAb являются

одновалентными и содержат только один антигенсвязывающий сайт. Синтетические антитела, которые связываются с PD-1, также могут быть изготовлены с использованием технологии фагового дисплея, как хорошо известно в данной области техники.

В настоящем изобретении также предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с PD-1, и который представляет собой биспецифичное антитело или биспецифичный антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичное антитело или биспецифичный антигенсвязывающий фрагмент может быть выделенным.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичные антитела и биспецифичные антигенсвязывающие фрагменты содержат антигенсвязывающий фрагмент или полипептид в соответствии с настоящим изобретением. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичные антитела и биспецифичные антигенсвязывающие фрагменты содержат антигенсвязывающий домен, способный связываться с PD-1, причем указанный антигенсвязывающий домен, который способен связываться с PD-1, содержит или состоит из антигенсвязывающего фрагмента или полипептида в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичные антитела и биспецифичные антигенсвязывающие фрагменты содержат антигенсвязывающий домен, способный связываться с PD-1, и антигенсвязывающий домен, способный связываться с другим белком-мишенью.

Антигенсвязывающий домен, способный связываться с другим белком-мишенью, может быть способен связываться с другим белком, отличным от PD-1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок-мишень представляет собой поверхностный рецептор клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок-мишень представляет собой поверхностный рецептор клеток, экспрессируемый на поверхности иммунных клеток, например, Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок-мишень может быть членом семейства CD28. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения белок-мишень может быть членом семейства CD28, таким как TIM-3 (HAVCR2), LAG3 (CD223), ICOS (CD278), CTLA4 (CD 152), BTLA (CD272) или CD28. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения белок-мишень может представлять собой CTLA4 или LAG3.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен TIM-3 может содержать CDR, вариабельные области легкой и тяжелой цепей или другой фрагмент, связывающий TIM-3, например, клон антитела TIM-3, F38-2E2 (BioLegend), клон 2E2 (Merck Millipore), клон 6B6E2, клон 024 (Sino Biological), клон 344801 (R&D Systems), клон E-18, клон H-191 (Santa Cruz Biotechnology), или клон 13A224 (United States Biological). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен LAG3 может содержать CDR, вариабельные области легкой и тяжелой цепей или другой фрагмент, связывающий LAG3, например, клон антитела к LAG-3, 17B4 (Enzo Life Sciences), клон 333210 (R&D Systems), или клон 14L676 (United States Biological). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен для ICOS может содержать CDR, вариабельные области легкой и тяжелой цепей или другой фрагмент, связывающий ICOS, например, клон антитела к ICOS, ISA-3 (eBioscience), клон SP98 (Novus Biologicals), клон 1G1, клон 3G4 (Abnova Corporation), клон 669222 (R&D Systems), клон TQ09 (Creative Diagnostics) или клон C398.4A (BioLegend). Согласно некоторым

вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен CTLA4 может содержать CDR, вариабельные области легкой и тяжелой цепей или другой фрагмент, связывающий CTLA4, например, клон антитела к CTLA-4, 42F1, клон 1F4 (Abnova Corporation), клон 9H10 (EMD Millipore), клон BNU3 (GeneTex), клон 1E2, клон AS32 (LifeSpan Biosciences), клон A3.4H2.H12 (Acris Antibodies), клон 060 (Sino Biological), клон BU5G3 (Creative Diagnostics), клон M1H8 (MBL International), клон A3.6B10.G1 или клон L3D10 (BioLegend). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен для BTLA может содержать CDR, вариабельные области легкой и тяжелой цепей или другой фрагмент, связывающий BTLA, например, клон антитела к BTLA, 1B7, клон 2G8, клон 4C5 (Abnova Corporation), клон 4B8 (antibodies-online), клон M1H26 (Thermo Scientific Pierce Antibodies), клон UMAB61 (OriGene Technologies), клон 330104 (R&D Systems), клон 1B4 (LifeSpan Biosciences), клон 440205, клон 5E7 (Creative Diagnostics). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен для CD28 может содержать CDR, вариабельные области легкой и тяжелой цепей или другой фрагмент, связывающий CD28, например, клон антитела к CD28, CD28.6 (eBioscience), клон CD28.2, клон JJ319 (Novus Biologicals), клон 204.12, клон B-23, клон 10F3 (Thermo Scientific Pierce Antibodies), клон 37407 (R&D Systems), клон 204-12 (Abnova Corporation), клон 15E8 (EMD Millipore), клон 204-12, клон YTH913.12 (AbD Serotec), клон B-T3 (Acris Antibodies), клон 9H6E2 (Sino Biological), клон C28/77 (MyBioSource.com), клон KOLT-2 (ALPCO), клон 152-2E10 (Santa Cruz Biotechnology) или клон XPH-56 (Creative Diagnostics).

Антигенсвязывающий домен биспецифичного антитела или биспецифичного антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любой домен полипептида, который способен связываться с антигеном. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т.е. LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3) и три CDR тяжелой цепи (т.е. HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3), которые совместно определяют антигенсвязывающий участок антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен может содержать вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен может содержать полипептид легкой цепи и полипептид тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Биспецифичные антитела и биспецифичные антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут быть представлены в любом подходящем формате, например, в форматах, описанных в работе Kontermann MAb 2012, 4(2): 182-197, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки. Например, биспецифичное антитело или биспецифичный антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой конъюгат биспецифичного антитела (например, IgG2, F(ab')<sub>2</sub> или CovX-Body), биспецифичный IgG или IgG-подобную молекулу (например, IgG, scFv<sub>4</sub>-Ig, IgG-scFv, scFv-IgG, DVD-Ig, IgG-sVD, sVD-IgG, 2 в 1-IgG, mAb<sup>2</sup> или Tandemab обычной LC), асимметричный биспецифичный IgG или IgG-подобную молекулу (например, kih IgG, kih IgG обычной LC, CrossMab, kih IgG-scFab, mAb-Fv, заряженную пару или SEED-body), небольшую молекулу биспецифичного антитела (например, диатело dsDb, DART, scDb, tandAbs, тандем ScFv (taFv), тандем dAb/VHH, триатело, тривалентные антитела, Fab-scFv или F(ab')<sub>2</sub>-scFv<sub>2</sub>), биспецифичную область Fc и гибридный белок C<sub>H</sub>3 (например,

taFv-Fc, Di-диатело, scDb-C<sub>H</sub>3, scFv-Fc-scFv, HCAb-VHH, scFv-kih-Fc или scFv-kih-C<sub>H</sub>3) или биспецифичный гибридный белок (например, scFv<sub>2</sub>-альбумин, scDb-альбумин, taFv-токсин, DNL-Fab<sub>3</sub>, DNL-Fab<sub>4</sub>-IgG, DNL-Fab<sub>4</sub>-IgG-цитокин<sub>2</sub>). См., в частности, фигуру 2 в работе Kontermann MABs 2012, 4(2): 182-19.

Специалист в данной области техники может разработать и получить биспецифичные антитела и биспецифичные антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением.

Способы получения биспецифичных антител включают химическую сшивку антител или фрагментов антител, например, с помощью восстанавливаемых дисульфидных или невосстанавливаемых тиоэфирных связей, например, как описано в работе Segal and Bast, 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки. Например, N-сукцинимидил-3-(-2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) может быть использован для химической сшивки, например, фрагментов Fab с помощью SH-групп шарнирной области, чтобы создать дисульфид-сшитые биспецифичные гетеродимеры F(ab)<sub>2</sub>.

Другие способы получения биспецифичных антител включают гибридизацию вырабатывающего антитела гибрида, например, с полиэтиленгликолем, чтобы получить клетку квадromы, способную секретировать биспецифичное антитело, например, как описано в работе D.M. Segal and Bast, B.J. 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16.

Биспецифичные антитела и биспецифичные антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением также могут быть получены рекомбинантным способом, путем экспрессии, например, с конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды для антигенсвязывающих молекул, например, как описано в работах Antibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition (Humana Press, 2012), в главе 40: Production of Bispecific Antibodies: Diabodies and Tandem scFv (Hornig and **Färber-Schwarz**) или French, How to make bispecific antibodies, Methods Mol. Med. 2000; 40:333-339, полное содержание которых включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Например, конструкция ДНК, кодирующая переменные области легкой и тяжелой цепей для двух антигенсвязывающих доменов (т.е. переменные области легкой цепи и тяжелой цепи для антигенсвязывающего домена, способного связываться с PD-1, а также переменные области легкой цепи и тяжелой цепи для антигенсвязывающего домена, способного связываться с другим белком-мишенью), включая последовательности, кодирующие подходящий линкер, или домен димеризации между антигенсвязывающими доменами, может быть получена с помощью методик молекулярного клонирования. Рекомбинантные биспецифичные антитела затем могут быть получены путем экспрессии (например, в условиях *in vitro*) конструкции в подходящей клетке-хозяине (например, клетке-хозяине млекопитающих), и экспрессированное рекомбинантное биспецифичное антитело затем необязательно может быть очищено.

Антитела могут быть получены с помощью способа созревания аффинности, в котором получают модифицированное антитело с улучшенной аффинностью указанного антитела в отношении антигена, по сравнению с немодифицированным исходным антителом. Антитела с созревшей аффинностью могут быть получены способами, известными в данной области техники, например, см. Marks et al., Bio/Technology 10:779-

783 (1992); Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169: 147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al, J. Immunol. 154 (7):3310-159 (1995); и Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

Антитела в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно специфично связываются с PD-1. Антитело, которое специфично связывается с молекулой-мишенью, предпочтительно связывается с мишенью с более высокой аффинностью, и/или в течение более длительного периода времени, чем оно связывается с другими мишенями. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения степень связывания антитела с неродственной мишенью составляет менее чем приблизительно 10% от величины степени связывания антитела с мишенью, согласно результатам измерения, например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) или с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В другом варианте специфичность связывания может быть отражена с использованием аффинности связывания, при этом антитело к PD-1 согласно настоящему изобретению связывается с PD-1 с  $K_D$ , величина которой по меньшей мере на 0,1 порядка (т.е.  $0,1 \times 10^n$ , где n представляет собой целое число, представляющее порядок величины) превышает величину  $K_D$  антитела в отношении другой молекулы-мишени, например, другого члена семейства CD28. Величина  $K_D$  необязательно может представлять собой одну величину из по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5 или 2,0.

Антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно имеют константу диссоциации ( $K_d$ )  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ или  $\leq 100$  пМ. Аффинность связывания антитела в отношении его мишени часто описывают, используя его константу диссоциации ( $K_d$ ). Величина аффинности связывания может быть измерена с помощью способов, известных в данной области техники, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса или с помощью количественного исследования связывания радиоактивно меченого антигена (RIA), который проводят с использованием фрагмента Fab молекулы антитела и антигена.

Антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой антитела «антагонисты», которые ингибируют или уменьшают биологическую активность антигена, с которым они связываются. Блокирование PD-1 помогает восстанавливать функцию Т-клеток путем ингибирования иммунного ингибирующего сигнального пути, опосредованного PD-1.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой клон А3 или вариант А3. А3 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDVLYGSV (SEQ ID NO: 27)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYGKDH (SEQ ID NO: 41).



Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой клон A10 или вариант A10. A10 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDYYYGTI (SEQ ID NO: 28)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYYGKDV (SEQ ID NO: 42).

Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой клон B6 или вариант B6. B6 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDYLRGTV (SEQ ID NO: 29)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DYGAGPYYYYGMDV (SEQ ID NO: 43).

Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой клон C4 или вариант C4. C4 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: SAWDDYLHGTV (SEQ ID NO: 30)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYYGLDV (SEQ ID NO: 44).

Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой

клон D4 или вариант D4. D4 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDYVRGTM (SEQ ID NO: 31)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYYGMDV (SEQ ID NO: 45).

Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой клон антитела E1 или вариант E1. E1 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: SSWDDFLRGTV (SEQ ID NO: 32)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYYGMDV (SEQ ID NO: 46).

Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой клон F2 или вариант F2. F2 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: SSWDDDDARGTI (SEQ ID NO: 33)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYYGMDV (SEQ ID NO: 47).

Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой клон G1 или вариант G1. G1 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: AAWDDVYYGTI (SEQ ID NO: 34)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 48).

Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой клон G2 или вариант G2. G2 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDSLYGTV (SEQ ID NO: 35)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 49).

Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой клон G10 или вариант G10. G10 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: AAWDDAYYGTI (SEQ ID NO: 36)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DYAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 50).

Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой клон H4 или вариант H4. H4 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDVYRGTV (SEQ ID NO: 37)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGSGYYLYGMDV (SEQ ID NO: 51).

Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антитело представляет собой клон Н9 или вариант Н9. Н9 содержит следующие последовательности CDR:

Легкая цепь:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: SSWDDSLYGTI (SEQ ID NO: 38)

Тяжелая цепь:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39) или

SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 52).

Последовательности CDR определены в соответствии с системой Кабат (Kabat).

Антитела согласно настоящему изобретению могут содержать CDR одного из клонов А3, А10, В6, С4, D4, Е1, F2, G1, G2, G10, Н4 или Н9 или одной из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1 и 13, 2 и 14, 3 и 15, 4 и 16, 5 и 17, 6 и 18, 7 и 19, 8 и 20, 9 и 21, 10 и 22, 11 и 23, или 12 и 24. В антителе согласно настоящему изобретению одна или две, или три, или четыре из шести последовательностей CDR могут варьироваться. Вариант может содержать одну или две замены аминокислот в одной или двух из шести последовательностей CDR.

Аминокислотные последовательности цепей  $V_H$  и  $V_L$  клонов антитела к PD-1 представлены на фигурах 1 и 2. Кодировующие нуклеотидные последовательности представлены на фигуре 4.

CDR легкой цепи и тяжелой цепи также могут быть особенно пригодными в комбинации с целым рядом различных каркасных областей. Соответственно, легкие и/или тяжелые цепи, содержащие LC-CDR1-3 или HC-CDR1-3, могут содержать альтернативный каркасный участок. Подходящие каркасные участки хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в работе M. Lefranc & G. Lefranc (2001) "The Immunoglobulin FactsBook", Academic Press, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки.

В данном описании антитела могут содержать цепи  $V_H$  и/или  $V_L$ , содержащие аминокислотную последовательность, которая имеет высокий процент идентичности последовательностей с одной или более из аминокислотных последовательностей  $V_H$

и/или V<sub>1</sub>, представленных в SEQ ID NO: 1 и 13, 2 и 14, 3 и 15, 4 и 16, 5 и 17, 6 и 18, 7 и 19, 8 и 20, 9 и 21, 10 и 22, 11 и 23, или 12 и 24, соответственно, или с одной из аминокислотных последовательностей, представленных на фигурах 1 и 2.

Например, антитела в соответствии с настоящим изобретением включают антитела, которые связываются с PD-1 и содержат цепь V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>, которая содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности цепи V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>, представленной в SEQ ID NO: 1-24, или одной из аминокислотных последовательностей, представленных на фигурах 1 и 2.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть помечены детектируемой меткой или по меньшей мере пригодны для детектирования. Например, антитело может быть помечено радиоактивным атомом или окрашенной молекулой или флуоресцентной молекулой, или молекулой, которую можно легко детектировать любым другим способом. Подходящие детектируемые молекулы включают флуоресцентные белки, люциферазу, субстраты ферментов и радиоактивные метки. Связывающий фрагмент может быть непосредственно помечен детектируемой меткой или может быть помечен косвенным образом. Например, связывающий фрагмент может представлять собой немеченое антитело, которое можно детектировать с помощью другого антитела, которое в свою очередь является меченым. В другом варианте второе антитело может быть связано с биотином, и связывание меченого стрептавидина с биотином используют для непрямого детектирования первого антитела.

#### Способы детектирования

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в способах, которые включают связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с PD-1. Указанные способы могут включать детектирование связанного комплекса антитела или антигенсвязывающего фрагмента с PD-1. Следовательно, в одном варианте реализации предложен способ, включающий приведение образца, содержащего или предположительно содержащего PD-1, в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем документе, и детектирование образования комплекса антитела или антигенсвязывающего фрагмента с PD-1.

Подходящие варианты способов хорошо известны в данной области техники, включая иммунологические количественные исследования, такие как исследования в формате «сэндвич», например, ИФА. Способ может включать мечение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или PD-1, или их обоих, детектируемой меткой, например, флуоресцентной, люминесцентной или радиоактивной меткой.

Подходящие способы могут служить основой способа диагностики заболевания или состояния, требующего детектирования и количественного определения PD-1.

Подходящие способы можно осуществлять в условиях *in vitro* на образце пациента или после обработки образца пациента. После получения образца присутствие пациента не требуется для проведения диагностики в условиях *in vitro*, и в этой связи способ может представлять собой способ, который не требует для своего проведения наличия тела человека или животного.

Указанные способы могут включать определение количества PD-1, присутствующего в образце пациента. Способ может дополнительно включать сравнение определенного количества со стандартной или эталонной величиной как часть способа постановки

диагноза. Другие диагностические тесты могут быть использованы в комбинации с теми, которые описаны в настоящем документе, чтобы повысить точность диагноза или прогноза или подтвердить полученный результат с помощью тестов, описанных в настоящем документе.

5 Уровень PD1, присутствующий в образце пациента, может свидетельствовать о том, что пациент может отвечать на лечение с использованием антитела к PD1. Присутствие высокого уровня PD1 в образце может быть использовано для отбора пациента для лечения с использованием антитела к PD1. Следовательно, антитела согласно настоящему изобретению можно применять для отбора пациента для лечения с  
10 использованием антитела к PD-1.

Детектирование PD-1 в образце можно применять для диагностики нарушения функционирования Т-клеток или предракового состояния у пациента, диагностики предрасположенности к предраковому состоянию или прогнозирования (предсказания) предракового состояния. Диагноз или прогноз может относиться к существующему  
15 (ранее диагностированному) предраковому состоянию, которое может быть доброкачественным или злокачественным, может быть связано с подозрением на предраковое состояние, или может быть связано со скринингом предракового состояния у пациента (которое ранее могло быть не диагностировано).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения уровень экспрессии  
20 PD-1 на CD8<sup>+</sup> Т-клетках можно детектировать, чтобы указать степень истощения Т-клеток и степень тяжести течения заболевания.

Образец может быть взят из любой ткани или жидкости тела. Образец может содержать или может быть получен из: некоторого количества крови; некоторого количества сыворотки крови, полученной из крови индивидуума, которая может  
25 содержать жидкую составляющую крови, полученную после удаления фибринового сгустка и клеток крови; образца ткани или биопсии; или клеток, выделенных у указанного индивидуума.

Способы согласно настоящему изобретению предпочтительно осуществляют в условиях *in vitro*. Термин «в условиях *in vitro*» включает эксперименты с использованием  
30 клеток в культуре, в то время как термин «в условиях *in vivo*» включает эксперименты с использованием интактных многоклеточных организмов.

#### Варианты терапевтического применения

В настоящем изобретении могут быть предложены антитела, антигенсвязывающие фрагменты и полипептиды согласно настоящему изобретению и композиции,  
35 содержащие указанные агенты для применения в способах лечения. Способ лечения может быть обеспечен субъектам, имеющим заболевание или состояние, нуждающееся в лечении. Заболевание или состояние может представлять собой нарушение функционирования Т-клеток, включая нарушение функционирования Т-клетки, связанное с раком, или рак, или нарушение функционирования Т-клетки, связанное с  
40 инфекцией, или инфекцию.

Нарушение функционирования Т-клеток может представлять собой заболевание или состояние, при котором нормальная функция Т-клеток нарушается, что вызывает подавление иммунного ответа субъекта на патогенные антигены, например, те, которые  
45 вырабатываются при инфекции экзогенными агентами, такими как микроорганизмы, бактерии и вирусы, или вырабатываются у хозяина при некоторых патологических состояниях, таких как некоторые формы рака (например, в виде ассоциированных с опухолью антигенов).

Нарушение функционирования Т-клеток может включать истощение Т-клеток или

анергию Т-клеток. Истощение Т-клеток включает состояние, при котором CD8<sup>+</sup> Т-клетка не способна к пролиферации или осуществлению эффекторных функций Т-клеток, таких как цитотоксичность и секреция цитокина (например, ИФН- $\gamma$ ), в ответ на стимуляцию антигеном. Истощенные Т-клетки также могут быть охарактеризованы

устойчивой экспрессией PD-1, причем блокирование взаимодействий PD-1:PD-L1 может обратить истощение Т-клеток и восстановить антиген-специфичные Т-клеточные ответы. Нарушение функционирования Т-клеток может проявляться как инфекция или неспособность выработать эффективный иммунный ответ против инфекции. Инфекция может быть хронической, устойчивой, скрытой или медленно текущей, и может

возникнуть в результате бактериальной, вирусной, грибковой или паразитарной инфекции. Следовательно, способ лечения может быть обеспечен пациентам, имеющим бактериальные, вирусные или грибковые инфекции. Примеры бактериальных инфекций включают инфекции *Helicobacter pylori*. Примеры вирусных инфекций включают инфекции ВИЧ, гепатитом В или гепатитом С. Нарушение функционирования Т-клеток может быть связано с раком, таким как ускользание опухоли от иммунного ответа. Многие опухоли человека экспрессируют ассоциированные с опухолью антигены, распознаваемые Т-клетками, и способные индуцировать иммунный ответ. Тем не менее, иммунное уклонение является

распространенным и, как полагают, опосредовано рядом растворимых факторов, включая PD-L1. Следовательно, блокирование взаимодействия PD-1 и PD-L1 может ингибировать этот отрицательный иммунный регуляторный сигнал к опухолевым клеткам и повысить иммунитет, опосредованный опухолеспецифичными CD8<sup>+</sup> Т-клетками. Различные виды рака, при которых отсутствуют признаки нарушения функционирования Т-клеток, такие как истощение Т-клеток, также можно лечить с использованием антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида в соответствии с настоящим изобретением, которые позволяют подавить у субъекта передачу сигналов с участием PD-1 и вызвать эффективный иммунный ответ с

ограниченным нарушением, уклонением или индукцией ускользания опухоли от иммунного ответа. В указанных способах лечения антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид может обеспечить лечение рака, которое включает предотвращение феномена ускользания опухоли от иммунного ответа. Лечение может быть направлено на предотвращение нарушения функционирования Т-клеток, например, предотвращение инфекции или развития или прогрессирования рака. Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и полипептиды могут быть использованы сами по себе для изготовления фармацевтических композиций или лекарственных средств, и субъекты могут получать профилактическое лечение против развития патологического состояния. Профилактическое лечение может быть

использовано до появления симптомов патологического состояния и/или может быть обеспечено субъектам, которые, как полагают, подвергаются риску инфекции или развития рака. Лечение может включать совместную терапию с использованием вакцины, например, Т-клеточной вакцины, которая может включать одновременную, отдельную или последовательную терапию или комбинированное введение вакцины и антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида в одной композиции. Применительно к указанному способу лечения антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид может быть обеспечен в качестве адъюванта для вакцины. Ограниченный пролиферативный потенциал истощенных Т-клеток являлся основной причиной

неэффективности Т-клеточной иммунотерапии, и комбинирование агентов, способных блокировать или обращать истощение Т-клеток, является перспективной стратегией для улучшения эффективности Т-клеточной иммунотерапии (Barber et al., Nature Vol 439, No. 9 p 682-687 Feb 2006).

5 Антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид предпочтительно вводят в «терапевтически эффективном количестве», которое является достаточным, чтобы обеспечить пользу индивидууму. Фактическое вводимое количество, частота и продолжительность курса введения будут зависеть от природы и степени тяжести заболевания, которое лечат. Назначение способа лечения, например, решение по  
10 дозировке и т.д. находится в пределах ответственности врачей общей практики и других врачей, и, как правило, принимается с учетом заболевания, подлежащего лечению, состояния отдельного пациента, места доставки, способа введения и других факторов, известных врачам общей практики. Примеры методик и протоколов, упомянутых выше, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott,  
15 Williams & Wilkins.

Изготовление фармацевтически подходящих композиций и лекарственных средств

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены в виде фармацевтических композиций, предназначенных для клинического применения, и могут содержать фармацевтически  
20 приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или адъювант.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены способы получения фармацевтически подходящих композиций, такие способы получения могут включать один или более этапов, выбранных из: выделения антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанного в настоящем документе; и/или смешивания  
25 выделенного антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанного в настоящем документе, с фармацевтически приемлемым носителем, адъювантом, вспомогательным веществом или разбавителем.

Например, согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ изготовления или получения лекарственного средства или фармацевтической композиции  
30 для применения в лечении нарушения функционирования Т-клеток, причем указанный способ включает изготовление фармацевтической композиции или лекарственного средства путем смешивания антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида, описанного в настоящем документе, с фармацевтически приемлемым носителем, адъювантом, вспомогательным веществом или разбавителем.

35 Инфекция

Инфекция может представлять собой любую инфекцию или инфекционное заболевание, например, бактериальную, вирусную, грибковую или паразитарную инфекцию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения особенно желательным может быть лечение хронических/устойчивых инфекций,  
40 например, инфекций, связанных с нарушением функционирования Т-клеток или истощением Т-клеток.

Хорошо известно, что истощение Т-клеток представляет собой нарушение функционирования Т-клеток, которое возникает при многих хронических инфекциях (включая вирусные, бактериальные и паразитарные инфекции), а также при раке (Wherry  
45 Nature Immunology Vol. 12, No. 6, p 492-499, June 2011).

Инфекция или инфекционное заболевание может представлять собой заболевание, при котором активируется PD-1 (например, как установлено в работе Radziewicz H, et al., J Virol. 2007;81(6):2545-2553 и Golden-Mason L et al., J Virol. 2007;81(17):9249-9258).



Примеры бактериальных инфекций, которые можно лечить, включают инфекции *Bacillus* spp., *Bordetella pertussis*, *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Listeria* sp, *Helicobacter pylori*, микобактериями (например, *Mycobacterium tuberculosis*) и *Pseudomonas aeruginosa*. Например, бактериальная инфекция может представлять собой сепсис или туберкулез.

