



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/2818 (2021.02); A61K 39/39533 (2021.02); A61P 35/00 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2018115979, 30.09.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
30.09.2016

Дата регистрации:  
01.07.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
02.10.2015 US 62/236,341

(45) Опубликовано: 01.07.2021 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 03.05.2018

(86) Заявка РСТ:  
EP 2016/073421 (30.09.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2017/055547 (06.04.2017)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
"Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ГАЛЛЕР Гунтер (DK),  
ГАД Моника (DK),  
КОФОД Клаус (DK),  
ХОРАК Иван Д. (US),  
БУКЕН Томас (DK),  
КРАГХ Михаэль (DK),  
ПЕДЕРСЕН Миккель (DK)

(73) Патентообладатель(и):  
СИМФОГЕН А/С (DK)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: CHANGYU WANG et al., In Vitro  
Characterization of the Anti-PD-1 Antibody  
Nivolumab, BMS-936558, and In Vivo Toxicology  
in Non-Human Primates, Cancer Immunol Res,  
2014, Vol.2, N.9, pp.846-856. US2011229461 A1,  
22.09.2011. US2014328833 A1, 06.11.2014.  
US2015203579 A1, 23.07.2015. RU2563346 C2,  
20.09.2015.

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1 И КОМПОЗИЦИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к антителу, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащей его фармацевтической композиции, а также к способу получения указанного антитела и его фрагмента. Также раскрыта выделенная молекула нуклеиновой кислоты для получения антитела

или антигенсвязывающей части, а также содержащие ее вектор и клетка-хозяин. Изобретение также относится к способу повышения иммунитета у пациента с использованием вышеуказанного антитела или его фрагмента. Изобретение эффективно для лечения рака у пациента. 13 н. и 17 з.п. ф-лы, 14 табл., 13 пр., 11 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*C07K 16/28* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 16/2818* (2021.02); *A61K 39/39533* (2021.02); *A61P 35/00* (2021.02)(21)(22) Application: **2018115979, 30.09.2016**(24) Effective date for property rights:  
**30.09.2016**Registration date:  
**01.07.2021**

Priority:

(30) Convention priority:  
**02.10.2015 US 62/236,341**(45) Date of publication: **01.07.2021 Bull. № 19**(85) Commencement of national phase: **03.05.2018**(86) PCT application:  
**EP 2016/073421 (30.09.2016)**(87) PCT publication:  
**WO 2017/055547 (06.04.2017)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO  
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**GALLER Gunther (DK),  
GAD Monika (DK),  
KOEFOED Klaus (DK),  
HORAK Ivan D. (US),  
BOUQUIN Thomas (DK),  
KRAGH Michael (DK),  
PEDERSEN Mikkel (DK)**

(73) Proprietor(s):

**SYMPHOGEN A/S (DK)**(54) **ANTIBODIES TO PD-1 AND COMPOSITIONS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, in particular to an antibody that specifically binds to PD-1, or its antigen-binding fragment, a pharmaceutical composition containing it, as well as to a method for obtaining this antibody and its fragment. Also disclosed is the isolated nucleic acid molecule for the production of an antibody or antigen-

binding part, as well as the vector and host cell containing it. The invention also relates to a method for increasing the immunity of a patient using the above antibody or its fragment.

EFFECT: invention is effective for the treatment of cancer in a patient.

30 cl, 11 dwg, 14 tbl, 13 ex

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет заявки на патент США 62/236,341, поданной 2 октября 2015 года, описание которой полностью включено в настоящую заявку посредством отсылки.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством отсылки. Указанная копия ASCII, созданная 28 сентября 2016 года, обозначена 022675\_WO052\_SL.txt и имеет размер 65000 байтов.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] PD-1, также известный как белок программируемой смерти клеток 1 и CD279, представляет собой состоящий из 268 аминокислот рецептор клеточной поверхности, который относится к суперсемейству иммуноглобулинов. PD-1 входит в семейство CD28 регуляторов Т-клеток и экспрессируется на Т-клетках, В-клетках и макрофагах. Он связывает лиганды PD-L1 (также известный как гомолог B7) и PD-L2 (также известный как B7-DC).

[0004] PD-1 - мембранный белок I типа, структура которого включает внеклеточный домен IgV, трансмембранную область и внутриклеточный хвост, содержащий два участка фосфорилирования. Известный как белок иммунной контрольной точки, PD-1 действует в качестве индуцируемого иммуномодулирующего рецептора, играя роль, например, отрицательной регуляции Т-клеточных ответов на антигенную стимуляцию.

[0005] PD-L1 является основным лигандом PD-1. Связывание PD-L1 с PD-1 ингибирует активность Т-клеток, вызывая снижение продукции цитокинов и подавление пролиферации Т-клеток. Раковые клетки, которые экспрессируют PD-L1, способны использовать данный механизм для инактивации противоопухолевой активности Т-клеток посредством связывания PD-L1 с рецептором PD-1.

[0006] Принимая во внимание его способность регулировать иммунный ответ, PD-1 исследовали в качестве потенциальной мишени иммунотерапии, включающей лечение рака и аутоиммунных заболеваний. Два антитела против PD-1, пембролизумаб и ниволумаб, были одобрены в США и Европе для лечения некоторых онкологических заболеваний.

[0007] С учетом ключевой роли PD-1 в качестве иммуномодулятора, существует потребность в новых и улучшенных иммунотерапиях, которые направлены на PD-1, для лечения онкологических заболеваний и некоторых нарушений иммунной системы.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Настоящее изобретение направлено на новые рекомбинантные антитела, направленно взаимодействующие с PD-1, а также фармацевтические композиции, включающие одно или более таких антител, и применение антител и фармацевтических композиций для повышения иммунитета у пациента и для лечения онкологических заболеваний, возникающих в таких тканях, как кожа, легкое, кишечник, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гемопоэтическая система, голова и шея, печень, мочевого пузырь, молочная железа, желудок, матка и поджелудочная железа. По сравнению с доступными в настоящее время методами лечения таких онкологических заболеваний, включающими лечение антителами, предполагается, что антитела согласно изобретению могут обеспечить превосходящий клинический ответ либо отдельно, либо в комбинации с другим противоопухолевым средством, таким как антитело, направленно взаимодействующее с другим белком иммунной контрольной точки.

[0009] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложено антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть, где антитело конкурирует за связывание человеческого PD-1 с любым из, или связывается с таким же эпитопом человеческого PD-1, что и любое из антител 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 и 13112.15380.

[0010] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 включает H-CDR1-3, включающие последовательности H-CDR1-3, соответственно, антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380.

[0011] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет переменный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ), который по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентичен по аминокислотной последовательности  $V_H$  домену антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380.

[0012] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет  $V_H$ , который включает аминокислотную последовательность  $V_H$  антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380.

[0013] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет тяжелую цепь (HC), которая включает аминокислотную последовательность  $V_H$  антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380 и аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 67.

[0014] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 включает L-CDR1-3, включающие последовательности L-CDR1-3, соответственно, антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380.

[0015] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет переменный домен легкой цепи ( $V_L$ ), который по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентичен по аминокислотной последовательности  $V_L$  домену антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380.

[0016] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет  $V_L$ , который включает аминокислотную последовательность  $V_L$  антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380.

[0017] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет легкую цепь (LC), которая включает аминокислотную последовательность  $V_L$  антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380 и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи SEQ ID NO: 68.

[0018] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 включает любую из вышеописанных последовательностей тяжелой цепи и любую из вышеуказанных последовательностей легкой цепи.

[0019] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 включает аминокислотные последовательности H-CDR3 и L-CDR3 антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380.

5 [0020] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 включает аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380.

10 [0021] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет  $V_H$  и  $V_L$ , которые по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентичны по аминокислотной последовательности  $V_H$  и  $V_L$ , соответственно, антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380.

15 [0022] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет  $V_H$  и  $V_L$ , которые включают или состоят из аминокислотных последовательностей  $V_H$  и  $V_L$ , соответственно, антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380.

20 [0023] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет HC и LC, которые включают или состоят из аминокислотных последовательностей HC и LC, соответственно, антитела 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 или 13112.15380.

25 [0024] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 имеет: (1) HC, которая включает аминокислотную последовательность  $V_H$  антитела, выбранного из группы, состоящей из антител 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 и 13112.15380, и аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 67; и (2) LC, которая включает аминокислотную последовательность  $V_L$  такого выбранного антитела и  
30 аминокислотную последовательность константной области легкой цепи SEQ ID NO: 68.

[0025] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть согласно изобретению включают следующие аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3:

- 35 a) SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22 и 23, соответственно;  
b) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 и 29, соответственно;  
c) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 и 35, соответственно;  
d) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 и 41, соответственно;  
e) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46 и 47, соответственно;  
40 f) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 и 53, соответственно;  
g) SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 и 59, соответственно; или  
h) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65, соответственно.

[0026] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть согласно изобретению включают переменный домен  
45 тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, имеющие следующие аминокислотные последовательности:

- a) SEQ ID NO: 2 и 3, соответственно;  
b) SEQ ID NO: 4 и 5, соответственно;

- c) SEQ ID NO: 4 и 66, соответственно;
- d) SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно;
- e) SEQ ID NO: 8 и 9, соответственно;
- f) SEQ ID NO: 10 и 11, соответственно;
- 5 g) SEQ ID NO: 12 и 13, соответственно;
- h) SEQ ID NO: 14 и 15, соответственно; или
- i) SEQ ID NO: 16 и 17, соответственно.