Yao et al (PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood* 113(23):5811-5818 Jun 4 2009) установили, что PD-1 участвует в отрицательной регуляции функции дендритных клеток (ДК) при ответе врожденной иммунной системы на инфекцию *Listeria monocytogenes*. Brahmandam et al (Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* vol. 88, no. 2 233-240, August 2010) сообщили, что антитело к PD-1, которое вводили через 24 ч после сепсиса, предотвращало сепсис-индуцированное истощение лимфоцитов и ДК, повышало Bcl-xL, блокировало апоптоз и улучшало выживаемость. Как сообщалось, взаимодействия TIM-3:галактин-9 опосредуют истощение Т-клеток и опосредуют врожденный и адаптивный иммунный ответ на инфекцию *Mycobacterium tuberculosis* (Jayaraman et al., *The Journal of Immunology* 2012, 188, 70.6).

Примеры вирусных инфекций, которые можно лечить, включают инфекцию вирусом гриппа, вирусом кори, вирусом гепатита В (HBV), вирусом гепатита С (HCV), вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), вирусом простого герпеса и вирусом папилломы человека.

Хронические вирусные инфекции, такие как те, которые вызваны ВГС, ВГВ и ВИЧ, обычно включают механизмы ускользания от иммунного ответа. Было установлено, что экспрессия PD-1 и TIM-3 коррелирует с нарушенными ответами Т-клеток на вирус гепатита С (ВГС) (McMahan et al., *The Journal of Clinical Investigation* Vol. 120, No. 12 p 4546-4557, December 2010). McMahan et al (выше) установили, что при инфекции ВГС уровень экспрессии обоих белков, TIM-3 и PD-1, на ВГС-специфичных ЦТЛ предшествовал развитию вирусной персистенции, это факт обеспечивает прогностическую информацию. Barber et al. (*Nature* Vol 439, No. 9 p 682-687 Feb 2006) установили, что PD-1 активируется при хронической вирусной инфекции. В данной работе установлено, что у мышей, инфицированных LCMV, блокирование ингибиторного пути PD-1/PD-L1 оказывает положительное влияние на CD8 Т-клетки, восстанавливая их способность к пролиферации, секреции цитокинов, лизису инфицированных клеток и снижению вирусной нагрузки. Экспрессия PD-1 также повышалась при ВИЧ-инфекции (Said et al., *Nature Medicine* Vol. 16, No. 4 p 452-460 April 2010). Блокирование взаимодействия между PD-1 и PD-L1 способствовало элиминации вируса и улучшало функцию Т-клеток в животных моделях хронической вирусной инфекции (Said et al., выше).

Примеры грибковых инфекций, которые можно лечить, включают инфекции *Alternaria* sp, *Aspergillus* sp, *Candida* sp и *Histoplasma* sp. Грибковая инфекция может представлять собой грибковый сепсис или гистоплазмоз.

Chang et al (Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Critical Care* 2013, 17:R85) сообщили, что антитело к PD1 было весьма эффективным в повышении выживаемости при первичном и вторичном грибковом сепсисе. Lázár-Molnár et al (The PD-1/PD-L costimulatory pathway critically affects host resistance to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* PNAS vol. 105, no. 7, p 2658-2663, 19 Feb 2008) сообщили, что антитела к PD-1 значительно увеличили выживаемость мышей, инфицированных *Histoplasma capsulatum*. Следовательно, важность

истощения Т-клеток при развитии грибковой инфекции хорошо установлена.

Примеры паразитарных инфекций, которые можно лечить, включают инфекцию видами *Plasmodium* (например, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium yoeli*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* или *Plasmodium chabaudi chabaudi*). Паразитарные инфекции могут

представлять собой заболевание, такое как малярия, лейшманиоз и токсоплазмоз. Было установлено, что инфицирование людей *Plasmodium falciparum* приводит к более высокой экспрессии PD-1 и истощению Т-клеток у мышей (Butler et al., Nature Immunology Vol. 13, No. 12, p 188-195 February 2012). Блокирование PD-L1 и LAG-3 с использованием моноклональных антител к PD-L1 и LAG-3 в условиях *in vivo* способствует

восстановлению функции CD4<sup>+</sup> Т-клеток, увеличению количества фолликулярных хелперных Т-клеток, В-клеток зародышевых центров и плазмобластов, усилению выработки защитных антител и быстрому устранению патогена на стадии распространения малярии в кровеносном русле у мышей. Также было установлено, что указанные антитела блокируют развитие хронической инфекции (Butler et al., выше).

## Рак

Рак может представлять собой любую нежелательную пролиферацию клеток (или любое заболевание, проявляющееся нежелательной пролиферацией клеток), новообразование или опухоль, или повышенный риск или предрасположенность к нежелательной пролиферации клеток, новообразованию или опухоли. Рак может быть доброкачественным или злокачественным и может быть первичным или вторичным (метастатическим). Новообразование или опухоль может представлять собой любое аномальное размножение или пролиферацию клеток и может располагаться в любой ткани. Примеры тканей включают надпочечники, мозговое вещество надпочечников, анус, аппендикс, мочевого пузырь, кровь, кость, костный мозг, мозг, молочную железу, слепую кишку, центральную нервную систему (включая и за исключением головного мозга), мозжечок, шейку матки, толстую кишку, двенадцатиперстную кишку, эндометрий, эпителиальные клетки (например, эпителий почек), желчный пузырь, пищевод, глиальные клетки, сердце, подвздошную кишку, тощую кишку, почки, слезную железу, гортань, печень, легкие, лимфу, лимфатический узел, лимфобласты, максиллу, средостение, брыжейку, миометрий, носоглотку, сальник, ротовую полость, яичник, поджелудочную железу, околоушную железу, периферическую нервную систему, брюшину, плевру, предстательную железу, слюнную железу, сигмовидную кишку, кожу, тонкую кишку, мягкие ткани, селезенку, желудок, семенники, тимус, щитовидную железу, язык, миндалины, трахею, матку, вульву, лейкоциты.

Опухоли, подлежащие лечению, могут представлять собой опухоли нервной системы или опухоли других систем. Опухоли нервной системы могут представлять собой опухоли центральной или периферической нервной системы, например, глиому, менингиому, медуллобластому, нейрофибром, эпендимому, Шванному, нейрофибросаркому, астроцитому и олигодендроглиому. Разновидности рака/опухоли системы, отличной от нервной системы, могут возникать в любой другой ткани, отличной от нейрональной ткани, примеры включают меланому, мезотелиому, лимфому, миелому, лейкемию, неходжкинскую лимфому (НХЛ), лимфому Ходжкина, хронический миелолейкоз (ХМЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС), кожную Т-клеточную лимфому (СТСЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), гепатому, плоскоклеточную карциному, карциному предстательной железы, рак молочной железы, рак легких, рак толстой кишки, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак тимуса, НМРЛ, гемобластоз и саркому.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак

представляет собой один или более из рака легкого, рака почек и рака мочевого пузыря.

Терапия на основе адоптивного переноса Т-клеток

Терапия на основе адоптивного переноса Т-клеток обычно относится к процессу, при котором у субъекта удаляют лейкоциты, как правило, путем отбора образца крови, из которого лейкоциты выделяют, размножают в условиях *in vitro* или *ex vivo* и возвращают этому же самому субъекту или другому субъекту. Лечение, как правило, направлено на увеличение количества/концентрации активной формы требуемой популяции Т-клеток у субъекта. Указанное лечение может принести пользу пациентам, страдающим истощением Т-клеток.

Антитела, способные блокировать механизм истощения Т-клеток или обращать его, обеспечивают средство повышения активности Т-клеток и усиления пролиферации Т-клеток.

Соответственно, согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ размножения популяции Т-клеток, в котором Т-клетки приводят в контакт с антителом, антигенсвязывающим фрагментом или полипептидом в соответствии с настоящим изобретением в условиях *in vitro* или *ex vivo*.

Способ может дополнительно содержать одну или более из следующих стадий: отбор образца крови у субъекта; выделение Т-клеток из образца крови; культивирование Т-клеток в условиях *in vitro* или *ex vivo* (на этом этапе Т-клетки могут вступать в контакт с антителом, антигенсвязывающим фрагментом или полипептидом), сбор размноженной популяции Т-клеток; смешивание Т-клеток с адъювантом, разбавителем или носителем; введение размноженных Т-клеток субъекту.

Соответственно, согласно некоторым аспектам настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с нарушением функционирования Т-клеток, причем указанный способ включает получение образца крови от субъекта, нуждающегося в лечении, культивирование Т-клеток, полученных из образца крови в присутствии антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида в соответствии с настоящим изобретением так, чтобы размножить популяцию Т-клеток, сбор размноженных Т-клеток, а также введение размноженных Т-клеток субъекту, нуждающемуся в лечении.

Т-клетки могут быть получены от субъекта, нуждающегося в лечении, и могут быть выделены и/или очищены. Они могут представлять собой популяции CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Т-клетки могут представлять собой популяцию Т-клеток, испытывающих истощение, и необязательно могут иметь повышенную экспрессию PD-1.

Во время культивирования Т-клетки могут быть приведены в контакт с антителом, антигенсвязывающим фрагментом или полипептидом в условиях и в течение периода времени, достаточного для того чтобы обеспечить размножение Т-клеток до желаемого количества клеток. После соответствующего периода времени Т-клетки могут быть собраны, необязательно концентрированы, и могут быть смешаны с подходящим носителем, адъювантом или разбавителем и возвращены в организм субъекта. Субъект может проходить один или более этапов указанной терапии.

Способы размножения Т-клеток хорошо известны в данной области техники, например, такие как те, которые описаны в работах Kalamasz et al., J Immunother 2004 Sep-Oct; 27(5):405-18; Montes et al., Clin Exp Immunol 2005 Nov;142(2):292-302; Wölfl and Greenburg Nature Protocols 9 p 950-966 27 March 2014; Trickett and Kwan Journal of Immunological Methods Vol. 275, Issues 1-2, 1 April 2003, p 251-255; Butler et al PLoS ONE 7 (1) 12 Jan 2012.

Одновременное или последовательное введение

Композиции можно вводить по отдельности или в комбинации с другими способами

лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от состояния, подлежащего лечению.

В настоящем документе антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид согласно настоящему изобретению и противоинфекционный агент или химиотерапевтический агент (терапевтический агент) могут быть введены одновременно или последовательно.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лечение с использованием антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида согласно настоящему изобретению может сопровождаться химиотерапией.

Одновременное введение относится к совместному введению антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида и терапевтического агента, например, в виде фармацевтической композиции, содержащей оба агента (комбинированный препарат), или непосредственно друг за другом и необязательно с помощью одного и того же способа введения, например, через одну и ту же артерию, вену или другой кровеносный сосуд.

Последовательное введение относится к введению одного из антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида или терапевтического агента, за которым следует введение другого агента через заданный интервал времени. Введение двух агентов одним и тем же путем не требуется, хотя в некоторых вариантах реализации агенты вводят одним и тем же путем. Временной интервал может быть любым временным интервалом.

#### Противоинфекционные агенты

При лечении инфекции антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с противоинфекционным агентом, как описано выше. Противоинфекционный агент может представлять собой агент, который, как известно, направлен против микроорганизма или вируса, вызывающего инфекцию.

Подходящие противоинфекционные агенты включают антибиотики (такие как пенициллины, цефалоспорины, рифамицины, липиармицины, хинолоны, сульфонамиды, макролиды, линкозамиды, тетрациклины, циклические липопептиды, глицилциклины, оксазолидиноны и липиармицины), противовирусные агенты (такие как ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы интегразы, ингибиторы транскрипционного фактора, антисмысловые и миРНК-агенты и ингибиторы протеазы), противогрибковые агенты (такие как полиены, имидазолы, триазолы, тиазолы, аллиламины и эхинокандины) и противопаразитарные агенты (такие как антинемотодные агенты, антицестодные агенты, антитрематодные агенты, антиамебные агенты и антипротозойные агенты).

#### Химиотерапия

Химиотерапия относится к лечению рака с использованием лекарственного препарата или ионизирующего излучения (например, лучевая терапия с использованием рентгеновских лучей или  $\gamma$ -лучей). Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения химиотерапия относится к лечению с использованием лекарственного препарата. Лекарственный препарат может представлять собой химическое соединение, например, низкомолекулярный лекарственный препарат, антибиотик, интеркалятор ДНК, ингибитор белка (например, ингибитор киназы) или биологический агент, например, антитело, фрагмент антитела, аптамер нуклеиновой кислоты или пептида, нуклеиновую кислоту (например, ДНК, РНК), пептид, полипептид или белок. Лекарственный препарат может быть изготовлен в виде фармацевтической

композиции или лекарственного средства. Состав может содержать один или более лекарственных препаратов (например, один или более активных агентов) совместно с одним или более фармацевтически приемлемыми разбавителями, вспомогательными веществами или носителями.

5 Лечение может включать введение более чем одного лекарственного препарата. Лекарственный препарат можно вводить по отдельности или в комбинации с другими способами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от состояния, подлежащего лечению. Например, химиотерапия может представлять собой совместную терапию, включающую введение двух лекарственных препаратов, один или более из  
10 которых могут быть предназначены для лечения рака.

Химиотерапия может быть введена с помощью одного или более путей введения, например, парентерального, внутривенного, перорального, подкожного, внутрикожного или внутриопухолевого пути введения.

Химиотерапия может быть введена в соответствии со схемой лечения. Схема лечения  
15 может представлять собой заранее определенное расписание, план, схему или график введения химиотерапии, который может быть составлен с помощью врача или практикующего врача и может быть адаптирован для пациента, нуждающегося в лечении.

Схема лечения может содержать указания, касающиеся одного или более из: типа  
20 химиотерапии для введения пациенту; дозы каждого лекарственного препарата или облучения; временного интервала между введениями; продолжительности каждого цикла лечения; количества и характера любых перерывов в лечении, если таковые имеются и т.д. Для совместной терапии может быть предусмотрена единая схема лечения, в которой указано то, как каждый лекарственный препарат должен быть введен.

25 Химиотерапевтические препараты и биопрепараты могут быть выбраны из:

- алкилирующих агентов, таких как цисплатин, карбоплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, ифосфамид;

- пуриновых или пиримидиновых антиметаболитов, таких как азатиопурин или меркаптопурин;

30 - алкалоидов и терпеноидов, таких как алкалоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, винорелбин, виндезин), подофиллотоксин, этопозид, тенипозид, таксаны, такие как паклитаксел (таксол<sup>TM</sup>), доцетаксел;

- ингибиторов топоизомеразы, таких как ингибиторы топоизомеразы типа I камптотецины иринотекан и топотекан, или ингибиторы топоизомеразы типа II

35 амсакрин, этопозид, этопозида фосфат, тенипозид;

- противоопухолевых антибиотиков (например, антрациклиновых антибиотиков), таких как дактиномицин, доксорубицин (адриамицин<sup>TM</sup>), эпирубицин, блеомицин, рапамицин;

40 - агентов на основе антител, таких как антитело к TIM-3, антитело к CTLA-4, антитело к LAG-3, антитело к 4-1BB, антитело к GITR, антитело к CD27, антитело к BLTA, антитело к OX40, антитело к VEGF, антитело к TNF- $\alpha$ , антитело к ИЛ-2, антитело к GrpIb/IIIa, антитело к CD-52, антитело к CD20, антитело к RSV, антитело к HER2/Neu (erbB2), антитело к рецептору TNF, антитело к ЭФРР, моноклональные антитела или фрагменты антител, например: цетуксимаб, панитумумаб, инфликсимаб, базиликсимаб,

45 бевацизумаб (авастин<sup>®</sup>), абиксимаб, даклизумаб, гемтузумаб, алемтузумаб, ритуксимаб (мабтера<sup>®</sup>), паливизумаб, трастузумаб, этанерцепт, адалимумаб, нимотузумаб;

- ингибиторов EGFR, таких как эрлотиниб, цетуксимаб и гефитиниб;

- антиангиогенных агентов, таких как бевацизумаб (авастин®);

- противораковых вакцин, таких как Sipuleucel-T (провенж®);

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения

химиотерапевтический агент представляет собой антитело к TIM-3, антитело к CTLA-4, антитело к LAG-3, антитело к 4-1 BB, антитело к GITR, антитело к CD27, антитело к BLTA, антитело к OX40, антитело к VEGF, антитело к TNF-α, антитело к ИЛ-2, антитело к GPIIb/IIIa, антитело к CD-52, антитело к CD20, антитело к RSV, антитело к HER2/Neu (erbB2), антитело к рецептору TNF, антитело к EGFR или другое антитело. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения химиотерапевтический агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки или костимулирующей молекулы.

Другие химиотерапевтические лекарственные средства могут быть выбраны из: 13-цис-ретиноевой кислоты, 2-хлордезоксиаденозина, 5-азациитидина, 5-фторурацила, 6-

меркаптопурина, 6-тиогуанина, абраксана, аккутана®, актиномицина-D адриамицина®,

адруцила®, афинитора®, агрилина®, Ала-Корта®, алдеслейкина, алемтузумаба, алимта,

алитретиноина, алкабан-AQ®, алкерана®, полностью транс-ретиноевой кислоты, альфа-интерферона, алтретамина, аметоптерина, амифостина, аминоклоротетимида, анагрелида,

анандрона®, анастрозола, арабинозилцистеина, аранеспа®, аредиа®, аримидекса®,

аромасина®, арранона®, триоксида мышьяка, аспарагиназы, ATRA авастина®,

азациитидина, BCG, BCNU, бендамустина, бевацизумаба, бексаротена, бексара®,

бикалутамида, BiCNU, бленоксана®, блеомицина, бортезомиба, бусульфана,

бусульфекса®, кальция лейковорина, кампата®, камптосара®, камптотецина-11,

капецитабина, карака™, карбоплатина, кармустина, касодекса®, CC-5013, CCI-779,

CCNU, CDDP, CeeNU, церубидина®, цетуксимаба, хлорамбуцила, цисплатина, цитроворум

фактора, кладрибина, кортизона, космегена®, CPT-11, циклофосфамида, цитадрена®,

цитарабина (цитозар-U®), цитоксана®, дакогена, дактиномицина, дарбепоетина альфа,

дазатиниба, дауномицина, даунорубицина, даунорубицина гидрохлорида,

липосомального даунорубицина, дауноксома®, декадрона, децитабина, Дельта-кортефа®,

дельтасона®, денилейкина, дефтитокса, депоцита™, дексаметазона, дексаметазона

ацетата, дексаметазона фосфата натрия, дексазона, дексразоксана, DHAD, DIC, диодекса,

доцетаксела, доксила®, доксорубицина, липосомального доксорубицина, дроксия™,

DTIC, DTIC-дом®, дюралона®, элигарда™, элленса™, флоксатина™, элспара®, эмцита®,

эпирубицина, эпоэтина альфа, эрбитукса, эрлотиниба, L-аспарагиназы Erwinia,

эстрамустина, этиола, этопофоса®, этопозиды, этопозиды фосфата, эулексина®,

эверолимуса, эвиста®, экземестана, фаслодекса®, фемара®, филграстита, флоксуридина,

флудара®, флударабина, фтороплекса®, фторурацила, флуоксиместерона, флутамида,

фолиновой кислоты, FUDR®, фулвестранта, гефитиниба, гемцитабина, гемтузумаба

озогамицина, гливекы™, глиадела® Wafer, гозерелина, Г-КСФ, ГМ-КСФ, герцептина®,

гексадрол, гексалена®, гексаметилмеламина, НММ, гикамтина®, гидреа®, гидрокорта

ацетата®, гидрокортизона, гидрокортизона фосфата натрия, гидрокортизона сукцината

натрия, гидрокортона фосфата, гидроксимочевина, ибритумомаба, ибритумомаба  
 тиуксетана, идамицина<sup>®</sup>, идарубицина, ифекса<sup>®</sup>, ИФН-альфа, ифосфамида, ИЛ-11, ИЛ-  
 2, иматиниба мезилата, имидазола карбоксамида, интерферона-альфа, интерферона-  
 5 альфа-2b (ПЭГ-конъюгат), интерлейкина-2, интерлейкина-11, интрона А<sup>®</sup> (интерферона-  
 альфа-2b), иресса<sup>®</sup>, иринотекана, изотретиноина, иксабепилона, иксемпра<sup>™</sup>, кидроласа,  
 ланакорта<sup>®</sup>, лапатиниба, L-аспарагиназы, LCR, леналидомида, летрозоло, лейковорина,  
 лейкерана, лейкина<sup>™</sup>, леупролида, лейрокристина, лейстатина<sup>™</sup>, липосомального Ага-  
 10 С, жидкого преда<sup>®</sup>, ломустина, L-РАМ, L-сарколизина, люпрона<sup>®</sup>, люпрона-депо<sup>®</sup>,  
 матулана<sup>®</sup>, максидекса, мехлорэтамина, мехлорэтамина гидрохлорида, медралона<sup>®</sup>,  
 медрол<sup>®</sup>, мегаса, мегестрола, мегестролацетата, мелфалана, меркаптопурина, месна,  
 меснекса, метотрексата, метотрексата натрия, метилпреднизолона, метикортена<sup>®</sup>,  
 15 митомицина, митомицина-С, митоксантрона, М-преднизолола<sup>®</sup>, МТС, МТХ, мустаргена<sup>®</sup>,  
 мустина, мутамицина<sup>®</sup>, милерана<sup>®</sup>, милоцела<sup>™</sup>, милотарга<sup>®</sup>, навелбина<sup>®</sup>, неларабина,  
 неосара<sup>®</sup>, нейласта<sup>™</sup>, неймега<sup>®</sup>, нейпогена<sup>®</sup>, нексавара<sup>®</sup>, ниландрона<sup>®</sup>, нилутамида,  
 нипента<sup>®</sup>, хлорметина, новалдекса<sup>®</sup>, новантрона<sup>®</sup>, октреотида, октреотида ацетата,  
 20 онкоспара<sup>®</sup>, онковина, онтака, онксала, опревелкина, орапреда, оразона, оксалиплатина,  
 паклитаксела, связанного с белком паклитаксела, памидроната, панитумумаба,  
 панретина<sup>®</sup>, параплатина<sup>®</sup>, педиапреда<sup>®</sup>, ПЭГ-интерферона, пегаспаргаза,  
 пегфилграсима, ПЭГ-интрона<sup>™</sup>, ПЭГ-L-аспарагиназы, пеметрекседа, пентостатина,  
 25 мелфалана, платинола<sup>®</sup>, платинол-AQ<sup>®</sup>, преднизолона, преднизона, прелона<sup>®</sup>,  
 прокарбазина, прокрита<sup>®</sup>, пролейкина<sup>®</sup>, пролифепроспана 20 с кармустин-имплантом,  
 пуринетол<sup>®</sup>, ралоксифена, ревлимида<sup>®</sup>, ревматрекса<sup>®</sup>, ритуксана<sup>®</sup>, ритуксимаба,  
 роферона-А<sup>®</sup> (интерферона альфа-2а), рубекса<sup>®</sup>, рубидомицина гидрохлорида,  
 30 сандостатина<sup>®</sup>, сандостатина LAR<sup>®</sup>, саргаромостима, Солу-кортеф<sup>®</sup>, Солу-медрол<sup>®</sup>,  
 сорафениба, сприцела<sup>™</sup>, STI-571, стрептозоцина, SU11248, санитиниба, сутента<sup>®</sup>,  
 тамоксифена, тарцева<sup>®</sup>, таргретина<sup>®</sup>, таксола<sup>®</sup>, таксотера<sup>®</sup>, темодара<sup>®</sup>, темозоломида,  
 темсиролимуса, тенипозид, ТЕСРА, талидомида, таломида<sup>®</sup>, TheraCys<sup>®</sup>, тиогуанина,  
 35 тиогуанина таблоида<sup>®</sup>, тиофосфоамида, тиоплекса<sup>®</sup>, тиотепа, TICE<sup>®</sup>, топосара<sup>®</sup>,  
 топотекана, торемифена, торисела<sup>®</sup>, тозитумомаба, трастузумаба, треанда<sup>®</sup>, третиноина,  
 трексола<sup>™</sup>, тризенкса<sup>®</sup>, TSPA, TYKERB<sup>®</sup>, VCR, вектибиска<sup>™</sup>, велбана<sup>®</sup>, велкада<sup>®</sup>,  
 40 вепезида<sup>®</sup>, веханоида<sup>®</sup>, виадур<sup>™</sup>, видаза<sup>®</sup>, винбластина, винбластина сульфата,  
 винкасара Pfs<sup>®</sup>, винкристина, винорелбина, винорелбина тартрата, VLB, VM-26,  
 вориностата, VP-16, вумона<sup>®</sup>, кселола<sup>®</sup>, заносара<sup>®</sup>, зевалина<sup>™</sup>, зинекарда<sup>®</sup>, золадекса<sup>®</sup>,  
 золедроновой кислоты, золинза, зомета<sup>®</sup>.

#### Пути введения

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты, полипептиды и другие терапевтические  
 агенты, лекарственные средства и фармацевтические композиции в соответствии с  
 аспектами настоящего изобретения могут быть изготовлены для введения несколькими  
 путями, включая, но не ограничиваясь ими, парентеральный, внутривенный,

внутриартериальный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный, внутриматочный и оральный пути введения. Антитела, антигенсвязывающие фрагменты, полипептиды и другие терапевтические агенты могут быть изготовлены в жидкой или твердой форме. Жидкие составы могут быть изготовлены для введения путем инъекции в выбранную

5 область тела человека или животного.

#### Схема дозирования

В настоящем изобретении может быть предложено несколько доз антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида. Одна или более или каждая из доз может сопровождаться одновременным или последовательным введением другого

10 терапевтического агента.

Несколько доз могут быть разделены заданным временным интервалом, который может быть выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31 дня или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев. Например, дозы могут быть введены один раз каждые 7, 14, 21 или 28 дней (плюс или минус 3, 2 или 1

15 день).

#### Наборы

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения предложен набор компонентов. Согласно некоторым вариантам реализации набор может включать по меньшей мере один контейнер, содержащий заранее определенное количество антитела, антигенсвязывающего фрагмента или полипептида. Набор может обеспечивать антитело,

20 антигенсвязывающий фрагмент или полипептид в форме лекарственного средства или фармацевтической композиции и может быть обеспечен вместе с инструкциями для введения пациенту для лечения определенного заболевания или состояния. Антитело, антигенсвязывающий фрагмент или полипептид может быть изготовлен так, чтобы

25 быть подходящим для инъекции или инфузии в опухоль или кровь.

Согласно некоторым вариантам реализации набор может дополнительно содержать по меньшей мере один контейнер, содержащий заранее определенное количество другого терапевтического агента (например, противомикробного агента или химиотерапевтического агента). Согласно указанным вариантам реализации набор может также содержать второе лекарственное средство или фармацевтическую композицию так, что два лекарственных средства или фармацевтические композиции могут быть введены одновременно или по отдельности, чтобы обеспечить

30 комбинированное лечение конкретного заболевания или состояния. Терапевтический агент также может быть изготовлен в форме, пригодной для инъекции или инфузии в опухоль или кровь.

35

#### Субъекты

Субъект, подлежащий лечению, может представлять собой любое животное или человека. Субъект предпочтительно представляет собой млекопитающее, более предпочтительно человека. Субъект может быть млекопитающим, отличным от

40 человека, но более предпочтительно человеком. Субъект может быть мужского или женского пола. Субъект может быть пациентом. Субъекту мог быть поставлен диагноз заболевания или состояния, требующего лечения, или у субъекта подозревали присутствие такого заболевания или состояния.

#### Экспрессия белка

Методики молекулярной биологии, подходящие для получения полипептидов в соответствии с настоящим изобретением в клетках, хорошо известны в данной области техники, например, такие как те, которые описаны в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

45



Полипептид может быть экспрессирован из нуклеотидной последовательности. Нуклеотидная последовательность может содержаться в векторе, присутствующем в клетке, или может быть включена в геном клетки.

В настоящей заявке «вектор» представляет собой олигонуклеотидную молекулу (ДНК или РНК), используемую в качестве носителя для переноса экзогенного генетического материала в клетку. Вектор может быть вектором экспрессии для экспрессии генетического материала в клетке. Подходящие векторы могут включать промоторную последовательность, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей генную последовательность, подлежащую экспрессии. Вектор также может содержать кодон терминации и энхансеры экспрессии. Любые подходящие векторы, промоторы, энхансеры и кодоны терминации, известные в данной области техники, могут быть использованы для экспрессии полипептидов из вектора согласно настоящему изобретению. Подходящие векторы включают плазмиды, бинарные векторы, вирусные векторы и искусственные хромосомы (например, искусственные хромосомы дрожжей).

В настоящем описании термин «функционально связанный» может включать ситуацию, когда выбранная нуклеотидная последовательность и регуляторная нуклеотидная последовательность (например, промотор и/или энхансер) ковалентно связаны так, чтобы экспрессия нуклеотидной последовательности находилась под влиянием или контролем регуляторной последовательности (образуя тем самым кассету экспрессии). Следовательно, регуляторная последовательность функционально связана с выбранной нуклеотидной последовательностью, если регуляторная последовательность способна осуществлять транскрипцию нуклеотидной последовательности. При необходимости полученный транскрипт может быть транслирован в желаемый белок или полипептид.

Любая клетка, подходящая для экспрессии полипептидов, может быть использована для получения пептидов в соответствии с настоящим изобретением. Клетка может представлять собой прокариотическую или эукариотическую клетку. Подходящие прокариотические клетки включают *E. coli*. Примеры эукариотических клеток включают дрожжевую клетку, растительную клетку, клетку насекомого или клетку млекопитающего. В некоторых случаях клетка не является прокариотической клеткой, поскольку некоторые прокариотические клетки не способны обеспечить некоторые посттрансляционные модификации в отличие от эукариотических клеток. Помимо этого, в эукариотических клетках могут быть получены очень высокие уровни экспрессии, и белки могут быть легко выделены из эукариотических клеток с использованием подходящих меток. Специфичные плазмиды могут быть использованы для усиления секреции белка в среду.

Способы получения представляющего интерес полипептида могут включать культивирование или ферментацию клетки, модифицированной для экспрессии полипептида. Культивирование или ферментацию можно проводить в биореакторе, снабженном соответствующим источником питательных веществ, воздуха/кислорода и/или факторов роста. Секретируемые белки могут быть собраны путем отделения культуральной среды/ферментационного бульона от клеток, экстрагирования белкового содержимого и отделения отдельных белков для выделения секретируемого полипептида. Методики культивирования, ферментации и разделения хорошо известны специалистам в данной области техники.

Биореакторы включают один или более сосудов, в которых могут быть культивированы клетки. Культивирование в биореакторе может происходить

непрерывно, с непрерывным поступлением реагентов и непрерывным отбором культивируемых клеток из реактора. В другом варианте культивирование можно осуществлять в отъемно-доливном режиме. Биореактор проверяет и контролирует условия окружающей среды, такие как pH, содержание кислорода, скорость поступления и оттока в биореакторе и перемешивание внутри сосуда так, чтобы обеспечить оптимальные условия культивируемым клеткам.

После культивирования клеток, которые экспрессируют представляющий интерес полипептид, указанный полипептид предпочтительно выделяют. Может быть использован любой подходящий способ отделения полипептидов/белков от клеточной культуры, известный в данной области техники. Для того чтобы выделить представляющий интерес полипептид/белок из культуры сначала может потребоваться отделение культивируемых клеток от среды, содержащей представляющий интерес полипептид/белок. Если представляющий интерес полипептид/белок секретируется из клеток, клетки могут быть отделены от культуральной среды, которая содержит секретируемый полипептид/белок, путем центрифугирования. Если представляющий интерес полипептид/белок накапливается внутри клетки, то необходимо разрушить клетки до центрифугирования, например, используя ультразвуковую обработку, быстрое замораживание-оттаивание или осмотический лизис. Центрифугирование позволит получить осадок, содержащий культивируемые клетки, или фрагменты культивируемых клеток, и культуральную среду, содержащую супернатант, и представляющий интерес полипептид/белок.

Желательным может быть последующее выделение представляющего интерес полипептида/белка из супернатанта или культуральной среды, которая может содержать другие белковые и небелковые компоненты. Общий подход к отделению полипептидных/белковых компонентов от супернатанта или культуральной среды представляет собой осаждение. Полипептиды/белки, имеющие различную растворимость, осаждаются при различных концентрациях осаждающего агента, такого как сульфат аммония. Например, при низких концентрациях осаждающего агента выделяют водорастворимые белки. Следовательно, добавляя увеличивающиеся концентрации осаждающего агента можно различать белки с различной растворимостью. В дальнейшем для удаления сульфата аммония из отделенных белков можно использовать диализ.

Другие способы различения разных полипептидов/белков известны в данной области техники, например, ионообменная хроматография и эксклюзионная хроматография. Подходящие способы могут быть использованы в качестве альтернативы осаждению или могут быть впоследствии осуществлены для осаждения.

После выделения представляющего интерес полипептида/белка из культуры может потребоваться концентрирование белка. Несколько способов концентрирования представляющего интерес белка известны в данной области техники, например, ультрафильтрация или лиофилизация.

#### Определение идентичности последовательностей

Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных или нуклеотидных последовательностей может быть достигнуто различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение ClustalW 1.82, T-coffee или Megalign (DNASTAR). При использовании указанного программного обеспечения предпочтительно применяют параметры по умолчанию, например, для штрафа за внесение пропуска и штрафа за продление пропуска. По умолчанию параметры ClustalW 1.82: штраф за внесение пропуска в

последовательность белка = 10,0, штраф за продление пропуска в последовательности белка = 0,2, белковая матрица = Gonnet, белок/ДНК ENDGAP = -1, белок/ДНК GAPDIST = 4.

Настоящее изобретение включает комбинацию описанных аспектов и предпочтительных признаков, за исключением случаев, когда такая комбинация явно недопустима или явно исключена.

Используемые в настоящем документе заголовки разделов предназначены исключительно для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие объект изобретения.

Аспекты и варианты реализации настоящего изобретения далее будут проиллюстрированы, например, со ссылкой на прилагаемые чертежи. Другие аспекты и варианты реализации будут очевидны для специалистов в данной области техники. Все документы, упомянутые в тексте настоящего описания, включены в настоящую заявку посредством ссылки.

В тексте настоящего описания, включая нижеследующую формулу изобретения, если из контекста не следует иное, слово «содержать» и варианты, такие как «содержит» и «содержащий», будут подразумевать включение указанного целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов, но не исключение любого другого целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов.

Следует отметить, что в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа «a», «an» и «the» включают множественное число, если из контекста явно не следует иное. Диапазоны могут быть представлены в настоящем документе как от «приблизительно» одного конкретного значения и/или до «приблизительно» другого конкретного значения. В том случае, если представлен такой диапазон, другой вариант реализации включает диапазон от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогичным образом, если значения представлены в виде приближений, то использование антецедента «приблизительно» будет указывать на то, что конкретное значение образует другой вариант реализации.

Краткое описание чертежей

Варианты реализации и эксперименты, иллюстрирующие принципы настоящего изобретения, далее будут описаны со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых:

Фигура 1. Последовательности вариабельной области легкой цепи для клонов антитела к PD-1, A3, A10, B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4, H9 (IgG4 человека). CDR подчеркнуты и показаны отдельно.

Фигура 2. Последовательности вариабельной области тяжелой цепи для клонов антитела к PD-1, A3, A10, B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4, H9 (IgG4 человека). CDR подчеркнуты и показаны отдельно.

Фигура 3. Таблица, в которой представлены последовательности CDR легкой цепи и тяжелой цепи для клонов антитела к PD-1, A3, A10, B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4, H9.

Фигура 4. Нуклеотидные последовательности и кодируемые аминокислотные последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей клонов антитела к PD-1, A3, A10, оптимизированного A10, B6, оптимизированного B6, C4, оптимизированного C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4, оптимизированного H4, H9 (IgG4 человека).

Фигура 5. Таблица, в которой представлены величины аффинности связывания ( $K_d$ , нМ) клонов A3, A10, B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4 и H9, и контрольных антител к PD-1 человека, ниволюмаба и ламбролизумаба.

Фигура 6. Диаграмма, на которой представлены результаты оценки связывания антител к PD-1 человека, A3, A10, ниволюмаба и ламбролизумаба, с активированными Т-клетками.

Фигура 7. Диаграмма, на которой представлены результаты оценки связывания антител к PD-1 человека, A10, B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4 и H9, ниволюмаба и ламбролизумаба, с активированными Т-клетками.

Фигура 8. Диаграмма, показывающая способность клонов B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4 и H9 вступать в реакцию с PD-1 человека, PD-1 макаки-резуса и CTLA-4 человека.

Фигура 9. Диаграмма, на которой представлены результаты оценки пролиферации аллогенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток для истощенных Т-клеток в ответ на антитела A3, A10, ниволюмаб, ламбролизумаб.

Фигура 10. Диаграмма, на которой представлены результаты оценки пролиферации аллогенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток для истощенных Т-клеток в ответ на антитела A10, B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4, H9, ниволюмаб, ламбролизумаб.

Фигура 11. Диаграмма, на которой представлены уровни секреции ИФН-γ истощенными Т-клетками в ответ на антитела A3, A10, ниволюмаб, ламбролизумаб.

Фигура 12. Диаграмма, на которой представлены уровни секреции ИФН-γ истощенными Т-клетками в ответ на антитела A10, B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4, H9, ниволюмаб, ламбролизумаб.

Фигура 13. Диаграмма, показывающая специфичность связывания антител A3, A10, B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4, H9 в отношении PD-1 человека и макаки-резуса по сравнению с другим членом семейства CD28 человека (h) или мыши (m), при сопоставлении с ниволюмабом и ламбролизумабом, согласно результатам определения методом ИФА.

Фигура 14. Диаграмма, на которой представлены результаты оценки пролиферации аллогенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток для истощенных Т-клеток в ответ на кодон-оптимизированное антитело A10, кодон-оптимизированное антитело B6, кодон-оптимизированное антитело C4, кодон-оптимизированное антитело H4, ниволюмаб, ламбролизумаб.

Фигура 15. Диаграмма, на которой представлены уровни секреции ИФН-γ истощенными Т-клетками в ответ на кодон-оптимизированное антитело A10, кодон-оптимизированное антитело B6, кодон-оптимизированное антитело C4, кодон-оптимизированное антитело H4, ниволюмаб, ламбролизумаб.

Фигура 16. Диаграмма, на которой представлены уровни экспрессии маркеров истощения PD-1, PD-L1, TIM-3 и LAG-3 лимфоцитами, проникающими в опухоль легких. Приблизительно 2/3 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в опухоли экспрессируют PD-1.

Фигура 17. Диаграмма, на которой представлены уровни секреции ИФН-γ лимфоцитами, проникающими в опухоль легких (А), после 7 дней культивирования в присутствии или в отсутствие антитела к PD-1 (первичная культура диссоциированной опухолевой ткани), (В) после проведения реакции смешанной культуры лимфоцитов в присутствии или в отсутствие антитела к PD-1.

Фигура 18. Диаграмма, на которой представлены уровни секреции ИФН-γ после культивирования моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) с дендритными клетками, инфицированными вирусом гриппа, в присутствии или в отсутствие антител к PD-1.

Фигура 19. Диаграмма, на которой представлены уровни экспрессии маркеров

истощения PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3 и CTLA4 лимфоцитами, проникающими в опухоль легких. Приблизительно 2/3 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в опухоли экспрессируют PD-1.

Фигура 20. Диаграммы, на которых представлены уровни секреции ИФН-γ лимфоцитами, проникающими в опухоль, после реакции смешанной культуры лимфоцитов в присутствии или в отсутствие антител к PD-1 для трех пациентов. (А) Пациент №1, (В) Пациент №2, (С) Пациент №3. Представлены средние значения ± стандартное отклонение среднего для экспериментов с двумя и тремя повторами.

Фигура 21. Диаграммы, на которых представлены уровни экспрессии маркеров истощения PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3 и CTLA4 (А) лимфоцитами, проникающими в опухоль почек, и (В) лимфоцитами из крови пациентов с карциномой почек.

Приблизительно 2/3 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в опухоли экспрессируют PD-1, тогда как большинство лимфоцитов МКПК не экспрессируют PD-1.

Фигура 22. Диаграммы, на которых представлены уровни секреции ИФН-γ лимфоцитами, проникающими в опухоль, после реакции смешанной культуры лимфоцитов в присутствии или в отсутствие антител к PD-1 для трех пациентов. (А) Пациент №1, (В) Пациент №2, (С) Пациент №3. Представлены средние значения ± стандартное отклонение среднего для экспериментов с двумя и тремя повторами.

Фигура 23. Диаграммы, на которых представлены уровни экспрессии маркеров истощения PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3 и CTLA4 (А) лимфоцитами, проникающими в опухоль мочевого пузыря, и (В) циркулирующими в кровотоке лимфоцитами пациентов с карциномой мочевого пузыря. Большинство лимфоцитов, проникающих в опухоль, экспрессируют PD-1, тогда как только меньшая часть лимфоцитов МКПК экспрессируют PD-1.

Фигура 24. Диаграмма, на которой представлены уровни секреции ИФН-γ лимфоцитами, проникающими в опухоль, после реакции смешанной культуры лимфоцитов в присутствии или в отсутствие антител к PD-1 для одного пациента. Представлены средние значения ± стандартное отклонение среднего для экспериментов с двумя и тремя повторами.

#### Примеры

В нижеследующих примерах авторы настоящего изобретения описали способ выявления нуклеотидных и аминокислотных последовательностей выделенных антител или их антигенсвязывающих частей, которые специфично связываются с PD-1 человека и макака-резусов, блокируют путь передачи сигналов с участием PD-1 и восстанавливают активность истощенных Т-клеток.

#### Выделение антител к PD-1 человека

Антитела к PD-1 выделяли из библиотеки фагового дисплея антител человека с помощью отбора в условиях *in vitro* в ходе 4-х этапного биопэннинга.

Стрептавидин-конъюгированные магнитные гранулы покрывали биотинилированным PD-1 человека и использовали для выделения фагов, специфичных в отношении PD-1, с использованием магнитной сортировки. В процессе отбора были добавлены некоторые этапы для удаления потенциальных антител к биотину.

Специфичные фрагменты Fab антител первоначально выявляли с помощью ИФА с использованием PD-1 человека в качестве антигена. Первый этап скрининга для оценки клональности выполняли с помощью ДНК-типирования; последовательность подтверждали с помощью секвенирования.

#### Созревание аффинности

Отобранные антитела подвергали созреванию аффинности путем модификации CDR. Отбор антител, специфичных в отношении PD-1, проводили с помощью фагового

дисплея. Было создано более 80 клонов с созревшей аффинностью с ~100-кратно улучшенной аффинностью. Для отбора клонов проводили исследования термостабильности. Антитела нагревали и контролировали стабильность на основе их способности связываться с PD-1 человека методом ИФА. Клоны, поддерживающие стабильность при 71°C, сохраняли для дальнейшего анализа, и их аффинность в отношении PD-1 человека измеряли с использованием биоанализатора ProteOn (Biorad). В общих чертах, PD-1 человека, связанный с Fc, иммобилизовали на сенсорной микросхеме и применяли поток антител; измеряли скорость ассоциации и диссоциации и рассчитывали сродство ( $K_d$ ). Двенадцать из клонов с созревшей аффинностью обозначили A3, A10, B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4 и H9.

Аффинность выделенных антител к PD-1

Аффинность A3, A10, B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4 и H9 в отношении PD-1 человека измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса и сравнивали с аффинностью ниволумаба и ламбролизумаба, двух антител к PD-1, которые проходят последние этапы клинической разработки (фигура 5).

В общих чертах, PD-1 человека или мыши, связанный с Fc человека, иммобилизовали на сенсорной микросхеме, совместимой с биоанализатором Proteon XPR36 (Biorad). Затем неочищенные экстракты Fab (или контрольные антитела) выливали на чип, регистрировали и анализировали ассоциацию/диссоциацию каждого кандидата Fab и затем оценивали аффинность ( $K_d$ ).

Величины аффинности A3, A10, B6, C4, D4, E1, F2, G1, G2, G10, H4 и H9 находятся в диапазоне от 0,1 до 0,7 нМ, тогда как величины  $K_d$  ниволумаба и ламбролизумаба находятся в пределах 1,9 и 0,5 нМ, соответственно (фигура 5).

Характеристика антител к PD-1 человека;

Связывание с клетками, экспрессирующими PD-1

50000 Т-клеток, выделенных от здорового донора, инкубировали в присутствии 5000 дендритных клеток моноцитарного происхождения (ДК) от другого донора в течение 7 дней при 37°C. Антитела, экспрессированные в виде IgG4, инкубировали с указанными активированными Т-клетками в течение 30 минут в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ). После промывки ФСБ флуоресцентномеченое вторичное антитело добавляли в течение 30 минут и затем промывали ФСБ. Клетки ресуспендировали в буфере для проточной цитометрии, и связывание антитела с клеткам контролировали с помощью проточной цитометрии (фигуры 6 и 7).

Перекрестная реактивность с PD-1 макаки-резуса

Клоны фрагментов Fab с созревшей аффинностью исследовали с помощью ИФА для распознавания PD-1 макаки-резуса. В общих чертах, планшеты для ИФА покрывали PD-1 человека или макаки-резуса в концентрации 350 нг/лунку в карбонатном буфере и затем блокировали раствором казеина. После интенсивных промывок ФСБ+твин-20 супернатанты, содержащие антитела, переносили в планшеты для ИФА в присутствии 7% молока в ФСБ. Через 90 минут инкубации при комнатной температуре с перемешиванием и интенсивными промывками добавляли антитело козы к Fab человека, конъюгированное с пероксидазой хрена (ПХ). Через час планшеты промывали и добавляли субстрат ТМВ. Реакцию останавливали с помощью 1 М HCl, и оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм с контролем при 670 нм (фигура 8).

Функциональная активность в условиях *in vitro*

Антитело к PD-1 испытывали в функциональном количественном исследовании путем измерения 2 параметров активности Т-клеток: пролиферации и секреции ИФН-

γ. В общих чертах, Т-клетки выделяли у здорового донора и культивировали в течение 7 дней в присутствии дендритных клеток моноцитарного происхождения от другого донора (50000 Т-клеток/5000 ДК). Данная непрерывная стимуляция вызывает истощение Т-клеток. Антитела затем добавляли к культурам для дополнительного культивирования в течение 5 дней. Через 4 дня супернатант собирали для измерения ИФН-γ с помощью ИФА, и Т-клетки культивировали в течение 4 дней с добавлением 1 мкКю меченого тритием тимидина в течение последних 18 часов. Затем клетки собирали, и пролиферацию измеряли с помощью бета-счетчика.

Клоны А3, А10, В6, С4, D4, Е1, F2, G1, G2, G10, Н4 и Н9 способны восстанавливать пролиферацию ранее истощенных Т-клеток и восстанавливать их способность секретировать ИФН-γ (фигура 9-12).

Специфичность в отношении PD-1

Антитела к PD-1 исследовали методом ИФА в отношении их способности связываться с другими членами семейства CD28.

В общих чертах, планшеты для ИФА покрывали с использованием 350 нг/лунку одного из следующих антигенов в комбинации с Fc человека в карбонатном буфере: PD-1 человека, PD-L1 человека, TIM-3 человека, LAG-3 человека, ICOS человека, CTLA4 человека, BTLA человека, CD28 человека, TIM-3 мыши или PD-1 макаки-резуса. Затем планшет блокировали раствором казеина. После интенсивных промывок ФСБ+твин-20 антитела вносили в лунки для ИФА в присутствии 7% молока в ФСБ. Через 90 минут инкубации при комнатной температуре с перемешиванием и интенсивными промывками добавляли антитело козы к Fab человека, конъюгированное с ПХ. Через час планшеты промывали и добавляли субстрат ТМВ. Реакцию останавливали с помощью 1 М HCl, и оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм с контролем при 670 нм.

Принимая во внимание, что ниволумаб перекрестно связывается с PD-L1, TIM-3, LAG-3, BTLA и CD28 (ламбролизумаб также проявляет незначительную перекрестную реактивность), 1D11 и 1G4 являются специфичными только в отношении PD-1; и проявляют очень слабую перекрестную реактивность в отношении других членов семейства, отличных от PD-1 (фигура 13).

Выход продукции

Клетки линии НЕК-293.6Е кратковременно трансфецировали для получения антитела к PD-1 в формате IgG4; проводили сравнение выхода продукции в указанной системе.

Антитело	Выход продукции (мг/л)
Ламбролизумаб	2,1

	A3	9,9
	A10	32,1
5	E1	30,6
	F2	32,6
	G1	30,8
	G2	28,8
10	H9	18,4
	D4	26,9
	B6	26,5
	C4	27,4
15	H4	19,8
	G10	33,6

Все новые клоны антител имели лучший выход продукции, по сравнению с ламбролизумабом.

#### Оптимизация кодонов

Для повышения эффективности экспрессии гена A10, B6, C4 и H4 подвергли оптимизации кодонов.

Оптимизированные по составу кодонов клоны сохраняют свою способность нейтрализовывать PD-1 и восстанавливать активность Т-клеток (пролиферацию Т-клеток и секрецию ИФН- $\gamma$  - фигуры 14 и 15).

Применение антител к PD-1 для лечения опухолей: активация лимфоцитов, проникающих в опухоли, в условиях *ex vivo*

Образцы опухолей легких получали из Национального онкологического центра Сингапура после одобрения соответствующим Экспертным советом организации (ЭСО).

Образцы диссоциировали с использованием набора для диссоциации опухоли человека и устройства для диссоциации ткани.

Чтобы подтвердить экспрессию маркеров истощения на поверхности лимфоцитов, проникающих в опухоли, выделенную смесь клеток промывали один раз и пропускали через фильтр с диаметром пор 70 мкм для получения суспензии отдельных клеток.

Клетки окрашивали антителами к CD4, CD8, PD-1, PD-L1, TIM-3 и LAG-3; маркер живых/погибших клеток также использовали для исключения мертвых клеток из анализа.

Клетки исследовали с помощью проточной цитометрии. Результаты представлены на фигуре 16.

Смесь после диссоциации опухоли культивировали с антителами к PD-1 с оптимизированными кодонами, A10, B6, C4 и H4, в течение 7 дней до измерения ИФН- $\gamma$  в супернатанте с помощью ИФА. Ниволумаб и ламбролизумаб использовали в качестве положительного контроля, изотипическое антитело использовали в качестве отрицательного контроля.

На фигуре 17А представлена секреция ИФН- $\gamma$  лимфоцитами, проникающими в опухоли, после 7 дней культивирования в присутствии или в отсутствие антител к PD-1. Антитела к PD-1 способны повторно активировать секрецию ИФН- $\gamma$  лимфоцитами в зависимости от дозы.

Другую фракцию диссоциированной смеси совместно культивировали с аллогенными



дендритными клетками (ДК) для инициирования реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). Клетки сначала культивировали с ДК в течение 7 дней без антител, а затем повторно стимулировали с использованием ДК в течение 7 дней в присутствии антител к PD-1 или контрольных антител. После проведения 2 этапов уровень ИФН- $\gamma$  в супернатантах количественно исследовали с помощью ИФА.

На фигуре 17 В представлены результаты оценки секреции ИФН- $\gamma$  после СКЛ в присутствии или в отсутствие антител к PD-1. Антитела к PD-1 смогли восстановить способность лимфоцитов, расположенных в опухолевом очаге, секретировать ИФН- $\gamma$  в зависимости от дозы.

Применение антител к PD-1 для лечения инфекций: аутологичная активация Т-клеток в присутствии вируса гриппа

Кровь собирали от доноров, инфицированных вирусом гриппа. ДК моноцитарного происхождения инфицировали вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1). Инфицированные ДК затем смешивали с МКПК от того же донора для первого этапа культивирования в течение 5 дней. Затем клетки повторно стимулировали с использованием ДК, инфицированных вирусом гриппа, и культивировали для второго этапа в течение 5 дней в присутствии антител к PD-1. После 2 этапов большинство клеток в культуре представляют собой Т-клетки, специфичные в отношении вируса гриппа. После 2-х этапов культивирования уровень ИФН- $\gamma$  в супернатантах количественно исследовали с помощью ИФА.

На фигуре 18 представлены результаты оценки секреции ИФН- $\gamma$  после культивирования МКПК с ДК, инфицированными вирусом гриппа, в присутствии или в отсутствие антител к PD-1. Антитела к PD-1 смогли восстановить способность лимфоцитов секретировать ИФН- $\gamma$  при вирусной стимуляции в зависимости от дозы.

Рак легких: применение антител к PD-1 для повторной активации лимфоцитов, проникающих в опухоль легких (данные ex vivo)

Образцы опухолей легких получали из Национального онкологического центра Сингапура после одобрения соответствующим Экспертным советом организации (ЭСО). Образцы диссоциировали с использованием набора для диссоциации опухоли человека и устройства для диссоциации ткани.