[0027] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 согласно изобретению включает:

- 10 a) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 68;
- b) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 и 68;
- c) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 67, и LC,
- 15 включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 66 и 68;
- d) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 68;
- e) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 68;
- 20 f) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 68;
- g) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 68;
- h) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 67, и LC,
- 25 включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 68; или
- i) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17 и 68.

[0028] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть согласно изобретению включают H-CDR1-3 и L-CDR1-3, включающие

30 аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18-20 и SEQ ID NO: 21-23, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 включает  $V_H$ , включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и  $V_L$  включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В определенных вариантах осуществления антитело против PD-1 включает тяжелую цепь, включающую

35 аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 67, и легкую цепь, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 68.

[0029] В изобретении также предложено антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с эпитопом PD-1, включающим аминокислотный остаток K131 (например, антитела 12819 и 12865, такие как антитела,

40 перечисленные в Таблицах 1, 4-9 и 11-14). В некоторых вариантах осуществления эпитоп дополнительно включает аминокислотные остатки P130 и A132, и может дополнительно включать аминокислотные остатки V64 и L128 (например, антитело 12819). В некоторых вариантах осуществления эпитоп дополнительно включает аминокислотный остаток E136 (например, антитело 12865).

[0030] В изобретении также предложено антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с эпитопом PD-1, включающим аминокислотные остатки V44 и T145 SEQ ID NO: 1 (например, антитело 13112, такое как антитела, перечисленные в Таблицах 1, 4-7, 9 и 11-14).

[0031] В определенных вариантах осуществления антитело или часть связываются с эпитопом PD-1, включающим аминокислотные остатки V64, L128, P130, K131 и A132 SEQ ID NO: 1 (например, антитело 12819), аминокислотные остатки K131 и E136 SEQ ID NO: 1 (например, антитело 12865) или аминокислотные остатки V44 и T145 SEQ ID NO: 1 (например, антитело 13112).

[0032] В изобретении также предложено моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с эпитопом PD-1, включающим аминокислотные остатки 69-90 и 122-140 из SEQ ID NO: 1 (например, антитело 12819 или 12865). В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело или антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом PD-1, включающим аминокислотные остатки 56-64, 69-90 и 122-140 из SEQ ID NO: 1 (например, антитело 12819). В некоторых вариантах осуществления антитело или часть связываются с остатками 69-75 (или их фрагментом) SEQ ID NO: 1 (например, антитело 12819 или 12865). В некоторых вариантах осуществления антитело или часть связываются с остатками 136-140 (или их фрагментом) SEQ ID NO: 1 (например, антитело 12819 или 12865). В некоторых вариантах осуществления антитело или часть связываются с остатками 69-75 (или их фрагментом) и остатками 136-140 (или их фрагментом) SEQ ID NO: 1 (например, антитело 12819 или 12865).

[0033] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть согласно изобретению обладают по меньшей мере одним из следующих свойств:

- а) связываются с человеческим PD-1 с  $K_D$  750 пМ или меньше;
- б) связываются с PD-1 яванского макака с  $K_D$  7 нМ или меньше;
- в) связываются с мышинным PD-1 с  $K_D$  1 нМ или меньше;
- г) не связываются с крысиным PD-1;
- д) повышают секрецию IL-2 в анализе цельной крови с SEB;
- е) повышают секрецию IFN- $\gamma$  в анализе реакции однонаправленной смешанной культуры лимфоцитов;
- ж) ингибируют взаимодействие PD-1 с PD-L1 по меньшей мере на 60% при концентрации 10 мкг/мл в проточно-цитометрическом конкурентном анализе;
- з) блокируют связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1 по меньшей мере на 90% при концентрации 10 мкг/мл при определении с помощью анализа методом биослойной интерферометрии; и
- и) ингибируют рост опухоли *in vivo*.

Примеры такого антитела включают, без ограничения, антитело 12819 (обладающее свойствами а-и); антитела 12748, 12892 и 12777 (обладающие, по меньшей мере, свойствами а, б и е-ж); антитела 12865 и 12796 (обладающие, по меньшей мере, свойствами а, б, е, ф и ж) и антитела 12760 и 13112 (обладающие, по меньшей мере, свойствами а, б, е и ф). В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть согласно изобретению обладают всеми указанными свойствами. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть обладают, по меньшей мере, свойствами а, б и е-ж. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть обладают, по меньшей мере, свойствами а, б, е, ф и ж. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть обладают, по меньшей мере, свойствами а, б, е и ф.

[0034] Если не указано иное, каждое из 12819, 12748, 12865, 12892, 12796, 12777, 12760

и 13112 относится к группе антител, которые имеют одинаковые шесть CDR-областей и имеют одинаковые первые пять цифр в своих десятизначных числовых обозначениях. Например, 12748 включает варианты антитела 12748.15381 и 12748.16124, которые имеют одинаковые шесть CDR-областей (как показано в Таблице 2). Каждая группа антител, как ожидают, будет обладать одинаковыми или по существу одинаковыми биологическими свойствами.

[0035] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть согласно изобретению не конкурируют за связывание PD-1 с пембролизумабом или ниволумабом. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть согласно изобретению не связываются с тем же эпитопом, что и пембролизумаб или ниволумаб; например, антитело или часть согласно изобретению связываются с одним или более остатками на PD-1, которые не связывают пембролизумаб или ниволумаб.

[0036] В другом аспекте настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, включающие по меньшей мере одно антитело против PD-1 или его антигенсвязывающую часть, как описано в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0037] В настоящем изобретении также предложены выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, включающие нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или соответствующую антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или соответствующую антигенсвязывающую часть, или и то, и другое, антитела против PD-1, как описано в настоящей заявке.

[0038] В настоящем изобретении также предложены векторы, включающие такую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, где указанный вектор дополнительно включает последовательность регуляции экспрессии.

[0039] В настоящем изобретении также предложены клетки-хозяева, включающие нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или соответствующую антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или соответствующую антигенсвязывающую часть, или и то, и другое, антитела против PD-1, как описано в настоящей заявке.

[0040] В настоящем изобретении также предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящей заявке, включающий предоставление клетки-хозяина, которая включает нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, антитела против PD-1, как описано в настоящей заявке, культивирование указанной клетки-хозяина при условиях, подходящих для экспрессии антитела или части, и выделение полученного в результате антитела или части.

[0041] В настоящем изобретении также предложена биспецифичная связывающая молекула, обладающая специфичностью связывания антитела против PD-1, описанного в настоящей заявке, и специфичностью связывания другого антитела против PD-1 (например, другого антитела против PD-1, описанного в настоящей заявке) или антитела, которое направленно взаимодействует с другим белком, таким как другой белок иммунной контрольной точки, раковым антигеном или другой молекулой клеточной поверхности, активность которой опосредует развитие заболевания, такого как рак.

[0042] В настоящем изобретении также предложен способ повышения иммунитета у пациента (например, больного человека), нуждающегося в этом, включающий введение



указанному пациенту антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части, фармацевтической композиции или биспецифичной связывающей молекулы, как описано в настоящей заявке.

[0043] В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака у пациента (например, больного человека), включающий введение указанному пациенту антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части, фармацевтической композиции или биспецифичной связывающей молекулы, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления рак возникает в ткани, выбранной из группы, состоящей из кожи, легкого, кишечника, яичника, головного мозга, предстательной железы, почки, мягких тканей, гемопоэтической системы, головы и шеи, печени, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, матки и поджелудочной железы. Рак может быть, например, неизлечимой или метастатической меланомой, немелкоклеточным раком легкого, плоскоклеточным раком головы и шеи, почечно-клеточной карциномой или лимфомой Ходжкина. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение химиотерапевтического средства, противоопухолевого средства, антиангиогенного средства, ингибитора тирозинкиназы или ингибитора пути PD-1.

[0044] В настоящем изобретении также предложены антитела или антигенсвязывающие части согласно настоящему изобретению для применения в вышеуказанных способах лечения и применение антител или антигенсвязывающих частей согласно настоящему изобретению для производства лекарственных средств для вышеуказанных способов лечения, т.е. лечения нуждающегося в этом человека, с целью усиления его/ее иммунной системы и лечения больного раком, таким как один из вышеуказанных типов рака.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0045] На Фигуре 1 показан ПЦР-продукт, содержащий  $V_H$  и  $V_L$  области антитела против PD-1 AAS-12819 (выделены черным цветом), клонированные в рамке считывания с соответствующими фрагментами человеческой тяжелой цепи IgG1-CH1-CH2-CH3 и человеческой лямбда константной области легкой цепи, соответственно. Сайты рестрикции для данного клонирования - *ApaI* и *AvrII*. Сайты рестрикции *AscI* и *NheI* показаны между 5'-концами  $V_H$  и  $V_L$ . Точка начала репликации плазмиды обозначена как pUC ori, и ген, придающий устойчивость к ампициллину, обозначен как AmpR.