Чтобы подтвердить экспрессию маркеров истощения на поверхности лимфоцитов, проникающих в опухоли, выделенную смесь клеток промывали один раз и пропускали через фильтр с диаметром пор 70 мкм для получения суспензии отдельных клеток. Клетки окрашивали антителами к CD4, CD8, PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3 и CTLA-4; маркер живых/погибших клеток также использовали для исключения мертвых клеток из анализа. Клетки исследовали с помощью проточной цитометрии.

На фигуре 19 представлены результаты оценки экспрессии PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3 и CTLA-4 лимфоцитами, проникающими в опухоль, у 3 разных пациентов (представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение среднего из 3 независимых экспериментов с использованием клеток от 3 разных доноров, все эксперименты выполняли с тремя повторами). Приблизительно 2/3 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в опухоли экспрессировали PD-1.

Смесь после диссоциации опухоли культивировали с аллогенными дендритными клетками (ДК), чтобы инициировать реакцию смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). Клетки сначала культивировали в течение 7 дней без антител и затем в течение 7 дней в присутствии антител к PD-1 или контрольных антител. После 2 этапов культивирования уровень ИФН- $\gamma$  в супернатантах количественно исследовали с помощью ИФА.

На фигурах 20А-20С представлены результаты оценки секреции ИФН- $\gamma$  после СКЛ

в присутствии или в отсутствие антител к PD-1. Показаны средние значения  $\pm$  стандартное отклонение среднего для трех повторов в трех независимых экспериментах (клетки от 3 разных пациентов). Антитела к PD-1 смогли восстановить способность лимфоцитов, расположенных в опухолевом очаге, секретировать ИФН- $\gamma$  в зависимости от дозы.

Карцинома почек: применение антител к PD-1 для повторной активации лимфоцитов, проникающих в опухоль почек (данные *ex vivo*)

Образцы опухолей почек получали из Национального онкологического центра Сингапура после одобрения соответствующим Экспертным советом организации (ЭСО). Образцы диссоциировали с использованием набора для диссоциации опухоли человека и устройства для диссоциации ткани.

Чтобы подтвердить экспрессию маркеров истощения на поверхности лимфоцитов, проникающих в опухоль, выделенную смесь клеток промывали один раз и пропускали через фильтр с диаметром пор 70 мкм для получения суспензии отдельных клеток.

Клетки окрашивали антителами к CD4, CD8, PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3 и CTLA-4; маркер живых/погибших клеток также использовали для исключения мертвых клеток из анализа. Клетки исследовали с помощью проточной цитометрии. Для сравнения экспрессию одних и тех же маркеров оценивали на МКПК у одних и тех же пациентов.

На фигурах 21А и 21В представлены результаты оценки экспрессии PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3 и CTLA-4 лимфоцитами, проникающими в опухоль (фиг. 21А), и на циркулирующих в кровотоке лимфоцитах (фиг. 21В) у 3 разных пациентов (представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение среднего для 3 независимых экспериментов с использованием клеток от 3 разных доноров, все эксперименты проводили с тремя повторами). Приблизительно 2/3 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в опухоли экспрессировали PD-1, в то время как большинство лимфоцитов МКПК не экспрессировали PD-1.

Смесь после диссоциации опухоли культивировали совместно с аллогенными дендритными клетками (ДК), чтобы инициировать реакцию смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). Клетки сначала культивировали в течение 7 дней без антител и затем в течение 7 дней в присутствии антител к PD-1 или контрольных антител. После 2 этапов культивирования уровень ИФН- $\gamma$  в супернатантах количественно исследовали с помощью ИФА.

На фигурах 22А-22С представлены результаты оценки секреции ИФН- $\gamma$  после СКЛ в присутствии или в отсутствие антител к PD-1. Показаны средние значения  $\pm$  стандартное отклонение среднего для двух или трех повторов в трех независимых экспериментах (клетки от 3 разных пациентов). Антитела к PD-1 смогли восстановить способность лимфоцитов, расположенных в опухолевом очаге, секретировать ИФН- $\gamma$  в зависимости от дозы.

Рак мочевого пузыря: применение антитела к PD-1 для повторной активации лимфоцитов, проникающих в опухоль мочевого пузыря (данные *ex vivo*)

Образцы опухоли мочевого пузыря получали из Национального онкологического центра Сингапура после одобрения соответствующим Экспертным советом организации (ЭСО). Образцы диссоциировали с использованием набора для диссоциации опухоли человека и устройства для диссоциации ткани.

Чтобы подтвердить экспрессию маркеров истощения на поверхности лимфоцитов, проникающих в опухоль, выделенную смесь клеток промывали один раз и пропускали через фильтр с диаметром пор 70 мкм для получения суспензии отдельных клеток. Клетки окрашивали антителами к CD4, CD8, PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3 и CTLA-4; маркер живых/погибших клеток также использовали для исключения мертвых клеток

из анализа. Клетки исследовали с помощью проточной цитометрии.

На фигуре 23А и 23В представлены результаты оценки экспрессии PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3 и CTLA-4 лимфоцитами, проникающими в опухоль (фиг. 23А), и циркулирующими в кровотоке лимфоцитами (фиг. 23В) от 2 разных пациентов (представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение среднего для 2 независимых экспериментов с использованием клеток от 2 разных доноров, все эксперименты проводили с тремя повторами). Большинство лимфоцитов, проникающих в опухоль, экспрессируют PD-1, в то время как лишь небольшая часть циркулирующих в кровотоке лимфоцитов экспрессируют PD-1.

Смесь после диссоциации опухоли культивировали совместно с аллогенными дендритными клетками (ДК), чтобы инициировать реакцию смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). Клетки культивировали в течение первых 7 дней без антител и затем в течение 7 дней в присутствии антитела к PD-1 или контрольных антител. После 2 этапов культивирования уровень ИФН- $\gamma$  в супернатантах количественно исследовали с помощью ИФА.

На фигуре 24 представлены результаты оценки секреции ИФН- $\gamma$  после СКЛ в присутствии или в отсутствие антител к PD-1. Показано среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение среднего для трех повторов в 1 эксперименте. Антитело к PD-1 было способно восстанавливать способность лимфоцитов, расположенных в опухолевом очаге, секретировать ИФН- $\gamma$  в зависимости от дозы.

#### Перечень последовательностей

<110> Agency for Science, Technology and Research

<120> Антитела к PD-1

<130> RIC/FP7150477

<150> GB 1419084.7

<151> 2014-10-27

<160> 89

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность: последовательность варибельной области лег

<400> 1

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn

20 25 30

Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Ser Trp Asp Asp Val Leu

85 90 95

Tyr Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 2

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области лег

<400> 2

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

10 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn

20 25 30

Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

15 Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Ser Trp Asp Asp Tyr Tyr

20 85 90 95

Tyr Gly Thr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 3

<211> 110

25 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области лег

<400> 3

30 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn

20 25 30

Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

40 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Tyr Leu

85 90 95

Arg Gly Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 4

45 <211> 110

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области лег  
<400> 4

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
5 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn  
20 25 30  
Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
10 50 55 60  
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80  
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Asp Tyr Leu  
85 90 95  
15 His Gly Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 5  
<211> 110  
<212> PRT

20 <213> Искусственная последовательность  
<220>

<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области лег  
<400> 5

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
25 1 5 10 15  
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn  
20 25 30  
Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
30 Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80  
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Tyr Val  
35 85 90 95  
Arg Gly Thr Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 6  
<211> 110  
<212> PRT

40 <213> Искусственная последовательность  
<220>

<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области лег  
<400> 6

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
45 1 5 10 15  
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn  
20 25 30

Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
5 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80  
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Asp Phe Leu  
85 90 95  
Arg Gly Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
10 100 105 110  
<210> 7  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
15 <220>  
<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариabельной области лег  
<400> 7  
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
20 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn  
20 25 30  
Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
25 50 55 60  
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80  
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Asp Asp Ala  
85 90 95  
30 Arg Gly Thr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110  
<210> 8  
<211> 110  
<212> PRT  
35 <213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариabельной области лег  
<400> 8  
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
40 1 5 10 15  
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn  
20 25 30  
Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
45 Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Val Tyr  
85 90 95  
Tyr Gly Thr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

5 <210> 9  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
10 <223> Синтетическая последовательность: последовательность вариabельной области лег  
<400> 9

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn  
15 20 25 30  
Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
20 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80  
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95  
Tyr Gly Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
25 100 105 110

<210> 10  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
30 <220>  
<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариabельной области лег  
<400> 10

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
35 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn  
20 25 30  
Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
40 50 55 60  
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80  
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ala Tyr  
85 90 95  
45 Tyr Gly Thr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 11  
<211> 110

<212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области лег  
 5 <400> 11  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn  
 20 25 30  
 10 Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
 15 65 70 75 80  
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Val Tyr  
 85 90 95  
 Arg Gly Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110  
 20 <210> 12  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 25 <223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области лег  
 <400> 12  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn  
 20 25 30  
 30 Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 35 40 45  
 Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
 35 65 70 75 80  
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Asp Ser Leu  
 85 90 95  
 Tyr Gly Thr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 40 100 105 110  
 <210> 13  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 45 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области тяж  
 <400> 13  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg



RU 2715 628 C2

```

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
5          35          40          45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser 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
10 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Ser Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Lys Asp His Trp
100          105          110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
15          115          120
<210> 14
<211> 122
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
20 <220>
<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области тяж
<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15
25 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
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
30          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
35 Ala Ser Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Lys Asp Val Trp
100          105          110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120
<210> 15
40 <211> 122
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области тяж
45 <400> 15
Gln 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
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
5      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
10     Ala Ser Asp Tyr Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
                100                105                110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
                115                120
<210> 16
15     <211> 122
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариabельной области тяж
20     <400> 16
Gln 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
25     Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                40                45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser 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
30     65                70                75                80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                90                95
Ala Ser Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp
                100                105                110
35     Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
                115                120
<210> 17
<211> 122
<212> PRT
40     <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариabельной области тяж
<400> 17
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
45     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  
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser 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  
5 65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Ser Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
100 105 110  
10 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120  
<210> 18  
<211> 122  
<212> PRT  
15 <213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариabельной области тяж  
<400> 18  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
20 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  
25 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser 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  
30 85 90 95  
Ala Ser Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
100 105 110  
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120  
35 <210> 19  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
40 <223> Синтетическая последовательность: последовательность вариabельной области тяж  
<400> 19  
Gln 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  
45 20 25 30  
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser 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  
5 85 90 95  
Ala Ser Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
100 105 110  
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120  
10 <210> 20  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
15 <223> Синтетическая последовательность: последовательность вариabельной области тяж  
<400> 20  
Gln 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 20 25 30  
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
25 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 Ser Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
30 100 105 110  
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120  
<210> 21  
<211> 122  
35 <212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариabельной области тяж  
<400> 21  
40 Gln 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  
45 35 40 45  
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser 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

RU 2715 628 C2

```

65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
              85              90              95
Ala Ser Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
5              100              105              110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
              115              120
<210> 22
<211> 122
10 <212> PRT
    <213> Искусственная последовательность
    <220>
    <223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области тяж
    <400> 22
15 Gln 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
20              35              40              45
    Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser 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
25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
              85              90              95
    Ala Ser Asp Tyr Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
              100              105              110
    Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
30              115              120
    <210> 23
    <211> 122
    <212> PRT
    <213> Искусственная последовательность
35 <220>
    <223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области тяж
    <400> 23
    Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
    1              5              10              15
40 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
    Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
45 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 Ser Asp Leu Gly Ser Gly Tyr Tyr Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp  
100 105 110  
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
5 115 120  
<210> 24  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
10 <220>  
<223> Синтетическая последовательность: последовательность вариабельной области тяж  
<400> 24  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
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  
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
20 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  
25 Ala Ser Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
100 105 110  
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120  
<210> 25  
30 <211> 13  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Синтетическая последовательность: LC-CDR1  
35 <400> 25  
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn Ser Val Asn  
1 5 10  
<210> 26  
<211> 7  
40 <212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Синтетическая последовательность: LC-CDR2  
<400> 26  
45 Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser  
1 5  
<210> 27  
<211> 11

<212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 5 <400> 27  
 Ala Ser Trp Asp Asp Val Leu Tyr Gly Ser Val  
 1 5 10  
 <210> 28  
 <211> 11  
 10 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 <400> 28  
 15 Ala Ser Trp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ile  
 1 5 10  
 <210> 29  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 20 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 <400> 29  
 Ala Ser Trp Asp Asp Tyr Leu Arg Gly Thr Val  
 25 1 5 10  
 <210> 30  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 30 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 <400> 30  
 Ser Ala Trp Asp Asp Tyr Leu His Gly Thr Val  
 1 5 10  
 35 <210> 31  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 40 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 <400> 31  
 Ala Ser Trp Asp Asp Tyr Val Arg Gly Thr Met  
 1 5 10  
 <210> 32  
 45 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

<223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 <400> 32  
 Ser Ser Trp Asp Asp Phe Leu Arg Gly Thr Val  
 1 5 10  
 5 <210> 33  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 10 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 <400> 33  
 Ser Ser Trp Asp Asp Asp Ala Arg Gly Thr Ile  
 1 5 10  
 <210> 34  
 15 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 20 <400> 34  
 Ala Ala Trp Asp Asp Val Tyr Tyr Gly Thr Ile  
 1 5 10  
 <210> 35  
 <211> 11  
 25 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 <400> 35  
 30 Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu Tyr Gly Thr Val  
 1 5 10  
 <210> 36  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 35 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 <400> 36  
 Ala Ala Trp Asp Asp Ala Tyr Tyr Gly Thr Ile  
 40 1 5 10  
 <210> 37  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 45 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 <400> 37  
 Ala Ser Trp Asp Asp Val Tyr Arg Gly Thr Val



1 5 10  
 <210> 38  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 5 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 <400> 38  
 Ser Ser Trp Asp Asp Ser Leu Tyr Gly Thr Ile  
 10 1 5 10  
 <210> 39  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 15 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR1  
 <400> 39  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His  
 1 5 10  
 20 <210> 40  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 25 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR2  
 <400> 40  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 30 <210> 41  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 35 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 <400> 41  
 Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Lys Asp His  
 1 5 10  
 <210> 42  
 40 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 45 <400> 42  
 Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Lys Asp Val  
 1 5 10  
 <210> 43

<211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 5 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 <400> 43  
 Asp Tyr Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10  
 <210> 44  
 10 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 15 <400> 44  
 Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val  
 1 5 10  
 <210> 45  
 <211> 13  
 20 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 <400> 45  
 25 Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10  
 <210> 46  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 30 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 <400> 46  
 Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 35 1 5 10  
 <210> 47  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 40 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 <400> 47  
 Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10  
 45 <210> 48  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 <400> 48  
 Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 5 1 5 10  
 <210> 49  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 10 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 <400> 49  
 Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10  
 15 <210> 50  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 20 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 <400> 50  
 Asp Tyr Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10  
 <210> 51  
 25 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 30 <400> 51  
 Asp Leu Gly Ser Gly Tyr Tyr Leu Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10  
 <210> 52  
 <211> 13  
 35 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 <400> 52  
 40 Asp Leu Gly Ala Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10  
 <210> 53  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 45 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: LC-CDR3  
 <220>

<221> Вариант  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Хаа= Ala или Ser  
 <220>  
 5 <221> Вариант  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Хаа= Ser или Ala  
 <220>  
 <221> Вариант  
 10 <222> (6)..(6)  
 <223> Хаа= Val, Tyr, Phe, Asp, Ser или Ala  
 <220>  
 <221> Вариант  
 <222> (7)..(7)  
 15 <223> Хаа= Leu, Tyr, Val или Ala  
 <220>  
 <221> Вариант  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Хаа= Tyr, Arg или His  
 20 <220>  
 <221> Вариант  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Хаа= Ser или Thr  
 <220>  
 25 <221> Вариант  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Хаа= Val, Ile или Met  
 <400> 53  
 Хаа Хаа Trp Asp Asp Хаа Хаа Хаа Gly Хаа Хаа  
 30 1 5 10  
 <210> 54  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 35 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: HC-CDR3  
 <220>  
 <221> Вариант  
 <222> (2)..(2)  
 40 <223> Хаа= Leu или Tyr  
 <220>  
 <221> Вариант  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Хаа= Ala или Ser  
 45 <220>  
 <221> Вариант  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Хаа= Pro или Tyr

<220>  
 <221> Вариант  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa= Tyr или Leu  
 5 <220>  
 <221> Вариант  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa= Lys, Met или Leu  
 <220>  
 10 <221> Вариант  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa= His или Val  
 <400> 54  
 Asp Xaa Gly Xaa Gly Xaa Tyr Xaa Tyr Gly Xaa Asp Xaa  
 15 1 5 10  
 <210> 55  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность  
 20 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность вариabельно  
 <400> 55  
 ctgcctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
 tcttggtctg gaagcagctc caacatcaaa ttaacagtg ttaactggta tcagcaactc 120  
 25 ccaggaacgg cccccaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct 180  
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
 tctgaggatg aggctgatta tttctgtgct tcttgggatg atgttcttta tggatctgtg 300  
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg 330  
 <210> 56  
 30 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность вариabельно  
 35 <400> 56  
 ctgcctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
 tcttggtctg gaagcagctc caacatcaaa ttaacagtg ttaactggta tcagcaactc 120  
 ccaggaacgg cccccaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct 180  
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
 40 tctgaggatg aggctgatta tttctgtgct tcttgggatg attattatta tggaactatt 300  
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg 330  
 <210> 57  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 45 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: кодируемая аминокислотная последовательность  
 <400> 57

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Lys Phe Asn  
20 25 30  
5 Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
10 65 70 75 80  
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Tyr Tyr  
85 90 95  
Tyr Gly Thr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110  
15 <210> 58  
<211> 330  
<212> DNA  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
20 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность вариабельно  
<400> 58  
cagagcgtcc tgacacagcc tcctagtgc agcggaaccc ctgggcagag agtgaccatt 60  
tcttgtagcg gcagcagcag taacatcaag ttcaactccg tgaattggta tcagcagctg 120  
cccggaactg ctcctaaact gctgatctac tctaacaatc agcgaccaag tggcgtcccc 180  
25 gaccggttca gcggtccaa gtctgggacc agtgcctcac tggctatcag cgggctccag 240  
tccgaggacg aagcagatta ctattgcgcc agctgggacg attactatta cggcaccatt 300  
ttcggcgggg gaacaaaact gaccgtcctg 330  
<210> 59  
<211> 330  
30 <212> DNA  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность вариабельно  
<400> 59  
35 cagtctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
tcttgttctg gaagcagctc caacatcaaa tttaacagtg ttaactggta tcagcaactc 120  
ccaggaacgg cccccaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct 180  
gaccgattct ctggctccaa gtctgggact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgct tcttgggatg attatcttcg tggaactgtt 300  
40 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg 330  
<210> 60  
<211> 330  
<212> DNA  
<213> Искусственная последовательность  
45 <220>  
<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность вариабельно  
<400> 60  
cagagcgtgc tgacccagcc cccagcgcc agtggaacac ccggacagag agtgaccatc 60

	agttgctcag gcagctcctc taacattaag ttcaactctg tgaattggta tcagcagctg	120
	cccggaactg ctcctaaact gctgatctat tctaacaatc agcgaccaag tggcgctcccc	180
	gaccggttca gcggtctcaa gtctgggacc agtgcctcac tggctattag cgggctccag	240
	tccgaggacg aagcagatta ctattgtgcc agctgggacg attacctgag gggcaccgtg	300
5	ttcggaggag gaacaaaact gaccgtcctg	330
	<210> 61	
	<211> 330	
	<212> DNA	
	<213> Искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность вариabelно	
	<400> 61	
	cagtctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttgttctg gaagcagctc caacatcaaa tttaacagtg ttaactggta tcagcaactc	120
15	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
	tctgaggatg aggctgatta ttactgttct gcttgggatg attatcttca tggaactgtg	300
	ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg	330
	<210> 62	
20	<211> 330	
	<212> DNA	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность вариabelно	
25	<400> 62	
	cagagcgtcc tgacacagcc cccctccgca agtggaaccc ctgggcagcg agtgactatt	60
	tcatgcagtg gatcttcac taacatcaag ttcaactccg tgaattggta tcagcagctg	120
	cccggaactg ctcctaaact gctgatctat tctaacaatc agcgaccaag tggcgctcccc	180
	gaccggttca gcggtctcaa gtctgggacc agtgcctcac tggctattag cgggctccag	240
30	tccgaggacg aagcagatta ctattgcagc gcctgggacg attacctgca cggcaccgtg	300
	ttcggaggag gaacaaaact gaccgtcctg	330
	<210> 63	
	<211> 330	
	<212> DNA	
35	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность вариabelно	
	<400> 63	
	cagtctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
40	tcttgttctg gaagcagctc caacatcaaa tttaacagtg ttaactggta tcagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
	tctgaggatg aggctgatta ttactgtgct tcttgggatg attatgttcg tggaactatg	300
	ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg	330
45	<210> 64	
	<211> 330	
	<212> DNA	
	<213> Искусственная последовательность	

<220>  
 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 <400> 64

	cagtctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
5	tcttggttctg gaagcagctc caacatcaaa tttaacagtg ttaactggta tcagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
	tctgaggatg aggctgatta ttactgttct tcttgggatg attttcttcg tggaactgtt	300
	ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg	330

10 <210> 65  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 15 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 <400> 65

	cagtctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttggttctg gaagcagctc caacatcaaa tttaacagtg ttaactggta tcagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct	180
20	gaccgattct ctggctccaa gtctggcact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
	tctgaggatg aggctgatta ttactgttct tcttgggatg atgatgctcg tggaactatt	300
	ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg	330

<210> 66  
 <211> 330  
 25 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 <400> 66

30	cagtctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttggttctg gaagcagctc caacatcaaa tttaacagtg ttaactggta tcagcaactc	120
	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
	tctgaggatg aggctgatta ttactgtgct gcttgggatg atgtttatta tggaactatt	300
35	ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg	330

<210> 67  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность

40 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 <400> 67

	cagtctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
	tcttggttctg gaagcagctc caacatcaaa tttaacagtg ttaactggta tcagcaactc	120
45	ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct	180
	gaccgattct ctggctccaa gtctggcact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
	tctgaggatg aggctgatta ttactgtgct tcttgggatg attctcttta tggaactgtt	300
	ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg	330



<210> 68  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность  
 5 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 <400> 68  
 cagtctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
 tcttgttctg gaagcagctc caacatcaaa tttaacagtg ttaactggta tcagcaactc 120  
 10 ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct 180  
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
 tctgaggatg aggctgatta ttactgtgct gcttgggatg atgcttatta tggaactatt 300  
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg 330  
 <210> 69  
 15 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 20 <400> 69  
 cagtctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
 tcttgttctg gaagcagctc caacatcaaa tttaacagtg ttaactggta tcagcaactc 120  
 ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct 180  
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
 25 tctgaggatg aggctgatta ttactgtgct tcttgggatg atgtttatcg tggaactgtt 300  
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg 330  
 <210> 70  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 30 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 <400> 70  
 cagagcgtcc tgacacagcc cccaagcgca agcggaaccc ccggccagcg agtgaccatt 60  
 35 agttgtagtg gaagtagtag taacatcaag ttcaactccg tgaattggta tcagcagctg 120  
 cccggaactg ctccataact gctgatctat tctaacaatc agcgaccaag tggcgtcccc 180  
 gaccggttca gcggctccaa gtctgggacc agtgcctcac tggctattag cgggctccag 240  
 tccgaggacg aagcagatta ctattgcgcc agctgggacg atgtgtacag gggcacctgc 300  
 ttcggcgggg gaacaaaaact gaccgtcctg 330  
 40 <210> 71  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 45 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 <400> 71  
 cagtctgtgc tgactcagcc cccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
 tcttgttctg gaagcagctc caacatcaaa tttaacagtg ttaactggta tcagcaactc 120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcgaccctc aggggtccct 180  
gaccgattct ctggctccaa gtctggcact tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
tctgaggatg aggctgatta ttactgttct tcttgggatg attctcttta tggaactatt 300  
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg 330

5 <210> 72  
<211> 366  
<212> DNA  
<213> Искусственная последовательность  
<220>

10 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность вариабельно  
<400> 72  
caggtccagc tgggtgcagtc cgggggaggc gtgggtccagc ctgggcggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcaactggg cgcagggt 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac 180  
15 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gactgatctt 300  
ggtgctggtc cttattatta tggtaaggat cattggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360  
tcaagc 366  
<210> 73

20 <211> 366  
<212> DNA  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность вариабельно  
25 <400> 73  
caggtccagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggcggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcaactggg cgcagggt 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
30 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gactgatctt 300  
ggtgctggtc cttattatta tggtaaggat gtttggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360  
tcaagc 366  
<210> 74  
<211> 122

35 <212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Синтетическая последовательность: кодируемая аминокислотная последовательность  
<400> 74

40 Gln 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  
45 35 40 45  
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser 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

# RU 2715 628 C2

	65				70					75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Ser	Asp	Leu	Gly	Ala	Gly	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Asp	Val	Trp
5				100					105					110		
	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
				115					120							
	<210>			75												
	<211>			366												
10	<212>			DNA												
	<213>			Искусственная последовательность												
	<220>															
	<223>			Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность												
	<400>			75												
15	caggtgcagc	tggtcgaatc	cggggggggg	gtggtgcagc	ctggacggtc	actgagactg									60	
	agttgtgccg	cctctggggt	tactttcagc	tcctatggca	tgactgggt	gaggcaggct									120	
	cccggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtc	atctcttacg	acggcagtaa	caagtactat									180	
	gccgatagcg	tcaaagggcg	gttcactatt	tcaagagaca	acagcaaaaa	taccctgtac									240	
	ctccagatga	acagcctgcg	ggccgaagac	acagctgtgt	actattgcgc	atctgatctg									300	
20	ggagccggcc	cttactatta	cggaaggat	gtctgggggc	agggaaccac	agtcaccgtc									360	
	tcaagc														366	
	<210>			76												
	<211>			366												
	<212>			DNA												
25	<213>			Искусственная последовательность												
	<220>															
	<223>			Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность												
	<400>			76												
	caggtccagc	tggtagagtc	cgggggaggc	gtggtccagc	ctgggcggtc	cctgagactc									60	
30	tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	agctatggca	tgactgggt	ccgccaggct									120	
	ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatcatatg	atggaagtaa	taaatactac									180	
	gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat									240	
	ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagtgtattat									300	
	ggtgctggtc	cttattatta	tggtatggat	gtttggggcc	aagggaaccac	ggtcaccgtc									360	
35	tcaagc														366	
	<210>			77												
	<211>			366												
	<212>			DNA												
	<213>			Искусственная последовательность												
40	<220>															
	<223>			Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность												
	<400>			77												
	caggtgcagc	tggtggaag	cggggggggc	gtggtgcagc	ctggaaggtc	actgagactg									60	
	tcttggtgccg	catctggggt	tacatttagc	tcctatggca	tgactgggt	gaggcaggct									120	
45	cccggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtc	atctcttacg	acggcagtaa	caagtactat									180	
	gccgatagcg	tcaaagggcg	gttcactatt	tcaagagaca	acagcaaaaa	taccctgtac									240	
	ctccagatga	acagcctgcg	ggccgaagac	acagctgtgt	actattgcgc	atctgattac									300	
	ggagccggcc	cttactatta	cgccatggat	gtctgggggc	agggaaccac	agtcaccgtc									360	

	tcaagc	366
	<210> 78	
	<211> 366	
	<212> DNA	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно	
	<400> 78	
10	caggtccagc tggtagagtc cgggggaggc gtggtccagc ctgggcggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac	180
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagtgatctt	300
	ggtgctggtc cttattatta tggtttgat gtttggggcc aaggaccac ggtcacgcgc	360
15	tcaagc	366
	<210> 79	
	<211> 366	
	<212> DNA	
	<213> Искусственная последовательность	
20	<220>	
	<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно	
	<400> 79	
25	caggtgcagc tgggtggaatc tggggggggg gtcgtgcagc ccggacggtc actgagactg	60
	tcatgtgccg cttcagggtt tacttttagc tcctatggca tgcactgggt gaggcaggct	120
	cccggcaagg ggctggagtg ggtggcagtc atctcttacg acggcagtaa caagtactat	180
	gccgatagcg tcaaagggcg gttcactatt tcaagagaca acagcaaaaa taccctgtac	240
	ctccagatga acagcctgcg ggccgaagac acagctgtgt actattgctc atctgatctg	300
	ggagccggcc cttactatta cggcctggat gtctgggggc agggaaccac agtcaccgctc	360
30	tcaagc	366
	<210> 80	
	<211> 366	
	<212> DNA	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
35	<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно	
	<400> 80	
40	caggtccagc tggtagagtc cgggggaggc gtggtccagc ctgggcggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac	180
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagtgatctt	300
	ggtgctggtc cttattatta tggtatggat gtttggggcc aaggaccac ggtcacgcgc	360
	tcaagc	366
45	<210> 81	
	<211> 366	
	<212> DNA	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	

<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 <400> 81  
 caggtccagc tggtagagtc cgggggaggc gtggtccagc ctgggcggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 5 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagtgatcctt 300  
 ggtgctggtc cttattatta tggatatggat gtttggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360  
 tcaagc 366  
 10 <210> 82  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 15 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 <400> 82  
 caggtccagc tggtagagtc cgggggaggc gtggtccagc ctgggcggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac 180  
 20 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagtgatcctt 300  
 ggtgctggtc cttattatta tggatatggat gtttggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360  
 tcaagc 366  
 <210> 83  
 25 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 30 <400> 83  
 caggtccagc tggtagagtc cgggggaggc gtggtccagc ctgggcggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 35 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagtgatcctt 300  
 ggtgctggtc cttattatta tggatatggat gtttggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360  
 tcaagc 366  
 <210> 84  
 <211> 366  
 40 <212> DNA  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно  
 <400> 84  
 45 caggtccagc tggtagagtc cgggggaggc gtggtccagc ctgggcggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagtgatctt	300
	gggtgctggtc cttattatta tggatatggat gtttggggcc aagggaccac ggtcacccgc	360
	tcaagc	366
	<210> 85	
5	<211> 366	
	<212> DNA	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно	
10	<400> 85	
	caggtccagc tggtagagtc cgggggaggc gtgggtccagc ctgggcggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac	180
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
15	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagtgattat	300
	gggtgctggtc cttattatta tggatatggat gtttggggcc aagggaccac ggtcacccgc	360
	tcaagc	366
	<210> 86	
	<211> 366	
20	<212> DNA	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно	
	<400> 86	
25	caggtccagc tggtagagtc cgggggaggc gtgggtccagc ctgggcggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac	180
	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagtgatctt	300
30	gggttctgggtt attatcttta tggatatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcacccgc	360
	tcaagc	366
	<210> 87	
	<211> 366	
	<212> DNA	
35	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно	
	<400> 87	
	caggtgcagc tggtagagag cggggggggg gtgggtgcagc ctggacggtc actgagactg	60
40	agttgcgccg catctggatt cacatttagc tcctacggca tgcactgggt gaggcaggca	120
	cccggaagg ggctggagtg ggtggccgctc atctcttatg acggcagtaa caagtactat	180
	gctgatagcg tcaaagggcg gttcactatt tcaagagaca acagcaaaaa taccctgtac	240
	ctccagatga atagcctgcg ggccgaagac acagctgtgt actattgctc ctccgatctg	300
	ggatctgggt actatctgta tggcatggat gtctgggggc agggaaccac agtcaccgc	360
45	tcaagc	366
	<210> 88	
	<211> 366	
	<212> DNA	

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность: нуклеотидная последовательность варибельно

<400> 88

```

5  caggtccagc tggtagagtc cgggggaggc gtggtccagc ctgggcggtc cctgagactc      60
   tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct      120
   ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac      180
   gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
   ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagtgatctt      300
10 ggtgctggtc cttattatta tggtatggat gtttgggggc aaggggaccac ggtcaccgtc      360
   tcaagc

```

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность: HC-CDR1

<400> 89

Ser Tyr Gly Met His

20 1 5

### (57) Формула изобретения

1. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который способен специфично связываться с PD-1,

25 (i) содержащий по меньшей мере одну варибельную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDYLRGTV (SEQ ID NO: 29); и

30 по меньшей мере одну варибельную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 43); или

35 (ii) содержащий по меньшей мере одну варибельную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDYLRGTV (SEQ ID NO: 29); и

40 по меньшей мере одну варибельную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO: 43); или

45 (iii) содержащий по меньшей мере одну варибельную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDYYGTI (SEQ ID NO: 28); и  
по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: SYGMH (SEQ ID NO: 89)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYGKDV (SEQ ID NO: 42), или

(iv) содержащий по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, содержащую следующие CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO: 25)

LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO: 26)

LC-CDR3: ASWDDYYGTI (SEQ ID NO: 28); и

по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, содержащую следующие CDR:

HC-CDR1: GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 39)

HC-CDR2: VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 40)

HC-CDR3: DLGAGPYYYGKDV (SEQ ID NO: 42).

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащий последовательность переменной области тяжелой цепи и последовательность переменной области легкой цепи, где

последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO: 15 или 14 и последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO: 3 или 2.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфично связывается с PD-1 человека или макаки-резуса по сравнению с другими членами семейства CD28.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент является эффективным для восстановления функции Т-клеток в Т-клетках, проявляющих истощение Т-клеток или анергию Т-клеток.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который способен специфично связываться с PD-1, который представляет собой биспецифичное антитело или биспецифичный антигенсвязывающий фрагмент, содержащий (i) антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4 и (ii), антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с одним из TIM-3, LAG-3, ICOS, CTLA4, BTLA или CD28.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-5 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

7. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5.

8. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 7.

9. Клетка-хозяин, способная экспрессировать антитело по п.1, содержащая вектор экспрессии по п. 8.

10. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-5, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 9 в условиях, подходящих для экспрессии указанного вектора, кодирующего антитело или антигенсвязывающий фрагмент, и выделение указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

11. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-5 в приготовлении лекарственного средства для применения в лечении рака.

12. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.



1-5 в приготовлении лекарственного средства для применения в лечении инфекционного заболевания.

13. Способ *in vitro* или *in vivo* усиления эффекторной функции Т-клетки, включающий введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-5 в Т-клетку, проявляющую истощение Т-клеток.

14. Способ лечения рака, включающий введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-5 пациенту, страдающему от рака.

15. Способ лечения инфекционного заболевания, включающий введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-5 пациенту, страдающему от инфекционного заболевания.

16. Способ обнаружения PD-1, включающий приведение образца, содержащего или предположительно содержащего PD-1, в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп 1-5 и обнаружение образования комплекса антитела или антигенсвязывающего фрагмента и PD-1.

17. Способ диагностики заболевания или состояния у субъекта, причем указанный способ включает приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-5 в условиях *in vitro* и обнаружение образования комплекса указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента и PD-1.

18. Способ отбора или стратификации субъекта для лечения с использованием агентов, нацеленных к PD-1, причем указанный способ включает приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-5 в условиях *in vitro*, и обнаружение образования комплекса указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента и PD-1.

19. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому пп. 1-5 для обнаружения PD-1 в условиях *in vitro*.

20. Способ размножения популяции Т-клеток, отличающийся тем, что Т-клетки в условиях *in vitro* или *ex vivo* приводят в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-5.

21. Способ лечения субъекта, страдающего от рака или инфекционного заболевания, причем указанный способ включает культивирование Т-клеток, полученных из образца крови субъекта, в присутствии антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-5 так, чтобы обеспечить размножение популяции Т-клеток, сбор размноженных Т-клеток и введение указанных размноженных Т-клеток субъекту, нуждающемуся в лечении.

A3 Клон	
LPVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY FCASWDDVLYGSVFGGKLTVL (SEQ ID NO:1)	
LC-CDR1:	SGSSSNNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)
LC-CDR2:	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)
LC-CDR3:	ASWDDVLYGSV (SEQ ID NO:27)
A10 Клон	
LPVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY FCASWDDYYGYGTFGGKLTVL (SEQ ID NO:2)	
LC-CDR1:	SGSSSNNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)
LC-CDR2:	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)
LC-CDR3:	ASWDDYYGYGTI (SEQ ID NO:28)

1/54

Фигура 1

<u>В6 Клон</u>			
QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIY <u>SNNQRPSGV</u> PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY			
YCSAWDDYLRGTVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:3)			
LC-CDR1:	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)		
LC-CDR2:	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)		
LC-CDR3:	ASWDDYLRGTV (SEQ ID NO:29)		
<u>С4 Клон</u>			
QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIY <u>SNNQRPSGV</u> PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY			
YCSAWDDYLRGTVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:4)			
LC-CDR1:	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)		
LC-CDR2:	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)		
LC-CDR3:	SAWDDYLRGTV (SEQ ID NO:30)		

Фигура 1 (продолж.)

D4 Клон	
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIY <u>SNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY</u> YCASWDDYVRGTMFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:5)	
LC-CDR1:	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)
LC-CDR2:	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)
LC-CDR3:	ASWDDYVRGTM (SEQ ID NO:31)
E1 Клон	
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIY <u>SNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY</u> YCSWDDFLRGTVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:6)	
LC-CDR1:	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)
LC-CDR2:	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)
LC-CDR3:	SSWDDFLRGTV (SEQ ID NO:32)

Фигура 1 (продолж.)

<u>F2 Клон</u>	
QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIY <u>SNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY</u> YC <u>SSWDDDARGTIFGGG</u> TKLTVL (SEQ ID NO:7)	
LC-CDR1:	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)
LC-CDR2:	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)
LC-CDR3:	SSWDDDARGTI (SEQ ID NO:33)
<u>G1 Клон</u>	
QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIY <u>SNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY</u> YCAAWDDVYYGT <u>IFGGG</u> TKLTVL (SEQ ID NO:8)	
LC-CDR1:	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)
LC-CDR2:	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)
LC-CDR3:	AAWDDVYYGTI (SEQ ID NO:34)

Фигура 1 (продолж.)

G2 Клон			
QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSNNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY			
<u>YCASWDDSLYGTVFGGGTKLTVL</u> (SEQ ID NO:9)			
LC-CDR1:	SGSSNNIKFNSVN	(SEQ ID NO:25)	
LC-CDR2:	SNNQRPS	(SEQ ID NO:26)	
LC-CDR3:	ASWDDSLYGTV	(SEQ ID NO:35)	
G10 Клон			
QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSNNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY			
<u>YCAAWDDAYYGTIFGGGTKLTVL</u> (SEQ ID NO:10)			
LC-CDR1:	SGSSNNIKFNSVN	(SEQ ID NO:25)	
LC-CDR2:	SNNQRPS	(SEQ ID NO:26)	
LC-CDR3:	AAWDDAYYGTI	(SEQ ID NO:36)	

Фигура 1 (продолж.)

H4 Клон  
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPSPVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY  
YCASWDDVYRGTVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:11)

- LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)
- LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO:26)
- LC-CDR3: ASWDDVYRGTV (SEQ ID NO:37)

H9 Клон  
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPSPVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY  
YCSSWDDSLYGTIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:12)

- LC-CDR1: SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)
- LC-CDR2: SNNQRPS (SEQ ID NO:26)
- LC-CDR3: SSWDDSLYGTI (SEQ ID NO:38)

Фигура 1 (продолж.)

A3 Клон			
QVQLVQSGGGVWQPGRLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN			
SLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGKDHWGQGT TTVSS (SEQ ID NO:13)			
HC-CDR1:	GFTFSSYGMH	(SEQ ID NO:39) или	
	SYGMH	(SEQ ID NO:89)	
HC-CDR2:	VISYDGSNKYYADSVKG	(SEQ ID NO:40)	
HC-CDR3:	DLGAGPYYYGKDH	(SEQ ID NO:41)	
A10 Клон			
QVQLVQSGGGVWQPGRLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN			
SLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGKDWWGQGT TTVSS (SEQ ID NO:14)			
HC-CDR1:	GFTFSSYGMH	(SEQ ID NO:39) или	
	SYGMH	(SEQ ID NO:89)	
HC-CDR2:	VISYDGSNKYYADSVKG	(SEQ ID NO:40)	
HC-CDR3:	DLGAGPYYYGKDV	(SEQ ID NO:42)	

Фигура 2



B6 Клон			
QVQLVESGGGWQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN			
SLRAEDTAVYYCASDYGAGPYYYGMDVWGQGTITVSS (SEQ ID NO:15)			
HC-CDR1:	GFTFSSYGMH	(SEQ ID NO:39) или	
	SYGMH	(SEQ ID NO:89)	
HC-CDR2:	VISYDGSNKKYYADSVKG	(SEQ ID NO:40)	
HC-CDR3:	DYGAGPYYYGMDV	(SEQ ID NO:43)	
C4 Клон			
QVQLVESGGGWQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN			
SLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGLDVWGQGTITVSS (SEQ ID NO:16)			
HC-CDR1:	GFTFSSYGMH	(SEQ ID NO:39) или	
	SYGMH	(SEQ ID NO:89)	
HC-CDR2:	VISYDGSNKKYYADSVKG	(SEQ ID NO:40)	
HC-CDR3:	DLGAGPYYYGLDV	(SEQ ID NO:44)	

8/54

Фигура 2 (продолж.)

D4 Клон			
QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFESSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN			
SLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:17)			
HC-CDR1:	GFTFSSYGMH	(SEQ ID NO:39) или	
	SYGMH	(SEQ ID NO:89)	
HC-CDR2:	VISYDGSNKYYADSVKG	(SEQ ID NO:40)	
HC-CDR3:	DLGAGPYYYGMDV	(SEQ ID NO:45)	
E1 Клон			
QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFESSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN			
SLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:18)			
HC-CDR1:	GFTFSSYGMH	(SEQ ID NO:39) или	
	SYGMH	(SEQ ID NO:89)	
HC-CDR2:	VISYDGSNKYYADSVKG	(SEQ ID NO:40)	
HC-CDR3:	DLGAGPYYYGMDV	(SEQ ID NO:46)	

Фигура 2 (продолж.)

<u>F2 Клон</u>	
QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN	
SLRAEDTAVYYCASD <u>LGAGPYYYGMDVWGQGT</u> TVVSS (SEQ ID NO:19)	
HC-CDR1:	GFTFSYGMH (SEQ ID NO:39) или
	SYGMH (SEQ ID NO:89)
HC-CDR2:	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)
HC-CDR3:	DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:47)
<u>G1 Клон</u>	
QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN	
SLRAEDTAVYYCASD <u>LGAGPYYYGMDVWGQGT</u> TVVSS (SEQ ID NO:20)	
HC-CDR1:	GFTFSYGMH (SEQ ID NO:39) или
	SYGMH (SEQ ID NO:89)
HC-CDR2:	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)
HC-CDR3:	DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:48)

Фигура 2 (продолж.)

<u>G2 КлоH</u>	
QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN	
SLRAEDTAVYYCASD <u>LGAGPYYYGMDVWGQGTTV</u> SS (SEQ ID NO:21)	
HC-CDR1:	GFTFSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)
HC-CDR2:	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)
HC-CDR3:	DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:49)
<u>G10 КлоH</u>	
QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN	
SLRAEDTAVYYCASDYGAGPYYYGMDVWGQGTTVSS (SEQ ID NO:22)	
HC-CDR1:	GFTFSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)
HC-CDR2:	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)
HC-CDR3:	DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:50)

Фигура 2 (продолж.)

H4 Клон			
QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYQM N SLRAEDTAVYYCASD <u>LGSGYYLYGMDVWGQGT</u> TVSS (SEQ ID NO:23)			
HC-CDR1:	GFTFSSYGMH	(SEQ ID NO:39) или	
	SYGMH	(SEQ ID NO:89)	
HC-CDR2:	VISYDGSNKYYADSVKG	(SEQ ID NO:40)	
HC-CDR3:	DLGSGYYLYGMDV	(SEQ ID NO:51)	
H9 Клон			
QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYQM N SLRAEDTAVYYCASD <u>LGAGPYYYGMDVWGQGT</u> TVSS (SEQ ID NO:24)			
HC-CDR1:	GFTFSSYGMH	(SEQ ID NO:39) или	
	SYGMH	(SEQ ID NO:89)	
HC-CDR2:	VISYDGSNKYYADSVKG	(SEQ ID NO:40)	
HC-CDR3:	DLGAGPYYYGMDV	(SEQ ID NO:52)	

Фигура 2 (продолж.)

Клон	CDR L1	CDR L2	CDR L3
Легкая цепь			
<b>A3</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	ASWDDVLYGSV (SEQ ID NO:27)
<b>A10</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	ASWDDYYYGTI (SEQ ID NO:28)
<b>B6</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	ASWDDYLRGTV (SEQ ID NO:29)
<b>C4</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	SAWDDYLHGTV (SEQ ID NO:30)
<b>D4</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	ASWDDYVRGTM (SEQ ID NO:31)
<b>E1</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	SSWDDFLRGTV (SEQ ID NO:32)
<b>F2</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	SSWDDDDARGTI (SEQ ID NO:33)
<b>G1</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	AAWDDVYYGTI (SEQ ID NO:34)
<b>G2</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	ASWDDSLYGTV (SEQ ID NO:35)
<b>G10</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	AAWDDAYYGTI (SEQ ID NO:36)
<b>H4</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	ASWDDVYRGTV (SEQ ID NO:37)
<b>H9</b>	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	SSWDDSLYGTI (SEQ ID NO:38)
Консенсусная последова- тельность	SGSSSNIKFNSVN (SEQ ID NO:25)	SNNQRPS (SEQ ID NO:26)	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> WDDX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> GX <sub>6</sub> X <sub>7</sub>  X <sub>1</sub> = А или S X <sub>2</sub> = S или A X <sub>3</sub> = V, Y, F, D, S or A X <sub>4</sub> = L, Y, V или A X <sub>5</sub> = Y, R или H X <sub>6</sub> = S, или T X <sub>7</sub> = V, I, или M  (SEQ ID NO:53)

Фигура 3

Клон	CDR L1	CDR L2	CDR L3
Тяжелая цепь			
<b>A3</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DLGAGPYYYGKDH (SEQ ID NO:41)
<b>A10</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DLGAGPYYYGKDV (SEQ ID NO:42)
<b>B6</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:43)
<b>C4</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DLGAGPYYYGLDV (SEQ ID NO:44)
<b>D4</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:45)
<b>E1</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:46)
<b>F2</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:47)
<b>G1</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:48)

Фигура 3 (продолж.)

<b>G2</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:49)
<b>G10</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DYGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:50)
<b>H4</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DLGSGYYLYGMDV (SEQ ID NO:51)
<b>H9</b>	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DLGAGPYYYGMDV (SEQ ID NO:52)
Консенсусная последова- тельность	GFTFSSYGMH (SEQ ID NO:39) или SYGMH (SEQ ID NO:89)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:40)	DZ <sub>1</sub> GZ <sub>2</sub> GZ <sub>3</sub> YZ <sub>4</sub> YGZ <sub>5</sub> DZ <sub>6</sub>  Z <sub>1</sub> = L или Y Z <sub>2</sub> = A или S Z <sub>3</sub> = P или Y Z <sub>4</sub> = Y или L Z <sub>5</sub> = K, M или L Z <sub>6</sub> = H или V (SEQ ID NO:54)

Фигура 3 (продолж.)



**Вариабельные области легкой цепи****A3 Клон****>A3\_аминокислоты\_L**

LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIFNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD  
 RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCASWDDVLYGSVFGGGTKLTVL [SEQ ID NO.  
 1]

**>A3\_нуклеотиды\_L**

CTGCCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
 CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
 AGGAACGGCCCCCAAACCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
 CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
 AGGATGAGGCTGATTATTTCTGTGCTTCTTGGGATGATGTTCTTTATGGATCTGTGTTCCG  
 CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 55]

**A10 Клон****>A10\_аминокислоты\_L**

LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIFNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD  
 RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCASWDDYYYGTIFGGGTAKLTVL [SEQ ID NO.  
 2]

**>A10\_нуклеотиды\_L**

CTGCCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
 CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
 AGGAACGGCCCCCAAACCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
 CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
 AGGATGAGGCTGATTATTTCTGTGCTTCTTGGGATGATTATTATTATGGAACATTTTCGG  
 CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 56]

**Фигура 4**

17/54

**Кодон-оптимизированный клон A10 (индуцированные модификации в аминокислотной последовательности)**

&gt;A10\_оптимизированные\_аминокислоты\_L

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIKFNNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD  
 RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCASWDDYYGTIFGGGKLTVL [SEQ ID NO.  
 57]

&gt;A10\_оптимизированные\_нуклеотиды\_L

CAGAGCGTCCTGACACAGCCTCCTAGTGCAAGCGGAACCCCTGGGCAGAGAGTGACCATT  
 CTTGTAGCGGCAGCAGCAGTAACATCAAGTTCAACTCCGTGAATTGGTATCAGCAGCTGCC  
 CGGAAGTGTCTAAAGTGTGATCTACTCTAACAATCAGCGACCAAGTGGCGTCCCCGAC  
 CGGTTTCAGCGGCTCCAAGTCTGGGACCAAGTGCCTCACTGGCTATCAGCGGGCTCCAGTCCG  
 AGGACGAAGCAGATTACTATTGCGCCAGCTGGGACGATTACTATTACGGCACCATTTTCGG  
 CGGGGGAACAAAAGTACCGTCCTG [SEQ ID NO. 58]

**B6 Клон**

&gt;B6\_аминокислоты\_L

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIKFNNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD  
 RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCASWDDYLRGTVFGGGKLTVL [SEQ ID NO.  
 3]

&gt;B6\_нуклеотиды\_L

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
 CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
 AGGAACGGCCCCCAAAGTCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
 CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
 AGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCTTCTTGGGATGATTATCTTCGTGGAAGTGTTCGG  
 CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 59]

**Кодон-оптимизированный клон B6 (без модификаций аминокислотной последовательности)**

&gt;B6\_оптимизированные\_нуклеотиды\_L

CAGAGCGTGCTGACCCAGCCCCCAGCGCCAGTGGAAACACCCGGACAGAGAGTGACCATCA  
 GTTGCTCAGGCAGCTCCTCTAACATTAAGTTCAACTCTGTGAATTGGTATCAGCAGCTGCC  
 CGGAAGTGTCTAAAGTGTGATCTATTCTAACAATCAGCGACCAAGTGGCGTCCCCGAC  
 CGGTTTCAGCGGCTCCAAGTCTGGGACCAAGTGCCTCACTGGCTATTAGCGGGCTCCAGTCCG  
 AGGACGAAGCAGATTACTATTGTGCCAGCTGGGACGATTACCTGAGGGGCACCGTGTTCGG  
 AGGAGGAACAAAAGTACCGTCCTG [SEQ ID NO. 60]

**Фигура 4 (продолж.)**

**C4 Клон****>C4\_аминокислоты\_L**

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIKFNNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVDP  
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCSAWDDYLHGTVFGGGTKLTVL [SEQ ID NO.  
4]

**>C4\_нуклеотиды\_L**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
AGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
AGGATGAGGCTGATTATTACTGTTCTGCTTGGGATGATTATCTTCATGGAAGTGTGTTCCG  
CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 61]

**Кодон-оптимизированный клон C4 (без модификаций аминокислотной последовательности)****>C4\_оптимизированные\_нуклеотиды\_L**

CAGAGCGTCCTGACACAGCCCCCTCCGCAAGTGGAAACCCCTGGGCAGCGAGTGAATTT  
CATGCAGTGGATCTTCATCTAACATCAAGTTCAACTCCGTGAATTGGTATCAGCAGCTGCC  
CGGAAGTGTCTTAACTGCTGATCTATTCTAACAATCAGCGACCAAGTGGCGTCCCGGAC  
CGGTTTCAGCGGCTCCAAGTCTGGGACCAAGTGCCTCACTGGCTATTAGCGGGCTCCAGTCCG  
AGGACGAAGCAGATTACTATTGCAGCGCCTGGGACGATTACCTGCACGGCACCGTGTTCGG  
AGGAGGAACAAAAGTACCGTCCTG [SEQ ID NO. 62]

**D4 Клон****>D4\_аминокислоты\_L**

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIKFNNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVDP  
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCASWDDYVRGTMFGGGTKLTVL [SEQ ID NO.  
5]