[0046] На Фигуре 2 показана экспрессионная конструкция с двойным ЦМВ промотором, введенным между 5'-концами  $V_H$  и  $V_L$  при использовании сайтов рестрикции *AscI* и *NheI*. Последовательности  $V_H$  и  $V_L$  выделены черным цветом, другие аннотируемые генетические элементы выделены белым.

[0047] На Фигурах 3А-3С показаны репрезентативные проточно-цитометрические точечные диаграммы для (А) клона антитела, которое специфично связывается с клетками, трансфицированными человеческим PD-1, (В) клона, который неспецифично связывается с клетками CHO-S, и (С) клона, который не связывается ни с одной из популяций клеток, используемых в скрининге.

[0048] На Фигуре 4 показан процент лимфоцитов, экспрессирующих PD-1, у шести доноров (D1-D6) до и после стимуляции SEB (стафилококковым энтеротоксином В).

[0049] На Фигурах 5А-І показано титрование кандидатных антител против PD-1 в анализе SEB.

[0050] На Фигурах 6А-Н показано титрование кандидатных антител против PD-1 в анализе реакции однонаправленной СКЛ.

[0051] На Фигурах 7А-В показано связывание PD-L1 с клетками, экспрессирующими

PD-1, в присутствии антител против PD-1.

[0052] На Фигуре 8 показан обзор идентифицированных групп эпитопов (эпитопных корзин) для протестированных антител против PD-1 12866.13188, 12807.13177, 12819.17149, 12865.17150, 12892.13195, 12777.15382, 12760.13169, 13112.15380, а также аналогов ниволумаба и пембролизумаба. Антитела, соединенные черными линиями, обозначают перекрестно-блокирующую активность. Антитела сгруппированы в соответствии с профилями конкуренции с другими антителами против PD-1. Nivo: аналог ниволумаба; Pembro: аналог пембролизумаба.

[0053] На Фигуре 9 (панели A-G) показано положение эпитопов антитела на структуре человеческого PD-1 (PDB 4ZQK и 2M2D). A) Трехмерное изображение внеклеточного домена (ECD) человеческого PD-1 (остатки 33-150). Показано положение GFCC' и ABED  $\beta$ -слоя и C'-D петли. B) Трехмерное изображение комплекса человеческого PD-1: человеческого PD-L1 под теми же углами наблюдения, как в (A). C) Молекулярная модель эпитопа пембролизумаба, показанного как карта плотности, на которой более темные зоны обозначают области, опосредующие более сильное связывание. Черные области представляют участвующие в контакте остатки, обнаруженные с помощью аланинового сканирования. D) Молекулярная модель эпитопа ниволумаба, представленная, как в (C). E) Молекулярная модель эпитопа антитела 12819, представленная, как в (C). F) Молекулярная модель эпитопа антитела 12865, представленная, как в (C). G) Молекулярная модель эпитопов не блокирующего лиганд антитела 13112, представленная, как в (C).

[0054] На Фигуре 10 (панели A-D) показано влияние лечения антителом против PD-1 12819, 17149 или растворителем на рост опухоли в четырех моделях сингенных опухолей. A) CT26 (рак толстой кишки). B) C38 (рак толстой кишки). C) ASB-XIV (рак легкого). D) Sa1N (фибросаркома). Серое поле обозначает период лечения. Данные представлены как средние $\pm$ SEM. \*P<0,001.

[0055] На Фигуре 11 показано влияние лечения антителом против PD-1 12819.17149, пембролизумабом (Китруда®) или растворителем на рост опухоли в полугуманизированной модели ксенотрансплантатной опухоли, в которой линия клеток меланомы человека A375 была смешана с очищенными человеческими CD8+ и CD4+ Т-клетками перед инокуляцией. Серое поле обозначает период лечения. Данные представлены как средние $\pm$ SEM. \*P<0,001.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0056] В настоящем изобретении предложены новые антитела против человеческого PD-1, которые могут применяться для усиления иммунной системы у больного человека, такого как больной раком. Если не указано иное, при использовании в настоящем описании, "PD-1" относится к человеческому PD-1. Полипептидная последовательность человеческого PD-1 доступна под регистрационным номером в Uniprot Q15116 (PDCD1\_HUMAN) и представлена в настоящей заявке как SEQ ID NO:1.

[0057] Термин "антитело" (At) или "иммуноглобулин" (Ig), при использовании в настоящем описании относится к тетрамеру, включающему две тяжелых (H) цепи (приблизительно 50-70 кДа) и две легких (L) цепи (приблизительно 25 кДа), связанных дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного домена тяжелой цепи ( $V_H$ ) и константной области тяжелой цепи (CH). Каждая легкая цепь состоит из вариабельного домена легкой цепи ( $V_L$ ) и константной области легкой цепи (CL). Домены  $V_H$  и  $V_L$  могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, называемые "областями определения комплементарности" (CDR-

области), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми "каркасными областями" (FR-областями). Каждый  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR-областей (H-CDR в настоящей заявке обозначает CDR тяжелой цепи; и L-CDR в настоящей заявке обозначает CDR легкой цепи) и четырех FR-областей, расположенных от N-конца к С-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Определение положений аминокислот в тяжелой или легкой цепи может быть выполнено в соответствии с определениями IMGT® (Lefranc et al., Dev Comp Immunol 27(1):55-77 (2003)); или определениями в Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991)); Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); или Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

[0058] Термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу, которое экспрессируется из клетки или клеточной линии, включающей нуклеотидную последовательность(и), которая кодирует антитело, где указанная нуклеотидная последовательность(и) не связана с клеткой в естественных условиях.

[0059] Термин "выделенный белок", "выделенный полипептид" или "выделенное антитело" относятся к белку, полипептиду или антителу, которые в силу своего происхождения или источника получения: (1) не связаны с обычно связанными компонентами, которые сопровождают их в их нативном состоянии, (2) не содержат других белков из того же биологического вида, (3) экспрессируются клеткой другого биологического вида и/или (4) не встречаются в природе. Таким образом, полипептид, который химически синтезирован или синтезирован в клеточной системе, отличающейся от клетки, из которой он обычно происходит, будет "выделен" из его обычно связанных компонентов. Белок также может быть по существу освобожден от обычно связанных компонентов при выделении с помощью методов очистки белка, известных в уровне техники.

[0060] При использовании в настоящем описании термин "зародышевая линия" относится к нуклеотидным и аминокислотным последовательностям генов и сегментов генов антитела, которые передаются от родителей потомству через зародышевые клетки. Последовательности зародышевой линии отличаются от нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела в зрелых В-клетках, которые были изменены в результате событий рекомбинации и гипермутации в процессе созревания В-клеток. Антитело, которое "использует" конкретную последовательность зародышевой линии, имеет нуклеотидную или аминокислотную последовательность, которая выравнивается с такой нуклеотидной последовательностью или с аминокислотной последовательностью зародышевой линии, которую оно определяет, с большей точностью, чем с любой другой нуклеотидной или аминокислотной последовательностью зародышевой линии.

[0061] Термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между антигеном и антителом. Собственную привлекательность антитела по отношению к антигену, как правило, выражают равновесной константой аффинности связывания ( $K_D$ ) взаимодействия определенного антитела-антигена. Антитело, как говорят, специфично связывается с антигеном, когда  $K_D$  составляет  $\leq 1$  мМ, предпочтительно  $\leq 100$  нМ. Константа аффинности связывания  $K_D$  может быть измерена, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™) или биослойной интерферометрии, например, при использовании системы ProteOn™ XPR36 SPR производства Bio-Rad или системы Octet™.

[0062] Термин " $k_{\text{off}}$ " относится к константе скорости диссоциации взаимодействия определенного антитела-антигена. Константа скорости диссоциации  $k_{\text{off}}$  может быть измерена с помощью биослойной интерферометрии, например, при использовании

системы Octet<sup>TM</sup>.

[0063] Термин "эпитоп" при использовании в настоящем описании относится к части (детерминанте) антигена, которая специфично связывается с антителом или родственной молекулой, такой как биспецифичная связывающая молекула. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или углеводные или сахарные боковые цепи, и обычно имеют специфические трехмерные структурные свойства, а также специфические зарядовые свойства. Эпитоп может быть "линейным" или "конформационным". В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком (например, антигеном) и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) расположены последовательно на первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе точки взаимодействия расположены в аминокислотных остатках на белке, которые отделены друг от друга в первичной аминокислотной последовательности. После определения требуемого эпитопа на антигене, антитела к такому эпитопу можно получить при использовании способов, известных в уровне техники. Например, антитело к линейному эпитопу может быть получено, например, при иммунизации животного пептидом, имеющим аминокислотные остатки линейного эпитопа. Антитело к конформационному эпитопу может быть получено, например, при иммунизации животного мини-доменом, содержащим соответствующие аминокислотные остатки конформационного эпитопа. Антитело к определенному эпитопу может быть также получено, например, при иммунизации животного представляющей интерес молекулой-мишенью или ее соответствующей частью (например, ECD PD-1), с последующим скринингом на связывание с эпитопом.