**>D4\_нуклеотиды\_L**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
AGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
AGGATGAGGCTGATTATTACTGTTCTTGGGATGATTATGTTTCGTGGAAGTATGTTCCG  
CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 63]

**Фигура 4 (продолж.)**

**E1 Клон**

&gt;E1\_аминокислоты\_L

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIKFNNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVDP  
RFGSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCSSWDDFLRGTVFGGGTKLTVL [SEQ ID NO.  
6]

&gt;E1\_нуклеотиды\_L

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
AGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
AGGATGAGGCTGATTATTACTGTTCTTCTTGGGATGATTTTCTTCGTGGAAGTGTTCGG  
CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 64]

**F1 Клон**

&gt;F2\_аминокислоты\_L

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIKFNNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVDP  
RFGSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCSSWDDDDARGTIFGGGTKLTVL [SEQ ID NO.  
7]

&gt;F2\_нуклеотиды\_L

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
AGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
AGGATGAGGCTGATTATTACTGTTCTTCTTGGGATGATGATGCTCGTGGAAGTATTTTCGG  
CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 65]

**Фигура 4 (продолж.)**

**G1 Клон**

&gt;G1\_аминокислоты\_L

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIKFNNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD  
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDVYYGTIFGGGTKLTVL [SEQ ID NO.  
8]

&gt;G1\_нуклеотиды\_L

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
AGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
AGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCTGCTTGGGATGATGTTTATTATGGAACATTTTCGG  
CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 66]

**G2 Клон**

&gt;G2\_аминокислоты\_L

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIKFNNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD  
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCASWDDSLYGTVFVGGGTKLTVL [SEQ ID NO.  
9]

&gt;G2\_нуклеотиды\_L

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
AGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
AGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCTTCTTGGGATGATTCTCTTTATGGAACGTGTTTCGG  
CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 67]

**Фигура 4 (продолж.)**

21/54

**G10 Клон**

&gt;G10\_аминокислоты\_L

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD  
 RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAWDDAYYGTFGGGTKLTVL [SEQ ID NO.  
 10]

&gt;G10\_нуклеотиды\_L

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
 CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
 AGGAACGGCCCCCAAACCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
 CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
 AGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCTGCTTGGGATGATGCTTATTATGGAACATTTTCGG  
 CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 68]

**H4 Клон**

&gt;H4\_аминокислоты\_L

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIKFNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD  
 RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCASWDDVYRGTVFGGGTKLTVL [SEQ ID NO.  
 11]

&gt;H4\_нуклеотиды\_L

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
 CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
 AGGAACGGCCCCCAAACCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
 CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
 AGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCTTCTTGGGATGATGTTTATCGTGGAACATGTTTCGG  
 CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 69]

**Фигура 4 (продолж.)**

22/54

Кодон-оптимизированный клон Н4 (без модификаций аминокислотной последовательности)

&gt;Н4\_оптимизированные\_нуклеотиды\_L

CAGAGCGTCCTGACACAGCCCCCAAGCGCAAGCGGAACCCCGGCCAGCGAGTGACCATTA  
 GTTGTAGTGGAAGTAGTAGTAACATCAAGTTCAACTCCGTGAATTGGTATCAGCAGCTGCC  
 CGGAAGTCTCCTAAAGTCTGATCTATTCTAACAATCAGCGACCAAGTGGCGTCCCGGAC  
 CGGTTCAGCGGCTCCAAGTCTGGGACCAGTGCCTCACTGGCTATTAGCGGGCTCCAGTCCG  
 AGGACGAAGCAGATTACTATTGCGCCAGCTGGGACGATGTGTACAGGGGCACCGTCTTCGG  
 CGGGGGAACAAAAGTACCGTCCTG [SEQ ID NO. 70]

Н9 Клон

&gt;Н9\_аминокислоты\_L

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIFNSVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD  
 RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCSSWDDSLYGTIFGGGTKLTVL [SEQ ID NO.  
 12]

&gt;Н9\_нуклеотиды\_L

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCAGCGTCCGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
 CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCAAATTTAACAGTGTTAACTGGTATCAGCAACTCCC  
 AGGAACGGCCCCCAAAGTCTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGAC  
 CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACTTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTG  
 AGGATGAGGCTGATTATTACTGTTCTTCTTGGGATGATTCTCTTTATGGAAGTATTTTCGG  
 CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTG [SEQ ID NO. 71]

Фигура 4 (продолж.)

**Вариабельные области тяжелой цепи****A3 Клон****>A3\_аминокислоты\_Н**

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYA  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGKDNHWGQGT TVTVSS  
 [SEQ ID NO. 13]

**>A3\_нуклеотиды\_Н**

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
 AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCA  
 GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
 AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATCTTGGTGC  
 TGGTCCTTATTATTATGGTAAGGATCATTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 72]

**A10 Клон****>A10\_аминокислоты\_Н**

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYA  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGKDVWGQGT TVTVSS  
 [SEQ ID NO. 14]

**>A10\_нуклеотиды\_Н**

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
 AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCA  
 GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
 AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATCTTGGTGC  
 TGGTCCTTATTATTATGGTAAGGATGTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 73]

**Фигура 4 (продолж.)**



24/54

**Кодон-оптимизированный клон A10 (индуцированные модификации в аминокислотной последовательности)**

&gt;A10\_оптимизированные\_аминокислоты\_Н

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYA  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGKDVWGQGTTVTVSS  
 [SEQ ID NO. 74]

&gt;A10\_оптимизированные\_нуклеотиды\_Н

CAGGTGCAGCTGGTTCGAATCCGGGGGGGGGGTGGTGCAGCCTGGACGGTCACTGAGACTGA  
 GTTGTGCCGCTCTGGGTTTACTTTCAGCTCCTATGGCATGCACTGGGTGAGGCAGGCTCC  
 CGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTCATCTCTTACGACGGCAGTAACAAGTACTATGCC  
 GATAGCGTCAAAGGGCGGTTCACTATTTCAAGAGACAACAGCAAAAATACCCTGTACCTCC  
 AGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGACACAGCTGTGTACTATTGCGCATCTGATCTGGGAGC  
 CGGCCCTTACTATTACGGCAAGGATGTCTGGGGGCAGGGAACACAGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 75]

**B6 Клон**

&gt;B6\_аминокислоты\_Н

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYA  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDYGAGPYYYGMDVWGQGTTVTVSS  
 [SEQ ID NO. 15]

&gt;B6\_нуклеотиды\_Н

CAGGTCCAGCTGGTAGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
 AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCA  
 GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
 AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATTATGGTGC  
 TGGTCTTATTATTATGGTATGGATGTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 76]

**Фигура 4 (продолж.)**

25/54

Кодон-оптимизированный клон В6 (без модификаций в аминокислотной последовательности)

&gt;В6\_оптимизированные\_нуклеотиды\_Н

CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGGGGGGCGTGGTGCAGCCTGGAAGGTCACTGAGACTGT  
 CTTGTGCCGCATCTGGGTTTACATTTAGCTCCTATGGCATGCACTGGGTGAGGCAGGCTCC  
 CGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTCATCTCTTACGACGGCAGTAACAAGTACTATGCC  
 GATAGCGTCAAAGGGCGGTTCACTATTTCAAGAGACAACAGCAAAAATACCCTGTACCTCC  
 AGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGACACAGCTGTGTACTATTGCGCATCTGATTACGGAGC  
 CGGCCCTTACTATTACGGCATGGATGTCTGGGGGCAGGGAACCACAGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 77]

С4 Клон

&gt;С4\_аминокислоты\_Н

QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYA  
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGLDVWGQGTTVTVSS  
 [SEQ ID NO. 16]

&gt;С4\_нуклеотиды\_Н

CAGGTCCAGCTGGTAGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
 AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCA  
 GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
 AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATCTTGGTGC  
 TGGTCCCTTATTATTATGTTTGGATGTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 78]

Кодон-оптимизированный клон С4 (без модификаций в аминокислотной последовательности)

&gt;С4\_оптимизированные\_нуклеотиды\_Н

CAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGGGGGGGGTCGTGCAGCCCGGACGGTCACTGAGACTGT  
 CATGTGCCGCTTCAGGGTTTACTTTTAGCTCCTATGGCATGCACTGGGTGAGGCAGGCTCC  
 CGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTCATCTCTTACGACGGCAGTAACAAGTACTATGCC  
 GATAGCGTCAAAGGGCGGTTCACTATTTCAAGAGACAACAGCAAAAATACCCTGTACCTCC  
 AGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGACACAGCTGTGTACTATTGCGCATCTGATCTGGGAGC  
 CGGCCCTTACTATTACGGCCTGGATGTCTGGGGGCAGGGAACCACAGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 79]

Фигура 4 (продолж.)

**D4 Клон**

&gt;D4\_аминокислоты\_Н

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYA  
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGMDVWGQGTTVTVSS  
[SEQ ID NO. 17]

&gt;D4\_нуклеотиды\_Н

CAGGTCCAGCTGGTAGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCA  
GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATCTTGGTGC  
TGGTCCTTATTATTATGGTATGGATGTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
[SEQ ID NO. 80]

**E1 Клон**

&gt;E1\_аминокислоты\_Н

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYA  
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGMDVWGQGTTVTVSS  
[SEQ ID NO. 18]

&gt;E1\_нуклеотиды\_Н

CAGGTCCAGCTGGTAGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCA  
GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATCTTGGTGC  
TGGTCCTTATTATTATGGTATGGATGTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
[SEQ ID NO. 81]

**Фигура 4 (продолж.)**

27/54

F2 Клон

&gt;F2\_аминокислоты\_Н

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYA  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGMDVWGQGTTVTVSS  
 [SEQ ID NO. 19]

&gt;F2\_нуклеотиды\_Н

CAGGTCCAGCTGGTAGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
 AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAACTACTACGCA  
 GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
 AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATCTTGGTGC  
 TGGTCCTTATTATTATGGTATGGATGTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 82]

G1 Клон

&gt;G1\_аминокислоты\_Н

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYA  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGMDVWGQGTTVTVSS  
 [SEQ ID NO. 20]

&gt;G1\_нуклеотиды\_Н

CAGGTCCAGCTGGTAGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
 AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAACTACTACGCA  
 GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
 AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATCTTGGTGC  
 TGGTCCTTATTATTATGGTATGGATGTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 83]

Фигура 4 (продолж.)

28/54

**G2 Клон**

&gt;G2\_аминокислоты\_Н

QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTTFSSYGMHVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYA  
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGMDVWGQGTITVTVSS  
[SEQ ID NO. 21]

&gt;G2\_нуклеотиды\_Н

CAGGTCCAGCTGGTAGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCA  
GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATCTTGGTGC  
TGGTCCCTTATTATTATGGTATGGATGTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
[SEQ ID NO. 84]

**G10 Клон**

&gt;G10\_аминокислоты\_Н

QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTTFSSYGMHVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYA  
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDYGAGPYYYGMDVWGQGTITVTVSS  
[SEQ ID NO. 22]

&gt;G10\_нуклеотиды\_Н

CAGGTCCAGCTGGTAGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCA  
GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATATGGTGC  
TGGTCCCTTATTATTATGGTATGGATGTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
[SEQ ID NO. 85]

**Фигура 4 (продолж.)**

29/54

**Н4 Клон**

&gt;Н4\_аминокислоты\_Н

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYA  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDLGSGYYLYGMDVWGQGTTVTVSS  
 [SEQ ID NO. 23]

&gt;Н4\_нуклеотиды\_Н

CAGGTCCAGCTGGTAGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
 AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCA  
 GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
 AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATCTTGGTTC  
 TGGTTATTATCTTTATGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 86]

**Кодон-оптимизированный клон Н4 (без модификаций аминокислотной последовательности)**

&gt;Н4\_оптимизированные\_нуклеотиды\_Н

CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGGGGGGGGTGGTGCAGCCTGGACGGTCACTGAGACTGA  
 GTTGCGCCCATCTGGATTACATTTAGCTCCTACGGCATGCACTGGGTGAGGCAGGCACC  
 CGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTCATCTCTTATGACGGCAGTAACAAGTACTATGCT  
 GATAGCGTCAAAGGGCGGTTCACTATTTCAAGAGACAACAGCAAAAATACCCTGTACCTCC  
 AGATGAATAGCCTGCGGGCCGAAGACACAGCTGTGTACTATTGCGCCTCCGATCTGGGATC  
 TGGCTACTATCTGTATGGCATGGATGTCTGGGGGCAGGGAACCACAGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 87]

**Н9 Клон**

&gt;Н9\_аминокислоты\_Н

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYA  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDLGAGPYYYGMDVWGQGTTVTVSS  
 [SEQ ID NO. 24]

&gt;Н9\_нуклеотиды\_Н

CAGGTCCAGCTGGTAGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGCGGTCCCTGAGACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC  
 AGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCA  
 GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
 AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGTGATCTTGGTGC  
 TGGTCCTTATTATTATGGTATGGATGTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC  
 [SEQ ID NO. 88]

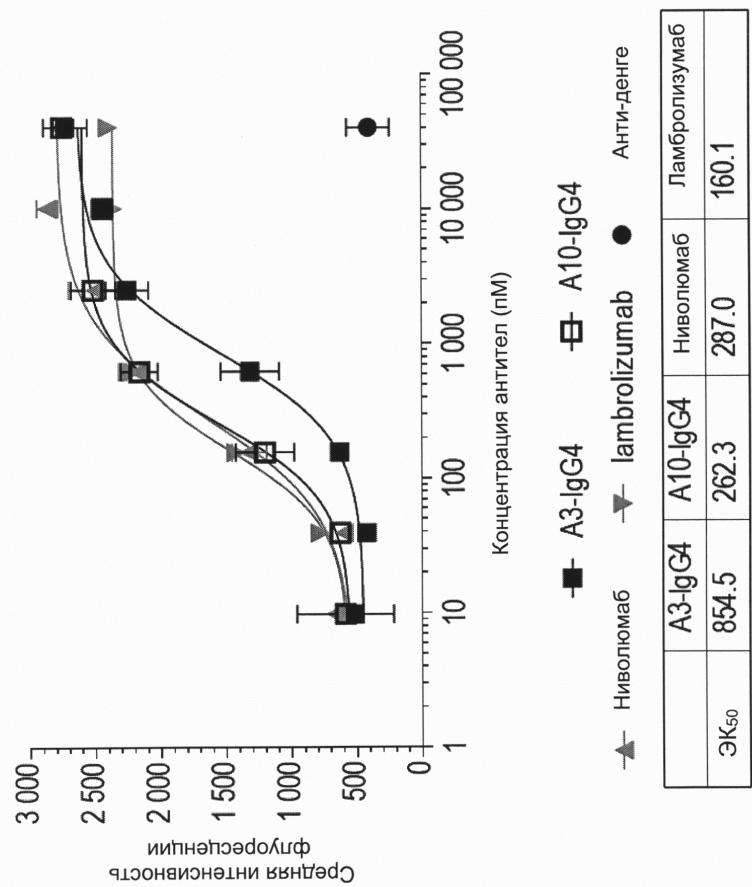
**Фигура 4 (продолж.)**

30/54

Аффинность

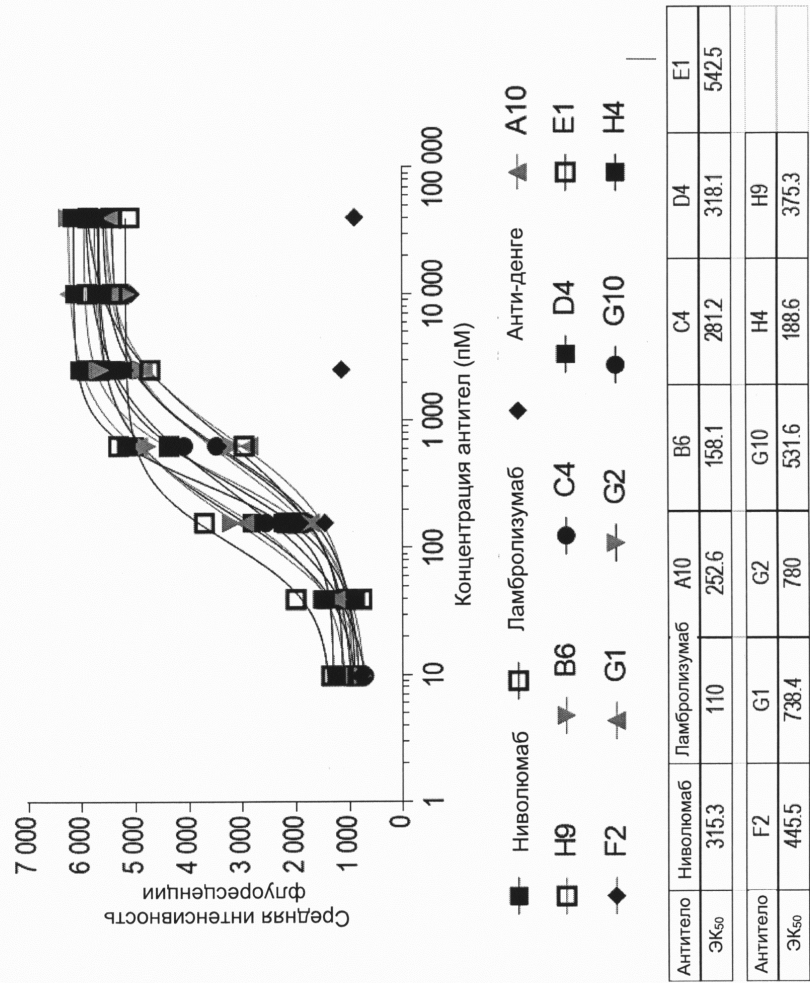
	К <sub>D</sub> (нМ)
<b>A3</b>	0.20
<b>A10</b>	0.08
<b>B6</b>	0.26
<b>C4</b>	0.40
<b>D4</b>	0.22
<b>E1</b>	0.21
<b>F2</b>	0.11
<b>G1</b>	0.10
<b>G2</b>	0.10
<b>G10</b>	0.27
<b>H4</b>	0.27
<b>H9</b>	Не опред.
Ниволюмаб	1.9
Ламбролизумаб	0.5