[0064] Определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, или конкурирует за связывание с антителом против PD-1 согласно изобретению, можно с применением способов, известных в уровне техники, включающих, без ограничения, конкурентные анализы, бинирование эпитопов и аланиновое сканирование. В некоторых вариантах осуществления тестируемое антитело и антитело против PD-1 согласно изобретению связываются по меньшей мере с одним общим остатком (например, по меньшей мере двумя, тремя, четырьмя или пятью общими остатками) на PD-1. В других вариантах осуществления участвующие в контакте остатки на PD-1 для тестируемого антитела и антитела против PD-1 согласно изобретению являются полностью идентичными. В одном варианте осуществления антителу против PD-1 согласно изобретению позволяют связываться с PD-1 при насыщающих условиях и затем измеряют способность тестируемого антитела связываться с PD-1. Если тестируемое антитело способно связываться с PD-1 в то же время, что и референсное антитело против PD-1, то тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, нежели референсное антитело против PD-1. Тем не менее, если тестируемое антитело не способно связываться с PD-1 в то же время, то тестируемое антитело связывается с тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или эпитопом, который находится в непосредственной близости от эпитопа, связываемого антителом против PD-1 согласно изобретению.

Данный эксперимент может быть выполнен при использовании ИФА, РИА, BIACORE<sup>TM</sup>, биослойной интерферометрии или проточной цитометрии. Для проверки, способно ли антитело против PD-1 перекрестно конкурировать с другим антителом против PD-1,

можно применять конкурентный метод, описанный выше, в двух направлениях, т.е. определять, блокирует ли известное антитело тестируемое антитело, и наоборот. Такие эксперименты перекрестной конкуренции могут быть выполнены, например, при использовании прибора IBIS MX96 SPR или системы Octet<sup>TM</sup>.

[0065] Термин "химерное антитело" в своем самом широком смысле относится к антителу, которое содержит одну или более областей из одного антитела и одну или более областей из одного или более других антител, как правило, к антителу, которое имеет частично человеческое происхождение и частично нечеловеческое происхождение, т.е. частично получено из не относящегося к человеку животного, например мыши, крысы или другого грызуна, или птицы, такой как курица. Химерные антитела предпочтительны по сравнению с нечеловеческими антителами для снижения риска иммунного ответа у человека против антитела, например, иммунного ответа человека против антитела мыши в случае мышиногo антитела. Примером типичного химерного антитела является антитело, в котором последовательности вариабельных доменов являются мышинными, тогда как последовательности константной области являются человеческими. В случае химерного антитела нечеловеческие части могут быть подвергнуты дополнительному изменению для гуманизации антитела. Химерные антитела, описанные в настоящей заявке, содержат последовательности куриных вариабельных доменов и последовательности человеческой константной области.

[0066] Термин "гуманизировать" относится к тому, что в том случае, когда антитело имеет полностью или частично нечеловеческое происхождение (например, является мышинным или куриным антителом, полученным при иммунизации мышей или кур, соответственно, представляющим интерес антигеном, или является химерным антителом, основанным на таком мышинном или курином антителе), можно заменить некоторые аминокислоты, в частности, в каркасных областях и константных областях тяжелой и легкой цепей, чтобы избежать или свести к минимуму риск иммунного ответа у людей. Хотя нельзя точно предсказать иммуногенность и, как следствие, иммунный ответ против конкретного антитела у человека, нечеловеческие антитела обычно являются более иммуногенными у людей, чем человеческие антитела. Химерные антитела, в которых чужеродные константные области (например, грызуна или птицы) были заменены последовательностями человеческого происхождения, как было показано, в целом являлись менее иммуногенными, чем антитела полностью чужеродного происхождения, поэтому при создании терапевтических антител существует тенденция, направленная на получение гуманизированных или полностью человеческих антител. Химерные антитела или другие антитела нечеловеческого происхождения, таким образом, могут быть гуманизированы для снижения риска иммунного ответа против антител у человека.

[0067] В случае химерных антител гуманизация, как правило, включает модификацию каркасных областей последовательностей вариабельных доменов. Аминокислотные остатки, которые являются частью определяющих комплементарность областей (CDR-областей), чаще всего не будут подвергаться изменению в связи с гуманизацией, хотя в некоторых случаях может потребоваться изменить отдельные аминокислотные остатки CDR, например, для удаления участка гликозилирования, участка дезамидирования, участка изомеризации аспартата или нежелательного остатка цистеина или метионина. N-связанное гликозилирование проходит при присоединении олигосахаридной цепи к остатку аспарагина в трипептидной последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X может являться любой аминокислотой кроме Pro. Удаление участка N-гликозилирования может быть достигнуто при мутации остатка Asn или остатка Ser/

Thr с заменой другим остатком, предпочтительно посредством консервативной замены. Дезамидирование остатков аспарагина и глутамина может проходить в зависимости от таких факторов, как pH и экспонирование на поверхности. Остатки аспарагина особенно чувствительны к дезамидированию, особенно в случае присутствия в последовательности Asn-Gly, и, в меньшей степени, в других дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ala. В случае, когда такой участок дезамидирования, в особенности Asn-Gly, присутствует в последовательности CDR, может потребоваться удалить участок, как правило, посредством консервативной замены, для удаления одного из включенных остатков.

[0068] В уровне техники известны многочисленные способы гуманизации последовательности антител; см., например, обзор Almagro & Fransson, *Front Biosci.* 13: 1619-1633 (2008). Одним из широко применяемых способов является CDR-графтинг, который в случае, например, химерного антитела, полученного на основе антитела мыши, включает идентификацию среди человеческих генов зародышевой линии аналогов мышиных генов вариабельных доменов и перевивание (или графтинг) мышиных CDR-последовательностей в этот каркас. Специфичность взаимодействия антитела с антигеном-мишенью основана, прежде всего, на аминокислотных остатках, расположенных в шести CDR-областях тяжелой и легкой цепей. Поэтому аминокислотные последовательности в CDR-областях отдельных антител являются намного более вариабельными, чем последовательности за пределами CDR-областей. Поскольку CDR-последовательности ответственны за основную часть взаимодействий антитела-антигена, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые воспроизводят свойства определенного природного антитела или, в более широком смысле, любого специфичного антитела с данной аминокислотной последовательностью, например, путем конструирования векторов экспрессии, которые экспрессируют CDR-последовательности из специфичного антитела, перевитые в каркасные последовательности из другого антитела. В результате можно "гуманизировать" нечеловеческое антитело и при этом по существу сохранять специфичность и аффинность связывания исходного антитела. CDR-графтинг может быть основан на определениях CDR Кэбата, хотя в более поздней публикации (Magdelaine-Beuzelin et al., *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64:210-225 (2007)) было сделано предположение, что определение IMGT® (международная информационная система ImMunoGeneTics®, [www.imgt.org](http://www.imgt.org)) может улучшить результат гуманизации (см. Lefranc et al., *Dev. Comp Immunol.* 27:55-77 (2003)).

[0069] В некоторых случаях CDR-графтинг может снижать специфичность и аффинность связывания и, как следствие, биологическую активность CDR-перевитого нечеловеческого антитела по сравнению с исходным антителом, из которого получены CDR-области. Обратные мутации (иногда называемые "восстановлением каркаса") могут быть введены в выбранные положения CDR-перевитого антитела, как правило, в каркасные области, для восстановления специфичности и аффинности связывания исходного антитела. Идентификацию положений для возможных обратных мутаций можно выполнить при использовании информации, доступной в литературе и в базах данных антител. Аминокислотные остатки, которые являются кандидатами для обратных мутаций, как правило, являются остатками, которые расположены на поверхности молекулы антитела, тогда как остатки, которые являются внутренними или имеют низкую степень поверхностной доступности, обычно не будут подвергаться изменению.

[0070] Альтернативным CDR-графтингу и обратной мутации методом гуманизации является перекладка поверхности, в которой сохраняют внутренние, не экспонированные

остатки нечеловеческого происхождения, тогда как поверхностные остатки заменяют человеческими остатками.

[0071] В некоторых случаях также может быть предпочтительно изменить один или более аминокислотных остатков в CDR с целью повышения аффинности связывания с эпитопом-мишенью. Этот метод известен как "созревание аффинности" и необязательно может применяться при гуманизации, например, в случаях, когда гуманизация антитела приводит к снижению специфичности или аффинности связывания, и при этом нельзя в достаточной степени улучшить специфичность или аффинность связывания только путем введения одних обратных мутаций. Различные способы созревания аффинности известны в уровне техники, например, способ сканирования *in vitro* с применением насыщающего мутагенеза, описанный в публикации Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:412-417 (1997), и способ поэтапного *in vitro* созревания аффинности Wu et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:6037-6042 (1998).

[0072] Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или просто "часть антитела") при использовании в настоящем описании относится к одной или более частям или фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном (например, человеческим PD-1 или его частью). Было показано, что некоторые фрагменты полноразмерного антитела могут выполнять антигенсвязывающую функцию антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть", включают: (i) Fab-фрагмент: моновалентный фрагмент, состоящий из  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$  доменов (например, Fab-фрагменты 12819.17149 и 12865.17150, описанные ниже); (ii)  $F(ab')_2$ -фрагмент: бивалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из  $V_H$  и  $C_{H1}$  доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из  $V_L$  и  $V_H$  доменов одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент, который состоит из  $V_H$  домена; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR), способную к специфичному связыванию с антигеном. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента,  $V_L$  и  $V_H$ , кодируются отдельными генами, их можно соединить с помощью рекомбинантных методов синтетическим линкером, что позволяет получать их в виде одной белковой цепи, в которой  $V_L$  и  $V_H$  домены спарены с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv)). Также в изобретение включены антигенсвязывающие молекулы, включающие  $V_H$  и/или  $V_L$ . В случае  $V_H$ , молекула также может включать одно или более из CH1, шарнирной области, CH2 или CH3 области. Такие одноцепочечные антитела также должны быть охвачены термином "антигенсвязывающая часть" антитела. Также включены другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела представляют собой бивалентные, биспецифичные антитела, в которых  $V_H$  и  $V_L$  домены экспрессированы в одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который слишком короткий, чтобы допускать спаривание двух таких доменов на одной цепи, в результате чего домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами на другой цепи с образованием двух антигенсвязывающих участков.

[0073] Части антител, такие как Fab и  $F(ab')_2$ -фрагменты, могут быть получены из полных антител с помощью стандартных методов, таких как расщепление полных антител папаином или пепсином. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезии могут быть получены с помощью стандартных методов рекомбинантных ДНК, например, как описано в настоящей заявке.

[0074] Класс (изотип) и субкласс антител против PD-1 может быть определен с помощью любого способа, известного в уровне техники. Как правило, класс и субкласс антитела можно определить при использовании антител, которые являются специфичными в отношении определенного класса и субкласса антитела. Такие антитела доступны в продаже. Класс и субкласс можно определить с помощью ELISA, Вестерн-блоттинга, а также других методов. В альтернативе класс и субкласс можно определить путем полного или частичного секвенирования константных областей тяжелой и/или легкой цепей антител, сравнения их аминокислотной последовательности с известными аминокислотными последовательностями различных классов и субклассов иммуноглобулинов и определения класса и субкласса антител.

[0075] В случае, когда указаны конкретные аминокислотные остатки в данном положении последовательности антитела, обозначение, например, "35S" относится к положению и остатку, т.е. в данном случае указано, что в положении 35 последовательности присутствует остаток серина (S). Аналогичным образом, обозначение, например, "13Q+35S" относится к двум остаткам в соответствующих положениях.

[0076] Если не указано иное, все положения аминокислотных остатков антител, указанные в настоящем описании, приведены в соответствии со схемой нумерации IMGT®.

#### *Антитела против PD-1*

[0077] В настоящем изобретении предложены антитела, направленные против PD-1, и их антигенсвязывающие части. Антитела могут быть химерными, содержать переменные домены, полученные из курицы, и человеческие константные области, или могут быть гуманизированными. Антитела, раскрытые в настоящей заявке, являются, в частности, гуманизированными антителами.

[0078] Аминокислотные последовательности  $V_H$  и  $V_L$  (SEQ ID NO: 2-17) восемью выбранных гуманизированных антител против PD-1 согласно изобретению показаны ниже в Таблице 4 (Пример 4). Для справки, номера SEQ ID NO представлены ниже в Таблице 1.

[0079] Антитела против PD-1, раскрытые в настоящей заявке, могут быть обозначены либо 5-значным номером, например "12819", либо 10-значным номером, например "12819.15384". При использовании в настоящем описании 5-значный номер относится ко всем антителам, имеющим последовательности CDR1-3 тяжелой и легкой цепи, показанные для данного номера в Таблице 2, тогда как применение 10-значного номера относится к конкретному гуманизированному варианту. Например, 12819.15384 представляет собой конкретный гуманизированный вариант, имеющий CDR-последовательности антитела 12819, как показано в Таблице 2. 5-значный номер охватывает, например, антитела, которые идентичны 10-значным вариантам, показанным ниже в Таблице 1, за исключением некоторых изменений в FR-областях (например, не содержат остатки SY на N-конце зрелой легкой цепи или содержат остатки SS вместо SY). Такие модификации не изменяют функциональные (например, антигенсвязывающие) свойства антител.

**Таблица 1. Номера SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей переменных доменов тяжелой и легкой цепи гуманизированных антител против PD-1**

Антитело	$V_H$	$V_L$
12819.15384	2	3
12748.15381	4	5
12748.16124	4	66



12865.15377	6	7
12892.15378	8	9
12796.15376	10	11
12777.15382	12	13
12760.15375	14	15
13112.15380	16	17

[0080] В Таблице 2 ниже приведены номера SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей CDR-областей тяжелой и легкой цепи антител.

**Таблица 2. Номера SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей CDR-областей антител против PD-1**

Антитело	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
12819	18	19	20	21	22	23
12748	24	25	26	27	28	29
12865	30	31	32	33	34	35
12892	36	37	38	39	40	41
12796	42	43	44	45	46	47
12777	48	49	50	51	52	53
12760	54	55	56	57	58	59
13112	60	61	62	63	64	65

[0081] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из:

a) антитела, H-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18-20, соответственно;

b) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2;

c) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

d) антитела, тяжелая цепь (HC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 67;

e) антитела, L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 21-23, соответственно;

f) антитела, вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

g) антитела,  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

h) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 68;

i) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18-23, соответственно;

j) антитела,  $V_H$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и  $V_L$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

k) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

l) антитела, HC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 67, и LC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 68.

[0082] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из:

a) антитела, H-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24-26, соответственно;

b) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;

c) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

d) антитела, тяжелая цепь (HC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 67;

e) антитела, L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 27-29, соответственно;

f) антитела, вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 или 66;

g) антитела,  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или 66;

h) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 или 66 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

i) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24-29, соответственно;

j) антитела,  $V_H$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и  $V_L$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 или 66;

k) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или 66; и

l) антитела, HC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 67, и LC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 или 66 и SEQ ID NO: 68.

[0083] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из:

a) антитела, H-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 30-32, соответственно;

b) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6;

c) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

d) антитела, тяжелая цепь (HC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6 и 67;

е) антитела, L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33-35, соответственно;

ф) антитела, вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7;

г) антитела,  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

h) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 68;

и) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 30-35, соответственно;

ж) антитела,  $V_H$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и  $V_L$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7;

к) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и

л) антитела, HC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6 и 67, и LC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 68.

[0084] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела, H-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36-38, соответственно;

б) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8;

с) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

д) антитела, тяжелая цепь (HC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и 67;

е) антитела, L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 39-41, соответственно;

ф) антитела, вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

г) антитела,  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

h) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 68;

и) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36-41, соответственно;

ж) антитела,  $V_H$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и  $V_L$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

к) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и

л) антитела, HC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и 67, и LC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 68.

[0085] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела, H-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 42-44, соответственно;

б) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10;

с) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

д) антитела, тяжелая цепь (HC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 67;

е) антитела, L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, соответственно;

ф) антитела, вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11;

г) антитела,  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;

х) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 68;

и) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 42-47, соответственно;

ж) антитела,  $V_H$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и  $V_L$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11;

к) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и

л) антитела, HC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 67, и LC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 68.

[0086] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела, H-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 48-50, соответственно;

б) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12;

с) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

d) антитела, тяжелая цепь (HC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 67;

e) антитела, L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 51-53, соответственно;

5 f) антитела, переменный домен легкой цепи ( $V_L$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;

g) антитела,  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

10 h) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 68;

i) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 48-53, соответственно;

15 j) антитела,  $V_H$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и  $V_L$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;

k) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

и

l) антитела, HC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 67, и LC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 68.

25 [0087] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из:

a) антитела, H-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54-56, соответственно;

30 b) антитела, переменный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

c) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

35 d) антитела, тяжелая цепь (HC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 67;

e) антитела, L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 57-59, соответственно;

40 f) антитела, переменный домен легкой цепи ( $V_L$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15;

g) антитела,  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

45 h) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 68;

i) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54-59, соответственно;

j) антитела,  $V_H$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, и  $V_L$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15;

к) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

и

л) антитела, HC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 67, и LC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 68.

[0088] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела, H-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 60-62, соответственно;

б) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16;

с) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;

д) антитела, тяжелая цепь (HC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 67;

е) антитела, L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 63-65, соответственно;

ф) антитела, вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17;

г) антитела,  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17;

h) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17 и 68;

и) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 60-65, соответственно;

ж) антитела,  $V_H$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и  $V_L$  которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17;

к) антитела,  $V_H$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и  $V_L$  которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17;

л) антитела, HC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 67, и LC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17 и 68.

[0089] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть включают аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 12819 (например, антитела 12819.15384).

[0090] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть включают аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 12748 (например, антитела 12748.15381 или антитела 12748.16124).

[0091] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть включают аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 12865 (например, антитела 12865.15377).

[0092] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть включают аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 12892 (например, антитела 12892.15378).

[0093] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть включают аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 12796 (например, антитела 12796.15376).

[0094] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть включают аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 12777 (например, антитела 12777.15382).

[0095] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть включают аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 12760 (например, антитела 12760.15375).

[0096] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть включают аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 13112 (например, антитела 13112.15380).

[0097] В другом варианте осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть имеют  $V_H$  и  $V_L$ , которые по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичны по аминокислотной последовательности  $V_H$  и  $V_L$ , соответственно, любого из антител 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 и 13112.15380.

[0098] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть имеют  $V_H$  и  $V_L$ , которые включают аминокислотные последовательности  $V_H$  и  $V_L$ , соответственно, любого из антител 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 и 13112.15380.