Фигура 5

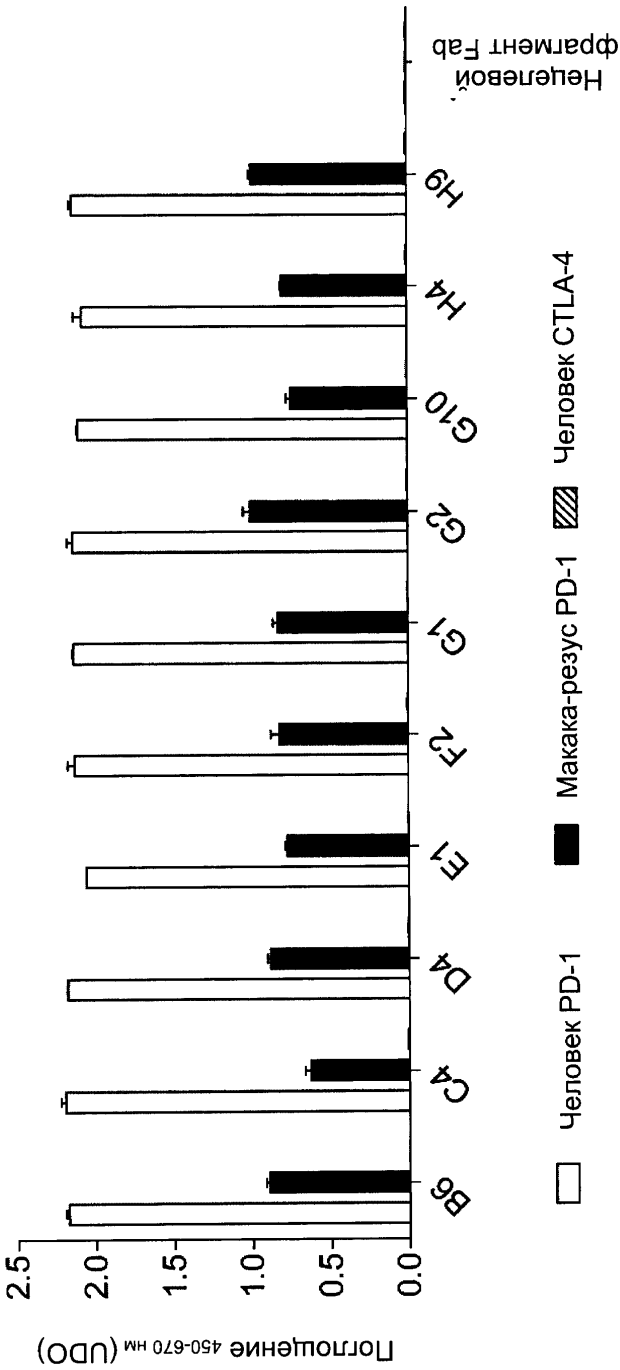


Фигура 6

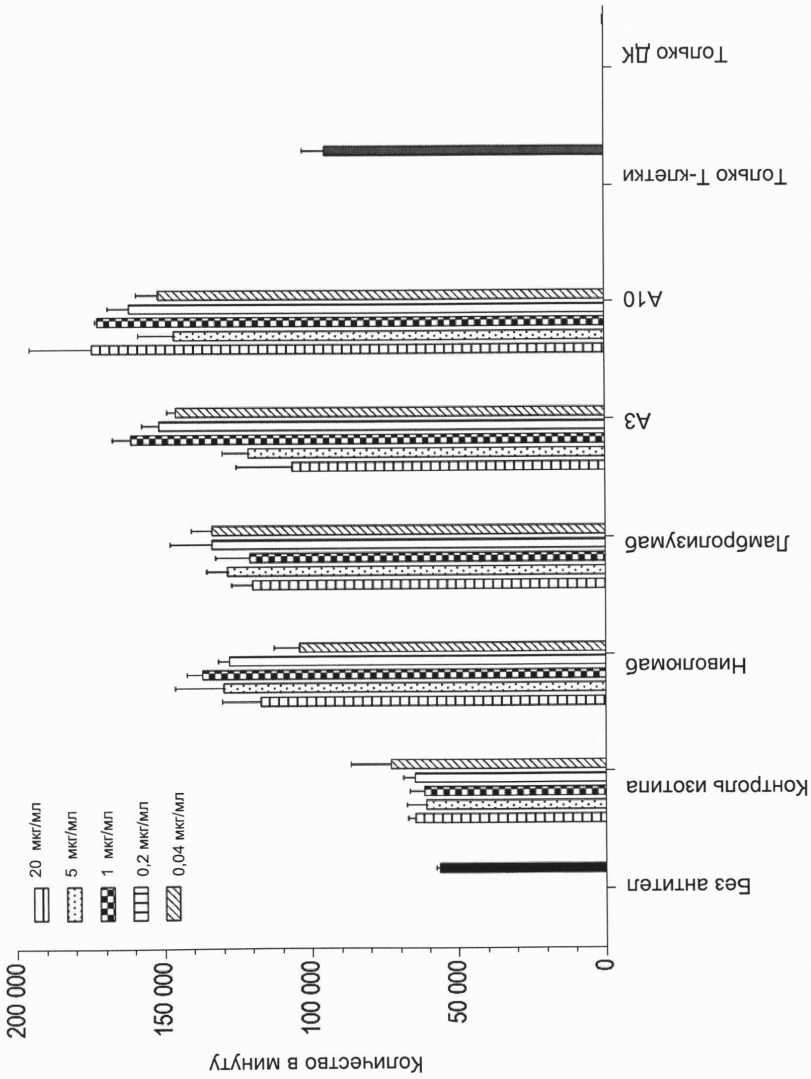




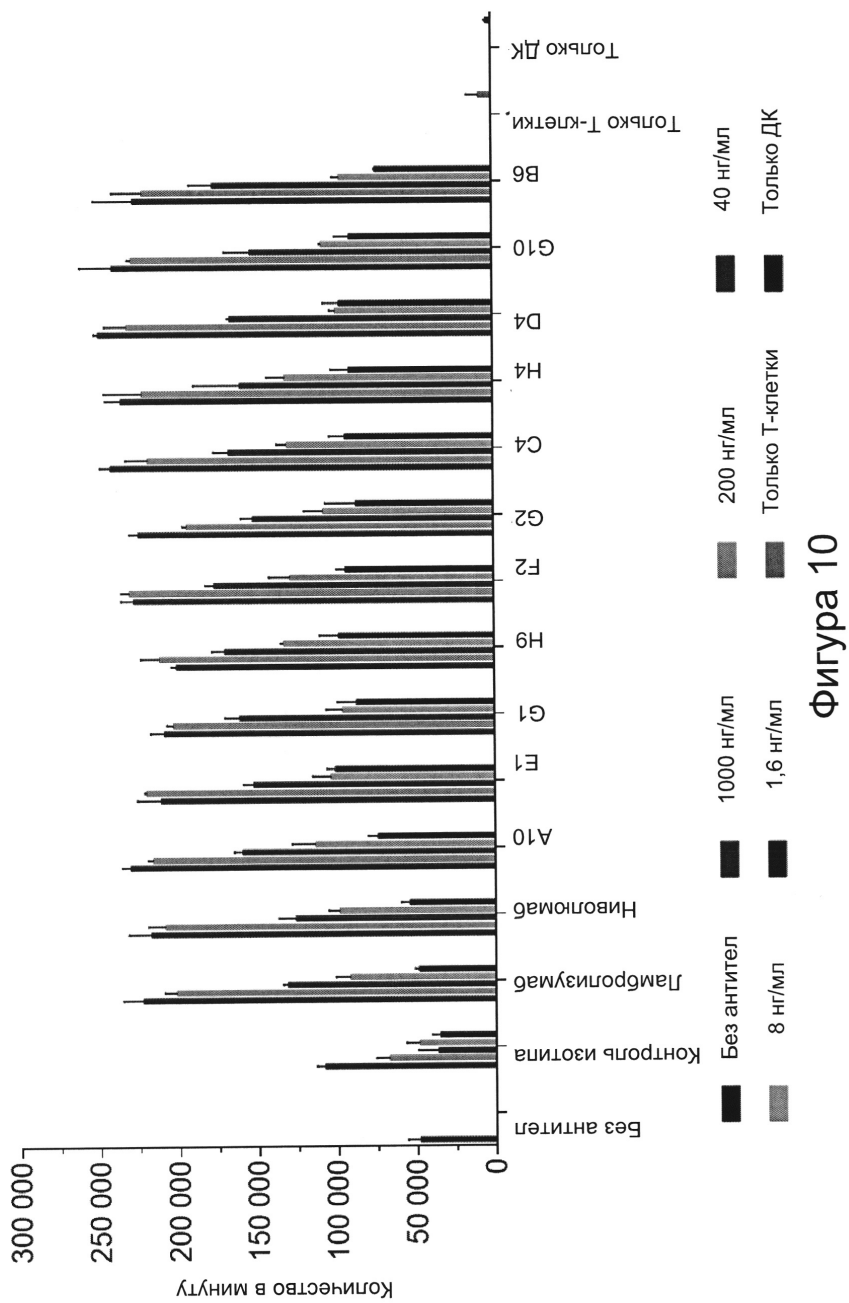
Фигура 7

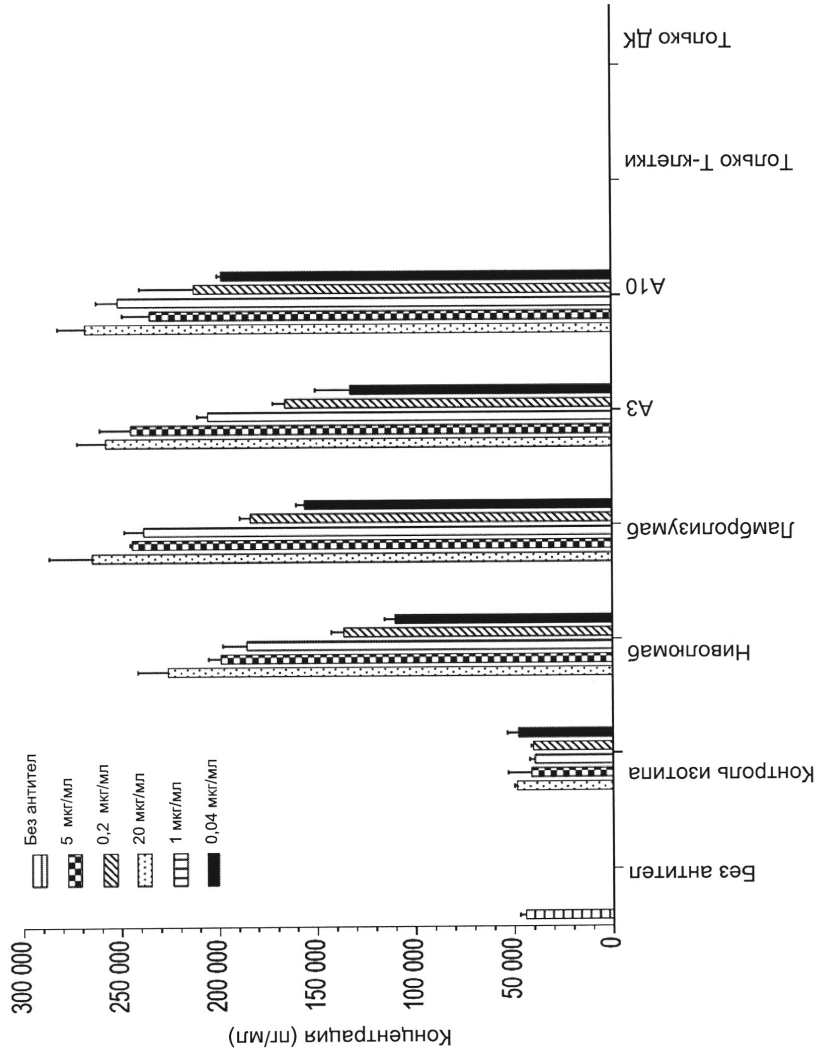


Фигура 8



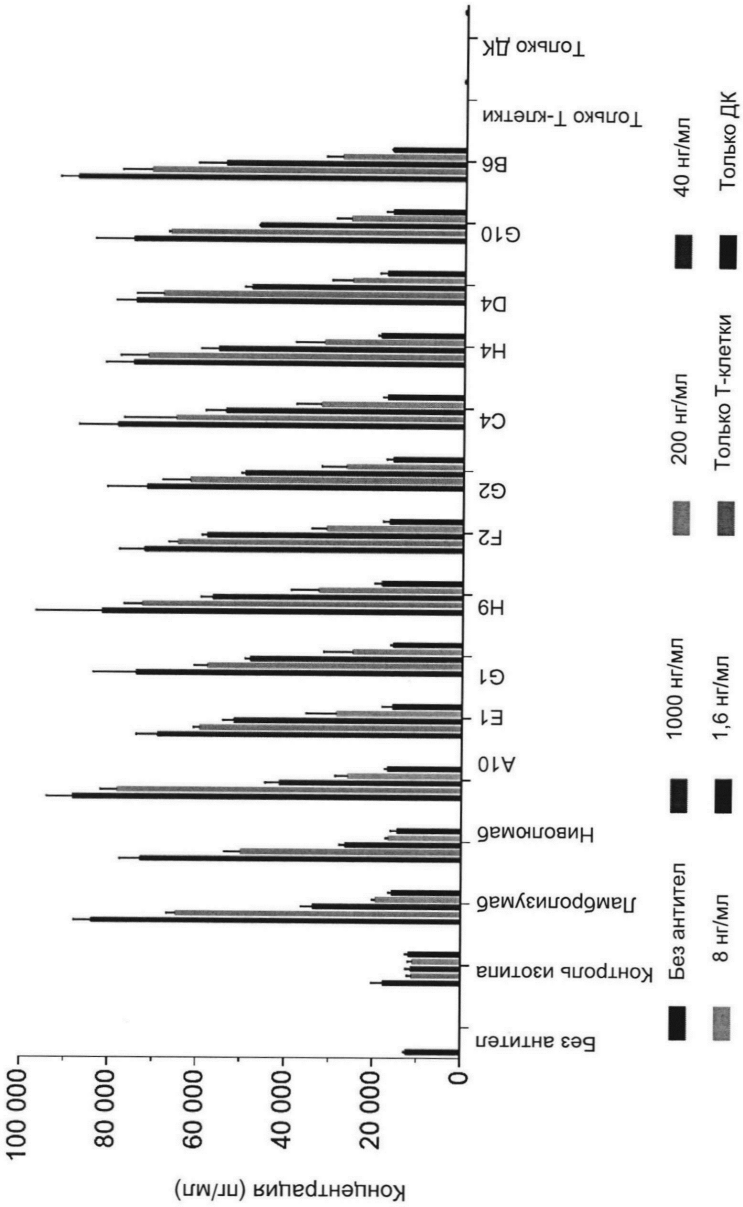
ФИГУРА 9



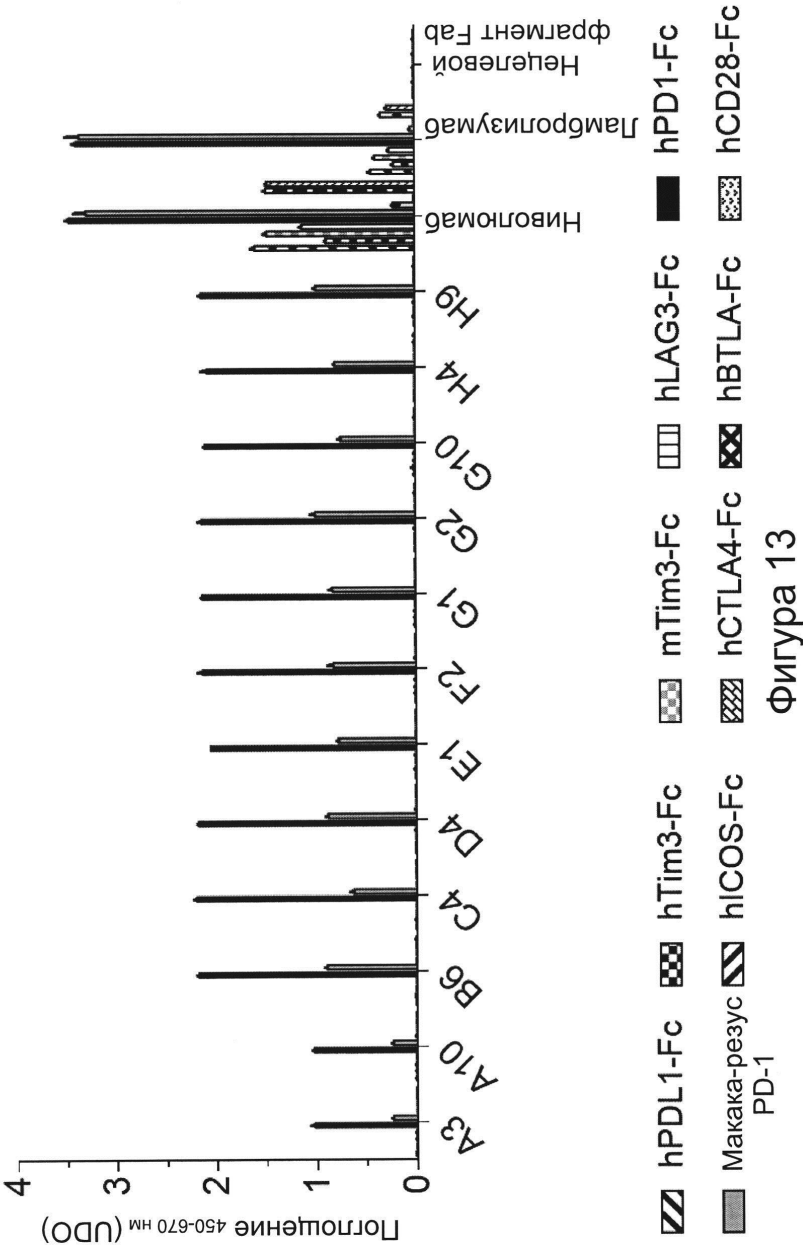


Фигура 11

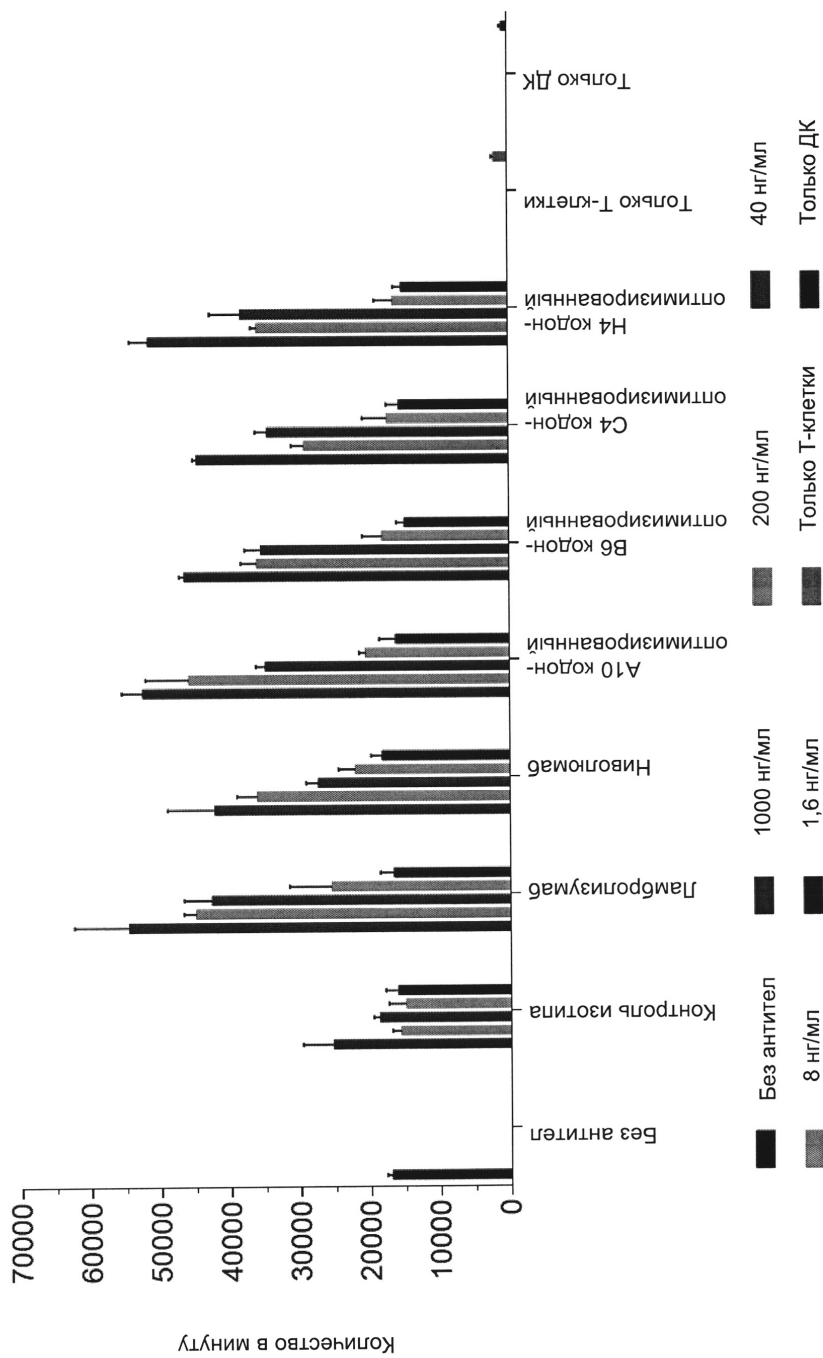
37/54



Фигура 12

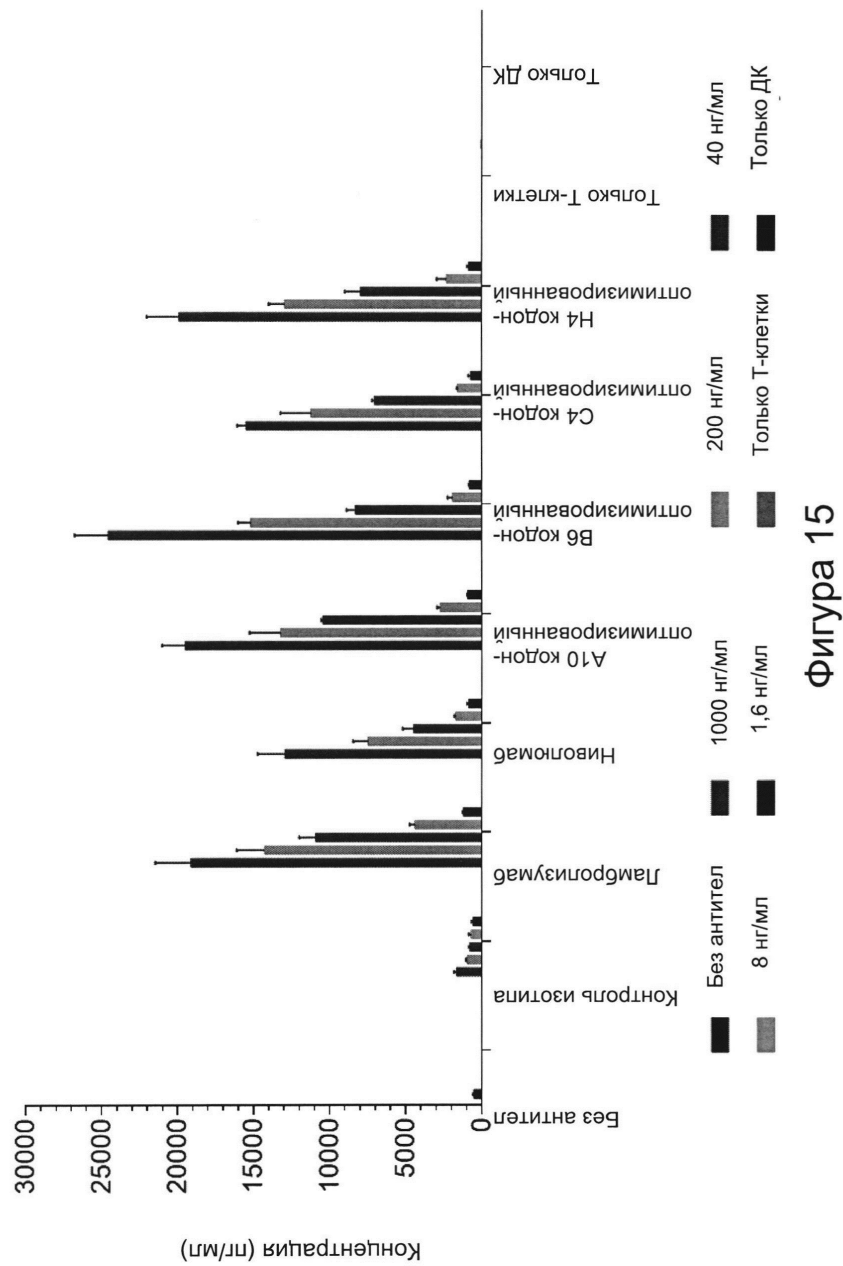


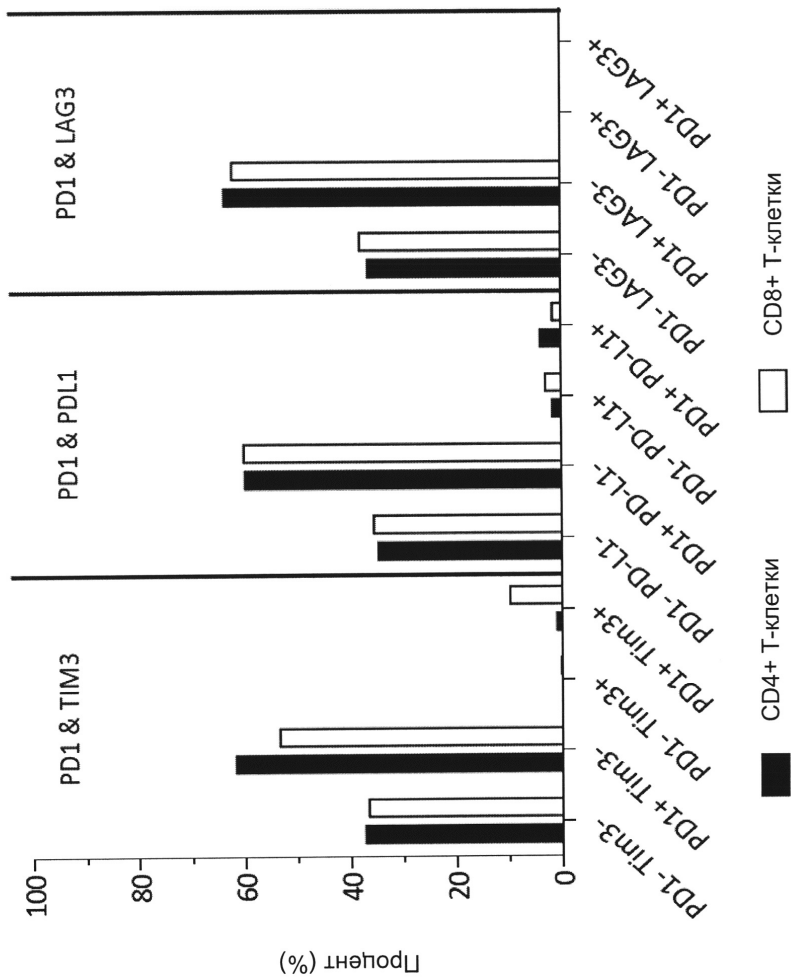
39/54



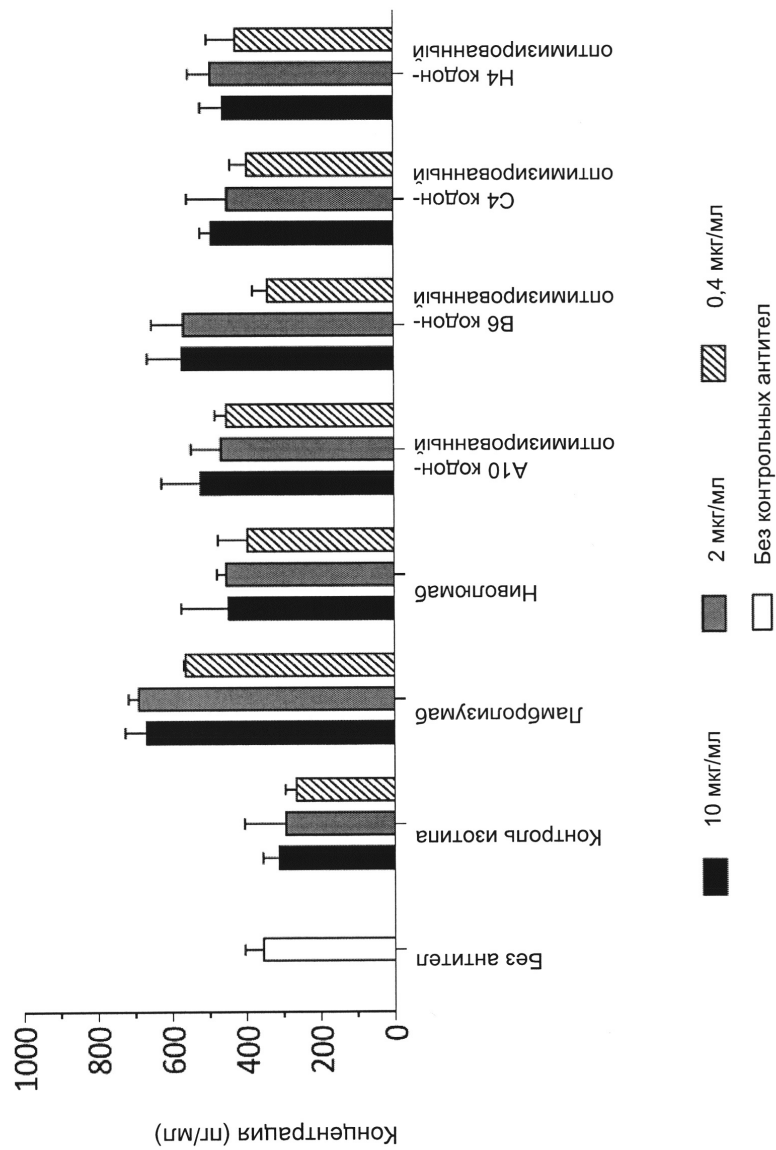
Фигура 14



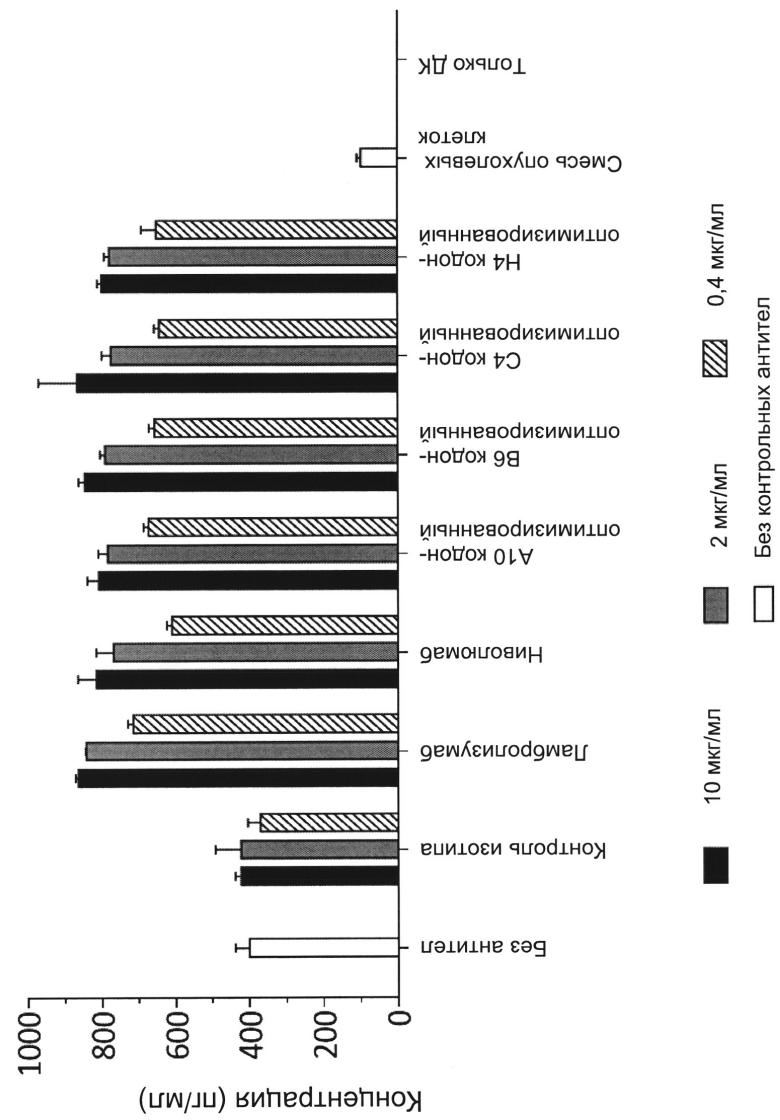




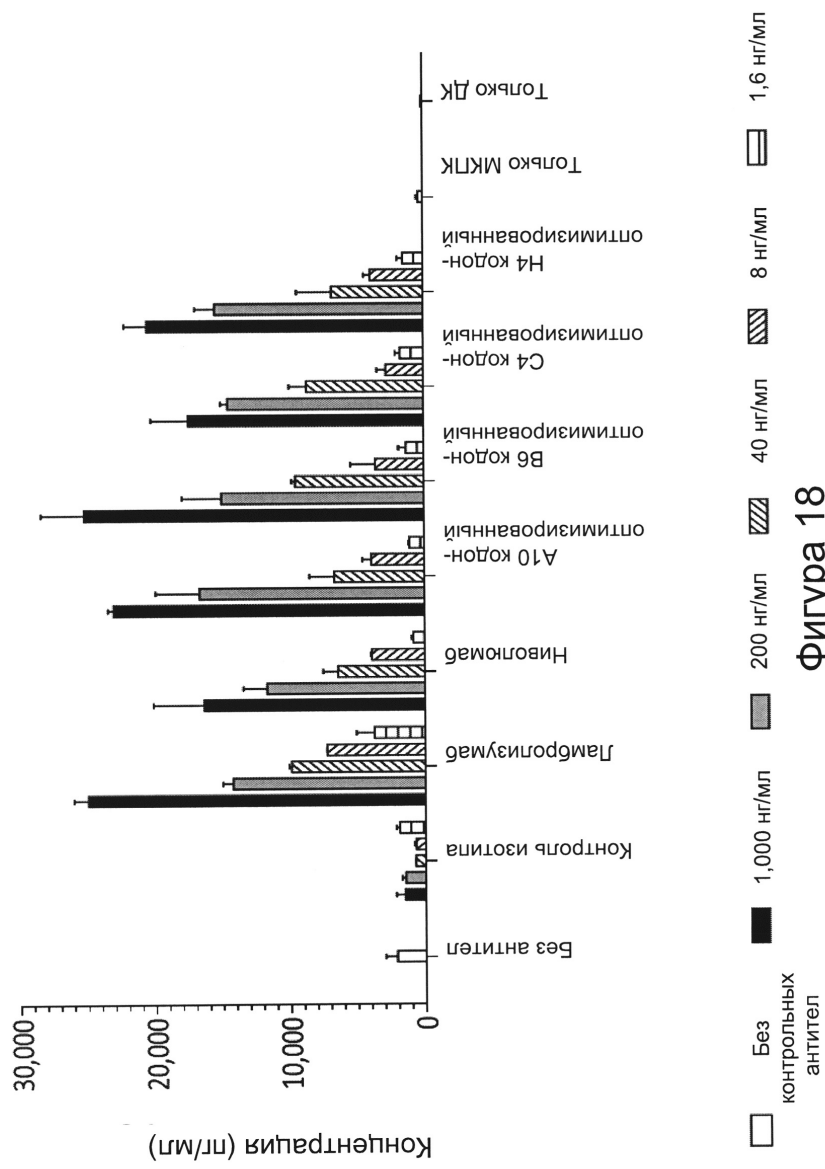
Фигура 16

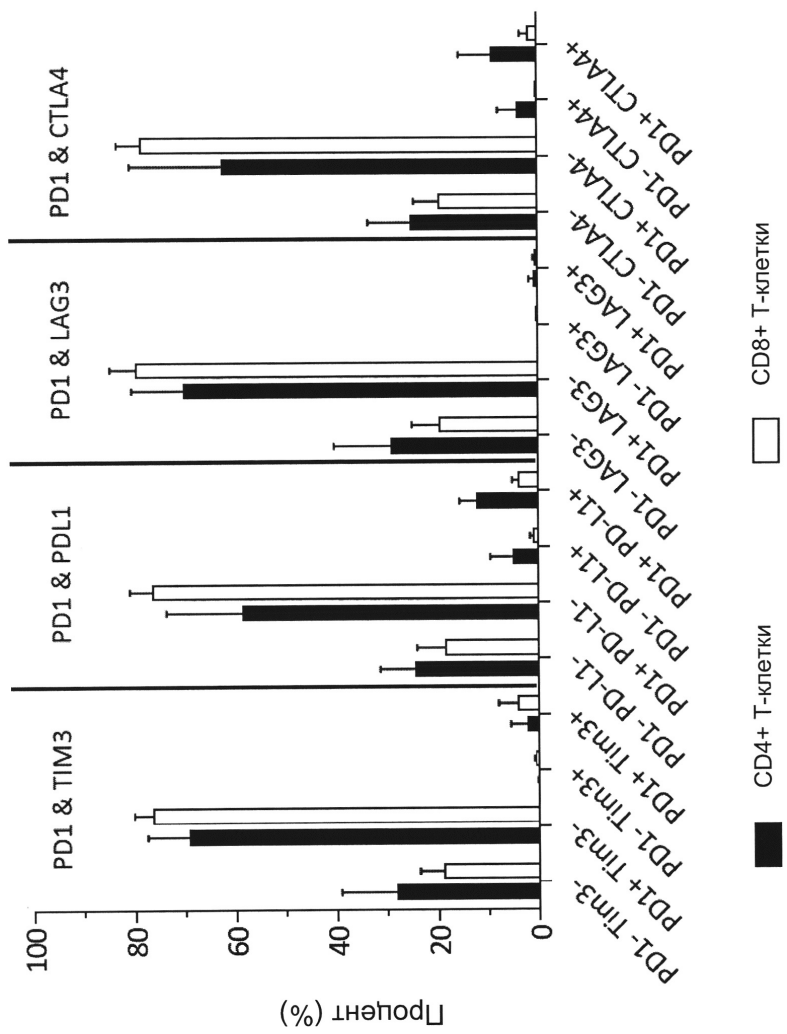