[0099] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть включают следующие аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3:

a) SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22 и 23, соответственно;

b) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 и 29, соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 и 35, соответственно;

d) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 и 41, соответственно;

e) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46 и 47, соответственно;

f) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 и 53, соответственно;

g) SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 и 59, соответственно; или

h) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65, соответственно.

[0100] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть включают  $V_H$ , который на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, и  $V_L$ , который на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен следующим аминокислотным последовательностям:

a) SEQ ID NO: 2 и 3, соответственно;

b) SEQ ID NO: 4 и 5, соответственно;

- c) SEQ ID NO: 4 и 66, соответственно;
- d) SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно;
- e) SEQ ID NO: 8 и 9, соответственно;
- f) SEQ ID NO: 10 и 11, соответственно;
- 5 g) SEQ ID NO: 12 и 13, соответственно;
- h) SEQ ID NO: 14 и 15, соответственно; или
- i) SEQ ID NO: 16 и 17, соответственно.

[0101] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть включают  $V_H$  и  $V_L$ , которые являются следующими

10 аминокислотными последовательностями:

- a) SEQ ID NO: 2 и 3, соответственно;
- b) SEQ ID NO: 4 и 5, соответственно;
- c) SEQ ID NO: 4 и 66, соответственно;
- d) SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно;
- 15 e) SEQ ID NO: 8 и 9, соответственно;
- f) SEQ ID NO: 10 и 11, соответственно;
- g) SEQ ID NO: 12 и 13, соответственно;
- h) SEQ ID NO: 14 и 15, соответственно; или
- i) SEQ ID NO: 16 и 17, соответственно.

20 [0102] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 включает:

- a) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 68;
- b) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 и 68;
- 25 c) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 66 и 68;
- d) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 68;
- e) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и 67, и LC,
- 30 включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 68;
- f) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 68;
- g) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 68;
- 35 h) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 68; или
- i) HC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17 и 68.

[0103] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 включает:

- 40 a) HC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2 и 67, и LC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 3 и 68;
- b) HC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4 и 67, и LC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 5 и 68;
- c) HC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4 и 67, и LC,
- 45 состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 66 и 68;
- d) HC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6 и 67, и LC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 7 и 68;
- e) HC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 8 и 67, и LC,



состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9 и 68;

f) НС, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10 и 67, и LC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11 и 68;

g) НС, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 12 и 67, и LC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13 и 68;

h) НС, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 14 и 67, и LC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 15 и 68; или

i) НС, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 16 и 67, и LC, состоящую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 17 и 68.

[0104] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке, может обладать по меньшей мере одним из следующих свойств:

a) связывается с человеческим PD-1 с  $K_D$  750 пМ или меньше;

b) связывается с PD-1 яванского макака с  $K_D$  7 нМ или меньше;

c) связывается с мышинным PD-1 с  $K_D$  1 нМ или меньше;

d) не связывается с крысиным PD-1;

e) повышает секрецию IL-2 в анализе цельной крови с SEB;

f) повышает секрецию IFN- $\gamma$  в анализе реакции однонаправленной смешанной культуры лимфоцитов;

g) ингибирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 по меньшей мере на 60% при концентрации 10 мкг/мл в проточно-цитометрическом конкурентном анализе;

h) блокирует связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1 по меньшей мере на 90% при концентрации 10 мкг/мл, при определении с помощью анализа методом биослойной интерферометрии; и

i) ингибирует рост опухоли *in vivo*.

[0105] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке, может связываться с человеческим PD-1 с  $K_D$  по меньшей мере 900, по меньшей мере 850, по меньшей мере

800, по меньшей мере 750, по меньшей мере 700, по меньшей мере 650, по меньшей мере 600, по меньшей мере 550, по меньшей мере 500, по меньшей мере 450, по меньшей мере 400, по меньшей мере 350, по меньшей мере 300, по меньшей мере 250, по меньшей мере 200, по меньшей мере 150, по меньшей мере 100, по меньшей мере 50, по меньшей мере 40, по меньшей мере 30 или по меньшей мере 20 пМ. В некоторых вариантах

осуществления  $K_D$  определяют при использовании поверхностного плазмонного резонанса. В определенных вариантах осуществления, антитела против PD-1 или антигенсвязывающие части связываются с человеческим PD-1 с более высокой аффинностью, чем ниволумаб, пембролизумаб или оба из них.

[0106] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке, может связываться с PD-1 яванского макака (SEQ ID NO: 89) с  $K_D$  по меньшей мере 9000, по меньшей мере 8000, по меньшей мере 7000, по меньшей мере 6000, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 4000, по меньшей мере 3000, по меньшей мере 2500, по меньшей мере 2000, по меньшей мере 1500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 900, по меньшей мере 800, по меньшей мере 700, по меньшей мере 600, по меньшей мере 500, по меньшей мере 400, по меньшей мере 300, по меньшей мере 200, по меньшей мере 100, по меньшей мере 75, по меньшей мере 50, по меньшей мере 25, по меньшей мере 20, по меньшей мере 15, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 5 пМ. В некоторых вариантах осуществления  $K_D$

определяют при использовании поверхностного плазмонного резонанса.

[0107] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке, может связываться с мышинным PD-1 (SEQ ID NO: 91) с  $K_D$  по меньшей мере 1000, по меньшей мере 950, по меньшей мере 900 или по меньшей мере 850 пМ. В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  определяют при использовании поверхностного плазмонного резонанса.

[0108] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке, может ингибировать взаимодействие PD-1 с PD-L1 по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% при концентрации 10 мкг/мл в проточно-цитометрическом конкурентном анализе. В некоторых вариантах осуществления антитела против PD-1 или антигенсвязывающие части могут ингибировать взаимодействие PD-1 с PD-L1 по меньшей мере на 83%.

[0109] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке, может блокировать связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1 по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% при концентрации 10 мкг/мл, при определении с помощью анализа методом биослойной интерферометрии. В некоторых вариантах осуществления, антитела против PD-1 или антигенсвязывающие части блокируют связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1 по меньшей мере на 90%.

[0110] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке, может конкурировать или перекрестно конкурировать за связывание PD-1 с антителами 12865, 12892 и 12777 (например, антителами 12865.15377, 12892.15378 и 12777.15382). В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке, может конкурировать или перекрестно конкурировать за связывание PD-1 с антителом 12819 (например, антителом 12819.15384). В некоторых вариантах осуществления любое из антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке, может конкурировать или перекрестно конкурировать за связывание PD-1 с антителами 12760 и 13112 (например, антителами 12760.15375 и 13112.15380).

[0111] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 согласно изобретению или его антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом PD-1, который включает по меньшей мере один (например, по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять) из следующих остатков SEQ ID NO: 1: V44, V64, L128, P130, K131, A132, E136 и T145. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть

связываются с эпитопом PD-1, который включает остатки V64, L128, P130, K131 и A132 SEQ ID NO: 1 (такое как антитело 12819, например антитело 12819.15384). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом PD-1, который включает остатки K131 и E136 SEQ ID NO: 1 (такое как антитело 12865, например антитело 12865.15377). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом PD-1, который включает остатки V44 и T145 SEQ ID NO: 1 (такое как антитело 13112, например антитело 13112.15380).

[0112] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 согласно изобретению или его антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом PD-1, который включает остатки 56-64, 69-90 и/или 122-140 из SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом PD-1, который включает остатки 69-90 и 122-140 из SEQ ID NO: 1 (такое как антитела 12819 и 12865, например антитела 12819.15384 и 12865.15377). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом PD-1, который включает остатки 56-64, 69-90 и 122-140 из SEQ ID NO: 1 (например, антитело 12819). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом PD-1, который включает остатки 69-90 и 122-140 из SEQ ID NO: 1 (например, антитело 12865). В некоторых вариантах осуществления антитело или часть связываются с остатками 69-75 (или их фрагментом, таким как фрагмент из одного, двух, трех, четырех, пяти или шести остатков) SEQ ID NO: 1 (такое как антитела 12819 и 12865, например антитела 12819.15384 и 12865.15377). В некоторых вариантах осуществления антитело или часть связываются с остатками 136-140 (или их фрагментом, таким как фрагмент из одного, двух, трех или четырех остатков) SEQ ID NO: 1 (такое как антитела 12819 и 12865, например антитела 12819.15384 и 12865.15377). В некоторых вариантах осуществления антитело или часть связываются с остатками 69-75 (или их фрагментом) и остатками 136-140 (или их фрагментом) SEQ ID NO: 1 (такое как антитела 12819 и 12865, например антитела 12819.15384 и 12865.15377). Также рассматривается эпитоп с любой комбинацией вышеуказанных остатков.

[0113] В некоторых вариантах осуществления аминокислотную последовательность, включающую эпитоп PD-1, как описано в настоящей заявке, могут применять в качестве иммуногена (например, вводить животному, или в качестве антигена для скрининга библиотек антител) для получения или идентификации антител против PD-1 или их антигенсвязывающих частей, которые связываются с указанным эпитопом.

[0114] Класс антитела против PD-1, полученного с применением способов, описанных в настоящей заявке, может быть изменен или переключен на другой класс или субкласс. В одном аспекте изобретения молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую  $V_L$  или  $V_H$ , выделяют с применением способов, известных в уровне техники, таким образом, что она не включает последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие  $C_L$  или  $C_H$ . Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие  $V_L$  или  $V_H$ , затем функционально соединяют с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей  $C_L$  или  $C_H$ , соответственно, из молекулы иммуноглобулина другого класса. Это может быть выполнено с применением вектора или молекулы нуклеиновой кислоты, которая включает  $C_L$  или  $C_H$  цепь, как описано выше. Например, антитело против PD-1, которое первоначально представляло собой IgM, может быть переключено в класс IgG. Кроме того, переключение класса может применяться для превращения одного субкласса IgG в другой, например из IgG<sub>1</sub> в IgG<sub>2</sub>. Константная область к легкой цепи может быть

изменена на константную область  $\lambda$  легкой цепи. Предпочтительный способ получения антитела согласно изобретению с нужным изотипом Ig включает этапы выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела против PD-1, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела против PD-1, получения вариабельного домена тяжелой цепи, лигирования вариабельного домена тяжелой цепи с константной областью тяжелой цепи нужного изотипа, экспрессии легкой цепи и лигированной тяжелой цепи в клетке, и сбора антитела против PD-1 с нужным изотипом.

[0115] Антитело против PD-1 согласно изобретению может быть молекулой IgG, IgM, IgG, IgA или IgD, но, как правило, имеет изотип IgG, например, IgG субкласса IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> или IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub> или IgG<sub>4</sub>. В одном варианте осуществления антитело является IgG<sub>1</sub>. В другом варианте осуществления антитело является IgG<sub>4</sub>.

[0116] В одном варианте осуществления антитело против PD-1 может включать по меньшей мере одну мутацию в Fc-области. Известно множество различных мутаций Fc, где такие мутации обеспечивают измененную эффекторную функцию. Например, во многих случаях требуется уменьшить или устранить эффекторную функцию, например, когда нежелательны взаимодействия лиганда/рецептора или в случае конъюгатов антитела-лекарственного средства.

[0117] В одном варианте осуществления антитело против PD-1 включает по меньшей мере одну мутацию в Fc-области, которая уменьшает эффекторную функцию. Аминокислотные положения в Fc-области, которые могут быть предпочтительными для мутации с целью уменьшения эффекторной функции, включают одно или более положений 228, 233, 234 и 235, где аминокислотные положения пронумерованы согласно схеме нумерации IMGT<sup>®</sup>.

[0118] В одном варианте осуществления один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 могут быть подвергнуты мутации, например, с заменой Leu на Ala (L234A/L235A). Такие мутации уменьшают эффекторную функцию Fc-области IgG<sub>1</sub> антител. Дополнительно или альтернативно, аминокислотный остаток в положении 228 может быть подвергнут мутации, например, с заменой на Pro. В другом варианте осуществления аминокислотный остаток в положении 233 может быть подвергнут мутации, например, с заменой на Pro, аминокислотный остаток в положении 234 может быть подвергнут мутации, например, с заменой на Val, и/или аминокислотный остаток в положении 235 может быть подвергнут мутации, например, с заменой на Ala.

Аминокислотные положения пронумерованы согласно схеме нумерации IMGT<sup>®</sup>.

[0119] В другом варианте осуществления, где антитело относится к субклассу IgG<sub>4</sub>, оно может включать мутацию S228P, т.е. с присутствием пролина в положении 228, где аминокислотное положение пронумеровано согласно схеме нумерации IMGT<sup>®</sup>. Такая мутация, как известно, уменьшает нежелательный обмен Fab-плечами.

[0120] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть согласно изобретению могут быть частью более крупной молекулы иммуноадгезии, образованной при ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или части антитела с одним или более другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование коровой области стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101 (1995)) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентной и биотинилированной молекулы

scFv (Kipriyanov et al., Mol. Immunol. 31:1047-1058 (1994)). Другие примеры включают случаи, когда одна или более CDR-областей из антитела включены в молекулу ковалентно или нековалентно, с превращением ее в иммуноадгезин, который специфично связывается с представляющим интерес антигеном. В таких вариантах осуществления CDR-область(и) может быть включена как часть более протяженной полипептидной цепи, может быть ковалентно связана с другой полипептидной цепью или может быть включена нековалентно.

[0121] В другом варианте осуществления может быть получено слитое антитело или иммуноадгезин, которые включают целое или часть антитела против PD-1 согласно изобретению, связанные с другим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления только вариабельные домены антитела против PD-1 соединены с полипептидом. В некоторых вариантах осуществления  $V_H$  домен антитела против PD-1 соединен с первым полипептидом, тогда как  $V_L$  домен антитела против PD-1 соединен со вторым полипептидом, который связывается с первым полипептидом таким образом, что  $V_H$  и  $V_L$  домены могут взаимодействовать друг с другом, образуя антигенсвязывающий участок. В другом предпочтительном варианте осуществления  $V_H$  домен отделен от  $V_L$  домена линкером таким образом, что  $V_H$  и  $V_L$  домены могут взаимодействовать друг с другом (например, одноцепочечные антитела). Затем антитело  $V_H$ -линкер- $V_L$  соединяют с представляющим интерес полипептидом. Кроме того, могут быть созданы слитые антитела, в которых два (или более) одноцепочечных антител соединены друг с другом. Это удобно, если нужно создать двухвалентное или поливалентное антитело на одной полипептидной цепи, или если требуется создать биспецифичное антитело.

[0122] Для создания одноцепочечного антитела (scFv),  $V_H$ - и  $V_L$ -кодирующие фрагменты ДНК функционально соединяют с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4-Ser)<sub>3</sub>, в результате чего  $V_H$  и  $V_L$  последовательности можно экспрессировать в виде сплошного одноцепочечного белка, в котором  $V_L$  и  $V_H$  домены соединены гибким линкером. См., например, Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); и McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990). Одноцепочечное антитело может быть моновалентным, если используется один  $V_H$  и  $V_L$ ; бивалентным, если используются два  $V_H$  и  $V_L$ ; или поливалентным, если используются больше двух  $V_H$  и  $V_L$ . Могут быть получены биспецифичные или поливалентные антитела, которые специфично связываются с человеческим PD-1 и, например, с другой молекулой.

[0123] В других вариантах осуществления другие модифицированные антитела могут быть получены при использовании молекул нуклеиновых кислот, кодирующих антитела против PD-1. Например, "каппа тела" (Ill et al., Protein Eng. 10:949-57 (1997)), "минитела" (Martin et al., EMBO J. 13:5303-9 (1994)), "диатела" (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)) или "Янусины" (Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991) и Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992)) могут быть получены при использовании стандартных методов молекулярной биологии в соответствии с настоящим описанием.

[0124] Антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть согласно изобретению могут быть дериватизированы или соединены с другой молекулой (например, другим пептидом или белком). Как правило, антитела или их части дериватизируют таким образом, чтобы дериватизация или мечение не оказывали негативного влияния на

связывание PD-1. Таким образом, предполагается, что антитела и части антител согласно изобретению включают интактные и модифицированные формы человеческих антител против PD-1, описанных в настоящей заявке. Например, антитело или часть антитела согласно изобретению могут быть функционально связаны (с помощью химического сшивания, генетического слияния, нековалентного связывания или иным образом) с одной или более другими молекулами, таким как другое антитело (например, биспецифичное антитело или диатело), детектирующее средство, фармацевтическое средство и/или белок или пептид, который может опосредовать ассоциацию антитела или части антитела с другой молекулой (такой как коровая область стрептавидина или полигистидиновая метка).

[0125] Один из типов дериватизированного антитела получают путем перекрестного связывания двух или более антител (одного типа или разных типов, например, для получения биспецифических антител). Подходящие сшивающие агенты включают соединения, которые являются гетеробифункциональными, имеющими две различные реакционноспособные группы, разделенные соответствующим спейсером (например, м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидоэфиром), или гомобифункциональными (например, дисукцинимидилсубератом). Такие линкеры можно приобрести в Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

[0126] Антитело против PD-1 также может быть дериватизировано химической группой, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ), метильной или этильной группой, или углеводной группой. Такие группы могут применяться для улучшения биологических свойств антитела, например, для увеличения полупериода существования в сыворотке крови.

[0127] Антитело согласно настоящему изобретению также может быть меченым.

При использовании в настоящем описании термины "метка" или "меченый" относятся к включению другой молекулы в антитело. В одном варианте осуществления метка является детектируемым маркером, например, при включении радиоизотопно-меченой аминокислоты или присоединении к полипептиду биотинильных групп, которые можно детектировать меченым авидином (например, стрептавидином, содержащим флуоресцентный маркер или ферментную активность, которая может быть обнаружена с помощью оптических или колориметрических методов). В другом варианте осуществления метка или маркер могут быть терапевтическими, например, конъюгатом лекарственного средства или токсином. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в уровне техники и могут применяться. Примеры меток для полипептидов включают, без ограничения перечисленными, следующее: радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), флуоресцентные метки (например, ФИТЦ, родамин, люминофоры на основе лантаноидов), ферментные метки (например, пероксидазу хрена,  $\beta$ -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные группы, определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, пары последовательностей лейциновых молний, связывающие участки для вторичных антител, металлосвязывающие домены, эпитопные метки), магнитные вещества, такие как хелаты гадолиния, токсины, такие как токсин коклюша, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидрокси-антрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, новокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин, а также их аналоги или гомологи. В некоторых вариантах осуществления метки присоединены

через спейсерные ножки различной длины для уменьшения потенциального стерического затруднения.