Фигура 17А



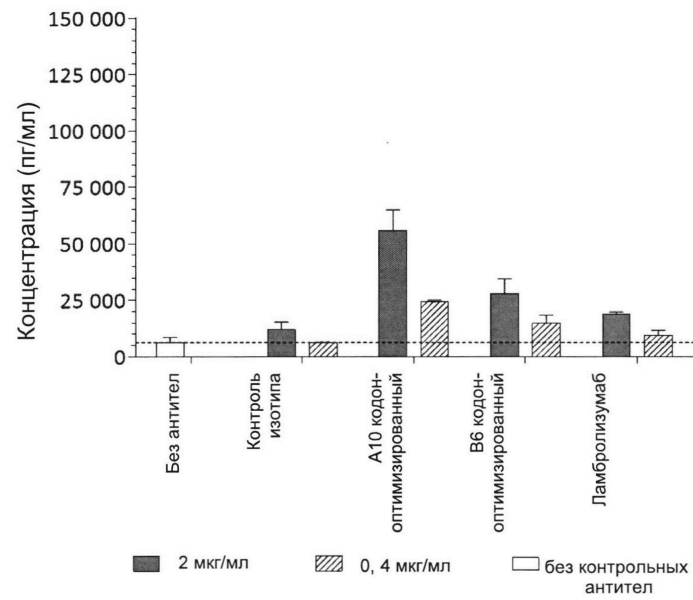
Фигура 17В



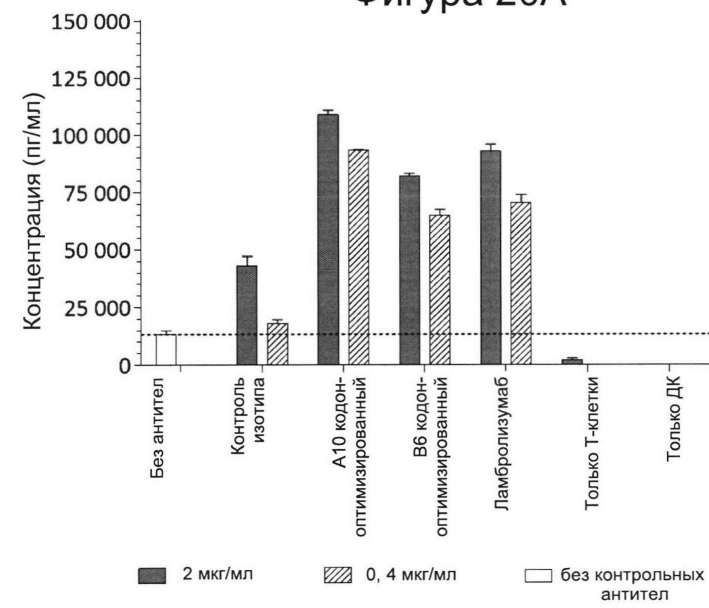


Фигура 19

46/54

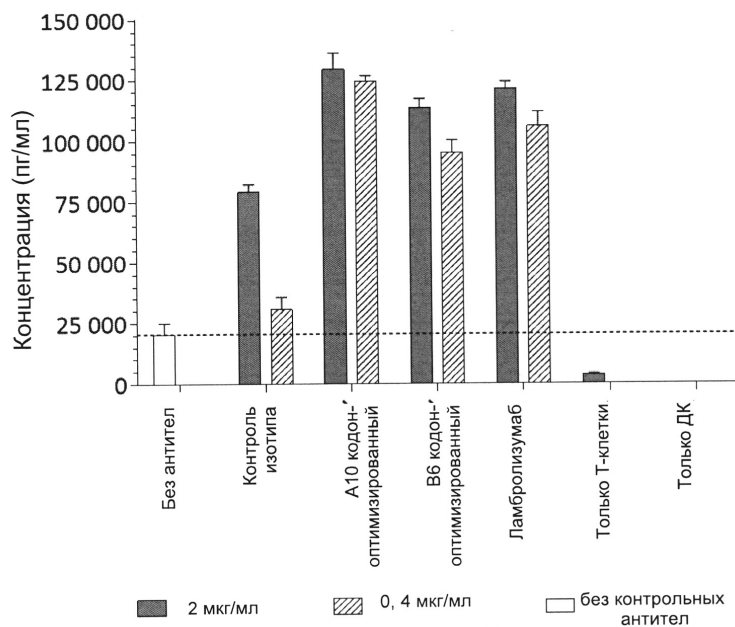


Фигура 20А



Фигура 20В

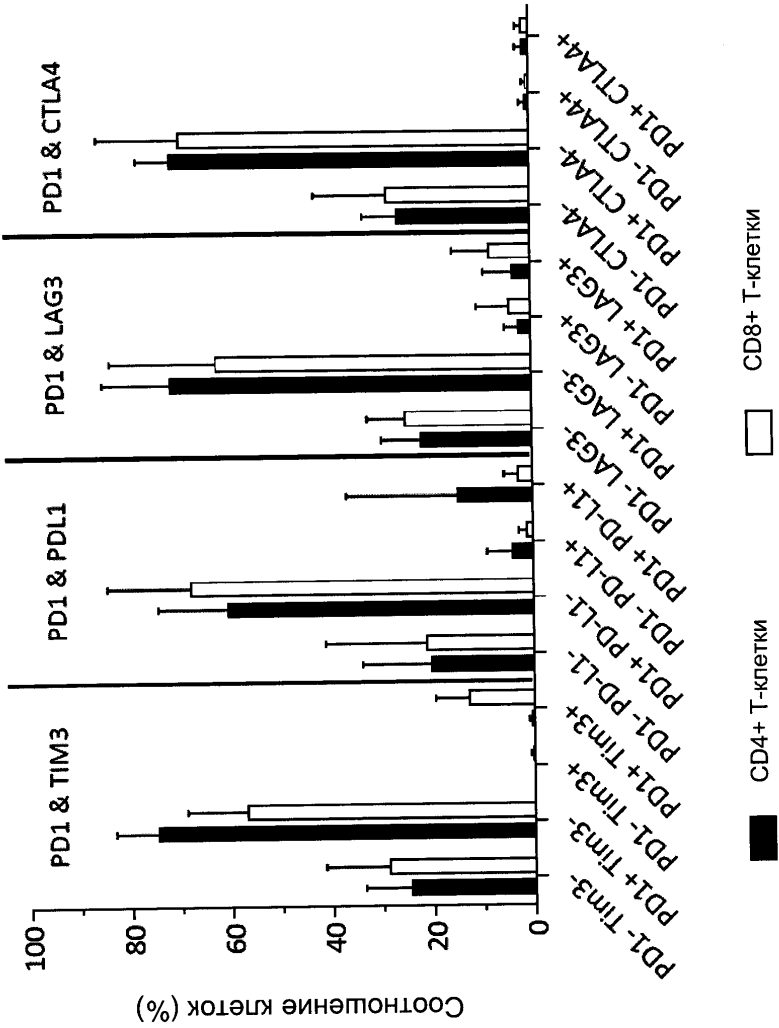
47/54



Фигура 20С

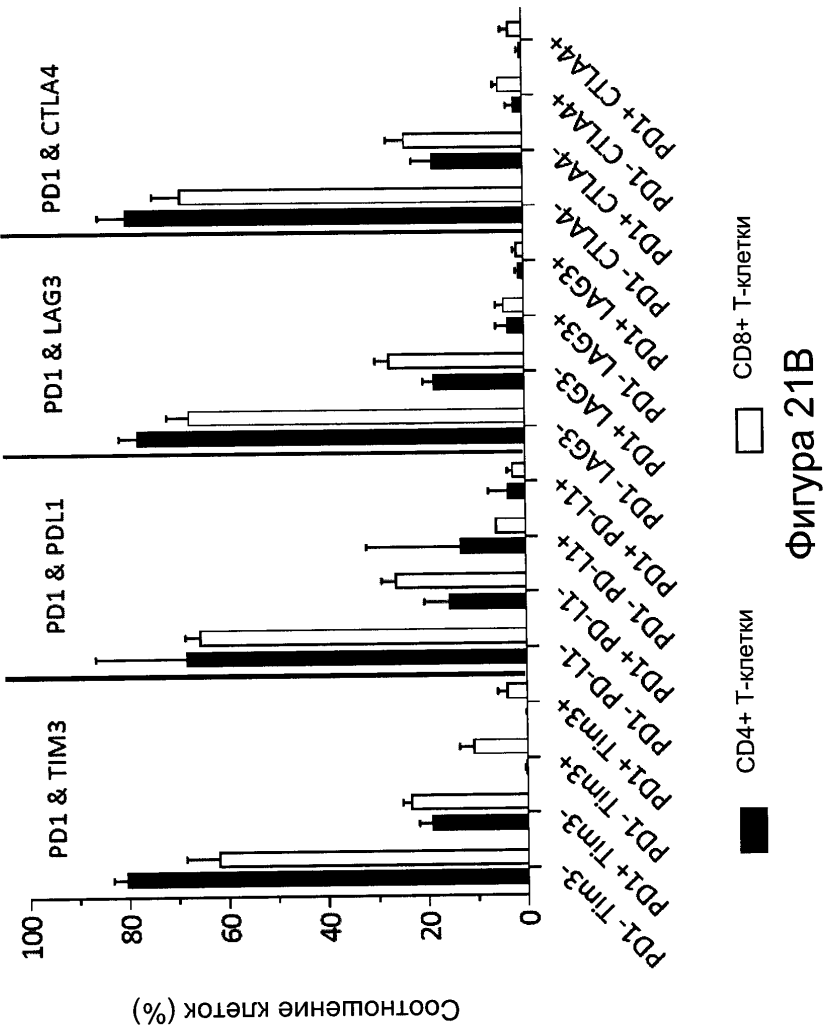


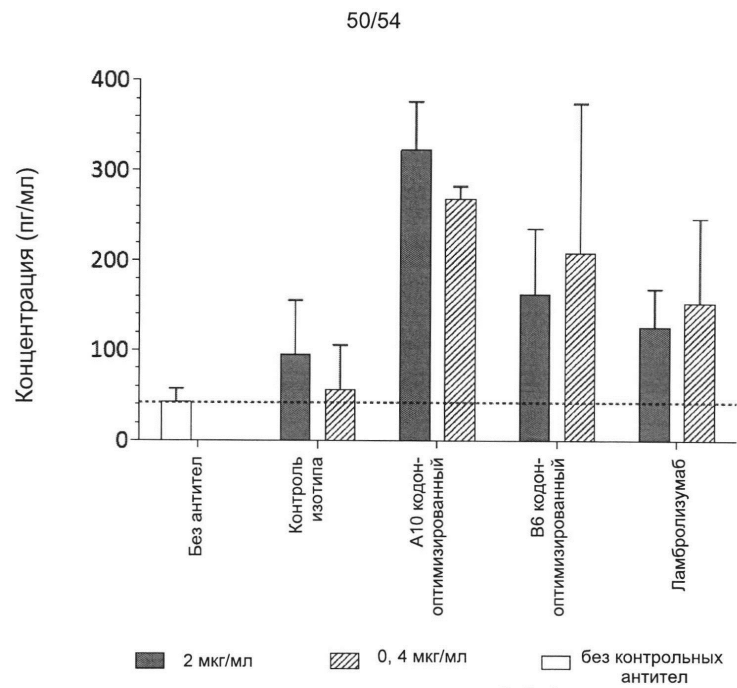
48/54



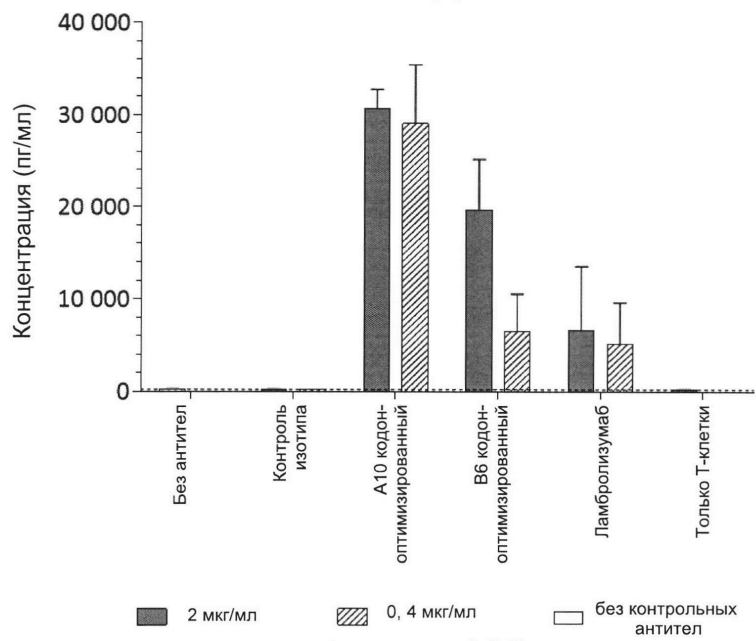
Фигура 21А

49/54



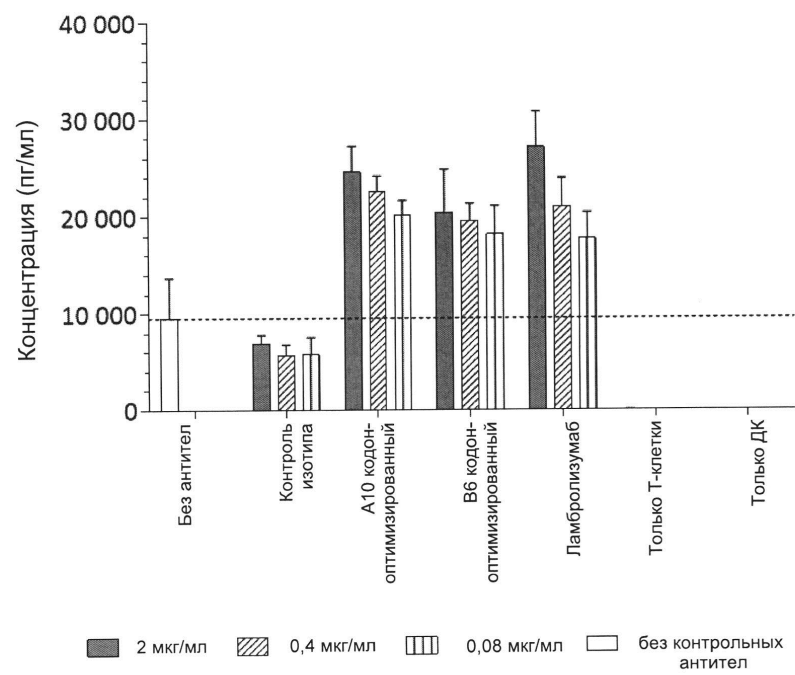


Фигура 22А

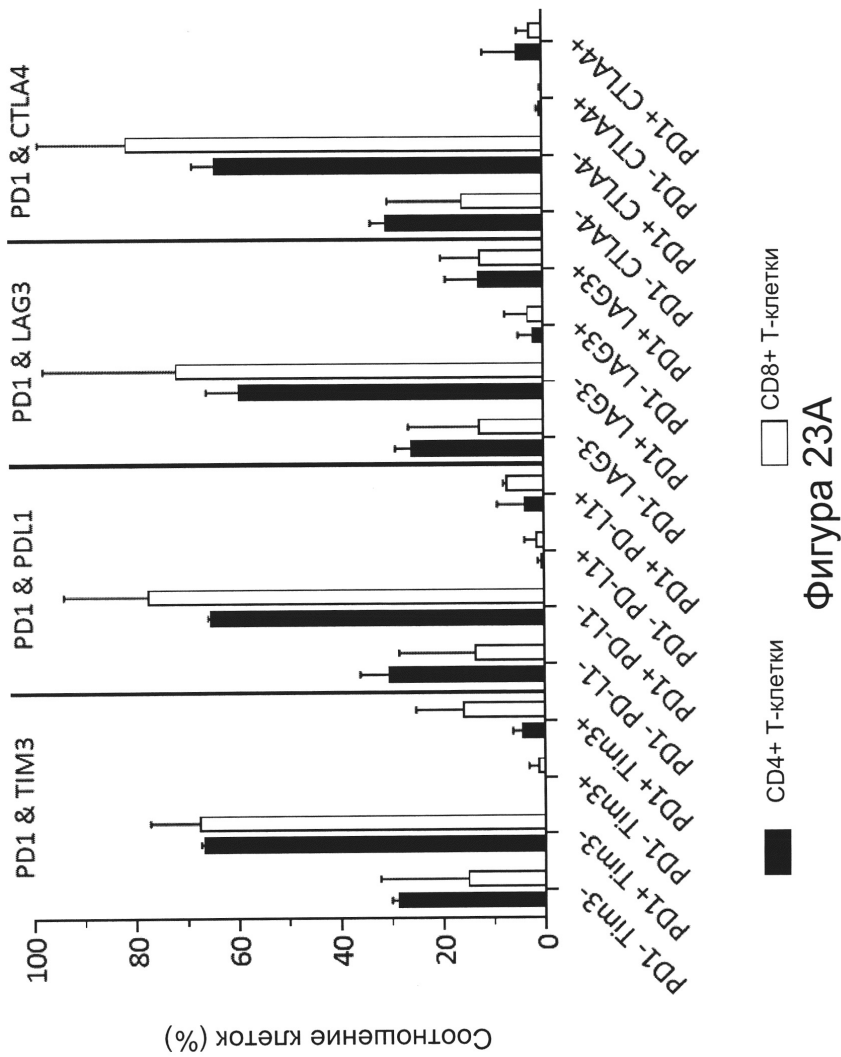


Фигура 22В

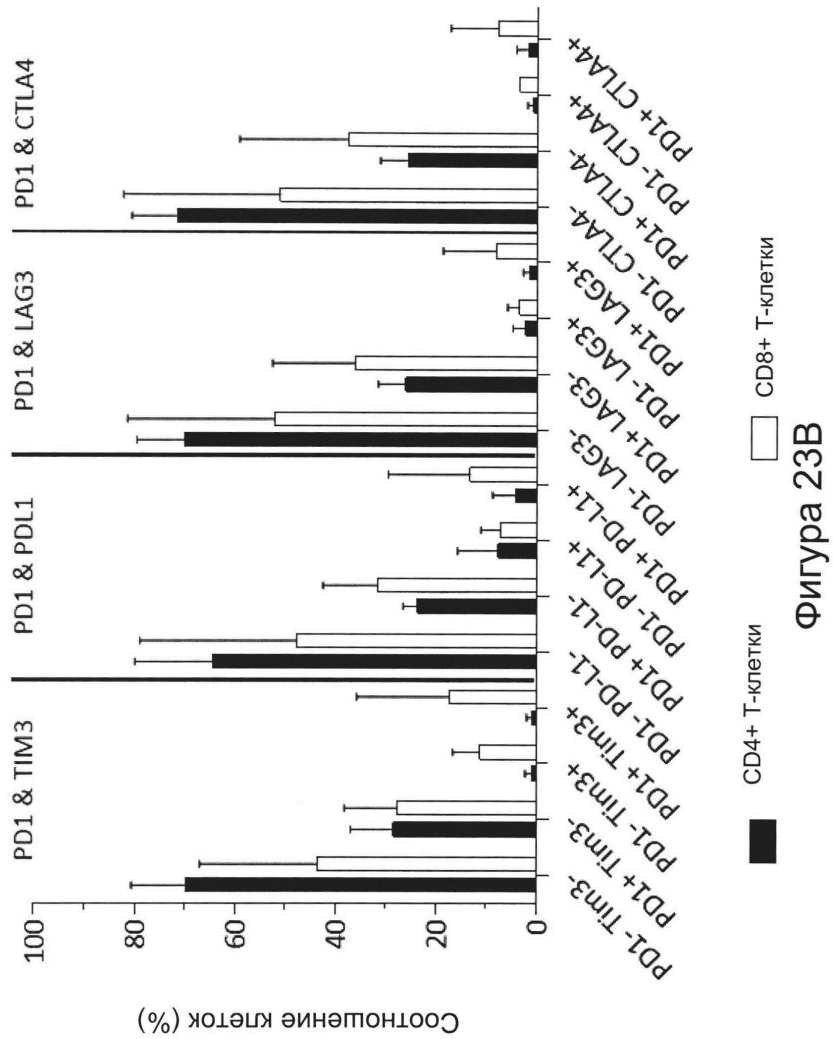
51/54



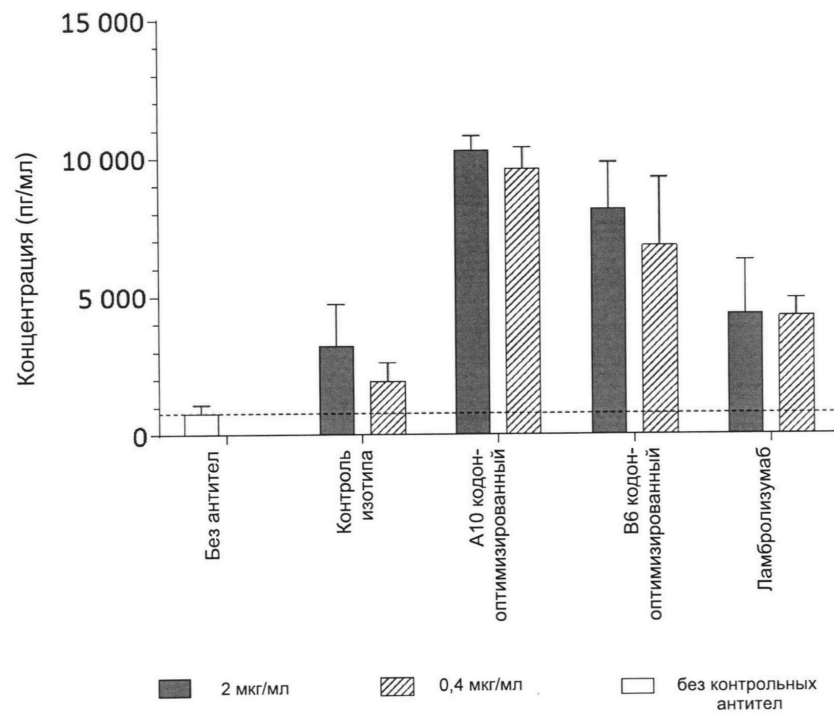
Фигура 22С



Фигура 23А



54/54



Фигура 24