[0128] В некоторых вариантах осуществления антитела согласно изобретению могут присутствовать в нейтральной форме (включая цвиттер-ионные формы) или в виде положительно или отрицательно заряженных частиц. В некоторых вариантах осуществления антитела могут образовывать комплексы с противоионом, с получением фармацевтически приемлемой соли.

[0129] Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к комплексу, включающему одно или более антител и один или более противоионов, где противоионы получены из фармацевтически приемлемых неорганических и органических кислот и оснований.

#### *Биспецифичные связывающие молекулы*

[0130] В другом аспекте изобретения предложена биспецифичная связывающая молекула, обладающая специфичностью связывания антитела против PD-1, описанного в настоящей заявке, и специфичностью связывания другого антитела против PD-1 (например, другого антитела против PD-1, описанного в настоящей заявке) или антитела, которое направленно взаимодействует с другим белком, таким как другой белок иммунной контрольной точки, раковый антиген или другая молекула клеточной поверхности, активность которой опосредует развитие заболевания, такого как рак. Такие биспецифичные связывающие молекулы известны в уровне техники, и примеры различных типов биспецифичных связывающих молекул приведены в другом месте настоящего документа.

#### *Молекулы нуклеиновых кислот и векторы*

[0131] В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновых кислот и последовательности, кодирующие антитела против PD-1 или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления различные молекулы нуклеиновых кислот кодируют аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части. В других вариантах осуществления одна и та же молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части.

[0132] Ссылка на нуклеотидную последовательность охватывает соответствующую комплементарную последовательность, если не указано иное. Таким образом, необходимо понимать, что ссылка на нуклеиновую кислоту, имеющую конкретную последовательность, охватывает ее комплементарную цепь с соответствующей комплементарной последовательностью. Термин "полинуклеотид", как указано в настоящей заявке, означает полимерную форму нуклеотидов, длиной по меньшей мере 10 оснований, рибонуклеотидов или дезоксинуклеотидов, или модифицированной формы нуклеотида любого типа. Термин включает одноцепочечные и двухцепочечные формы.

[0133] В изобретении также предложены нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичны одной или более нуклеотидным последовательностям, указанным в настоящей заявке, например, нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 69-88. Термин "процент идентичности последовательности" в отношении последовательностей нуклеиновых кислот относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании с максимальным соответствием. Длина сравнения идентичности последовательности

может включать фрагмент из по меньшей мере приблизительно девяти нуклеотидов, обычно по меньшей мере приблизительно 18 нуклеотидов, чаще по меньшей мере приблизительно 24 нуклеотидов, типично по меньшей мере приблизительно 28 нуклеотидов, более типично по меньшей мере приблизительно 32 нуклеотидов и

5 предпочтительно по меньшей мере приблизительно 36, 48 или более нуклеотидов. Существует множество различных алгоритмов, известных в уровне техники, которые могут применяться для определения идентичности нуклеотидных последовательностей. Например, полинуклеотидные последовательности можно сравнивать при помощи FASTA, Gap или Bestfit, которые являются программами в пакете программ Wisconsin, версии 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, который

10 включает, например, программы FASTA2 и FASTA3, позволяет проводить выравнивания и определять процент идентичности последовательностей для областей с наилучшим перекрытием между запрашиваемой последовательностью и последовательностями, используемыми для поиска (см., например, публикации Pearson, Methods Enzymol. 183: 63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol.

15 266:227-258 (1996); и Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998); включенные в настоящую заявку посредством отсылки). Если не указано иное, используются параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процент идентичности последовательности для последовательностей нуклеиновых кислот может

20 быть определен при использовании FASTA с параметрами по умолчанию (размер слова 6 и коэффициент NOPAM для матрицы замен) или при использовании Gap с параметрами по умолчанию, как предусмотрено в GCG версии 6.1, включенных в настоящую заявку посредством отсылки.

[0134] В одном аспекте изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты,

25 включающая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 69-88.

[0135] В любом из вышеуказанных вариантов осуществления молекулы нуклеиновых кислот могут быть выделенными.

[0136] В другом аспекте настоящего изобретения предложен вектор, подходящий

30 для экспрессии одной из цепей антитела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящей заявке. Термин "вектор" при использовании в настоящем описании означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную к переносу другой нуклеиновой кислоты, с которой она была связана. В некоторых случаях вектор является плазмидой, то есть кольцевым двухцепочечным фрагментом ДНК, в который могут быть лигированы

35 дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления вектор является вирусным вектором, где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они были введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомные

40 векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, могут реплицироваться вместе с геномом клетки-хозяина. Кроме того, некоторые векторы обладают способностью направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. Такие

45 векторы указаны в настоящем описании как "рекомбинантные векторы экспрессии" (или просто "векторы экспрессии").

[0137] В изобретении предложены векторы, включающие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют тяжелую цепь антитела против PD-1 согласно изобретению



или его антигенсвязывающей части, легкую цепь антитела против PD-1 изобретения или его антигенсвязывающей части, или тяжелую и легкую цепи антитела против PD-1 изобретения или его антигенсвязывающей части. В изобретении также предложены векторы, включающие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты антител и соответствующие зонды.

[0138] Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую и/или легкую цепь антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части согласно настоящему изобретению может быть выделена из любого источника, который продуцирует такое антитело или часть. В различных вариантах осуществления молекулы нуклеиновых кислот выделяют из В-клеток, которые экспрессируют антитело против PD-1, выделенное у животного, иммунизированного антигеном PD-1 человека, или из иммортализованной клетки, полученной из такой В-клетки. Способы выделения нуклеиновых кислот, кодирующих антитело, известны в уровне техники. Можно выделять мРНК и использовать ее для получения кДНК для применения в полимеразной цепной реакции (ПЦР) или клонирования кДНК генов антитела. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению может быть синтезирована, а не выделена.

[0139] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению может включать нуклеотидную последовательность, кодирующую V<sub>H</sub> домен из антитела против PD-1 или антигенсвязывающей части согласно изобретению, соединенную в рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область тяжелой цепи из любого источника. Аналогичным образом, молекула нуклеиновой кислоты изобретения может включать нуклеотидную последовательность, кодирующую V<sub>L</sub> домен из антитела против PD-1 или антигенсвязывающей части согласно изобретению, соединенную в рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область легкой цепи из любого источника.

[0140] В другом аспекте изобретения молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие переменный домен тяжелой (V<sub>H</sub>) и/или легкой (V<sub>L</sub>) цепей, могут быть "превращены" в гены полноразмерного антитела. В одном варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> домены, превращают в полноразмерные гены антитела путем вставки в вектор экспрессии, уже кодирующий константные домены тяжелой цепи (CH) или константные домены легкой цепи (CL), соответственно, при этом V<sub>H</sub> сегмент функционально связан с CH сегментом(ами) в векторе, и/или V<sub>L</sub> сегмент функционально связан с CL сегментом в векторе. В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие V<sub>H</sub> и/или V<sub>L</sub> домены, превращают в полноразмерные гены антитела путем связывания, например лигирования, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей V<sub>H</sub> и/или V<sub>L</sub> домены, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CH и/или CL домен, при использовании стандартных методов молекулярной биологии. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полноразмерные тяжелые и/или легкие цепи, могут затем экспрессироваться из клетки, в которую они были введены, после чего антитело против PD-1 выделяют.

[0141] Молекулы нуклеиновых кислот могут применяться для рекомбинантной экспрессии больших количеств антител против PD-1. Молекулы нуклеиновых кислот также могут применяться для получения химерных антител, биспецифичных антител, одноцепочечных антител, иммуноадгезинов, диател, мутантных антител и производных антител, как описано в настоящей заявке.

[0142] В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению применяется в качестве зонда или ПЦР-праймера для определенной последовательности антитела. Например, нуклеиновая кислота может применяться в качестве зонда в диагностических способах, или в качестве ПЦР-праймера для амплификации областей ДНК, которые могут использоваться, среди прочего, для выделения дополнительных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих переменные домены антител против PD-1. В некоторых вариантах осуществления молекулами нуклеиновых кислот являются олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды получены из высоковариабельных доменов тяжелой и легкой цепей представляющего интерес антитела. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды кодируют полноразмерные или часть одной или более CDR-областей антител против PD-1 или антигенсвязывающих частей согласно настоящему изобретению, как описано в настоящей заявке.

[0143] В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот и векторы могут применяться для получения мутантных антител против PD-1. Антитела могут быть подвергнуты мутации в переменных доменах тяжелых и/или легких цепей, например, с целью изменения связывающих свойств антитела. Например, мутация может быть сделана в одной или больше CDR-областей с целью увеличения или уменьшения  $K_D$  антитела против PD-1, увеличения или уменьшения  $k_{off}$  или изменения специфичности связывания антитела. В другом варианте осуществления одна или более мутаций сделаны по аминокислотному остатку, который, как известно, изменен по сравнению с зародышевой линией в моноклональном антителе согласно изобретению. Мутации могут быть сделаны в CDR или каркасной области переменного домена, или в константной области. В предпочтительном варианте осуществления мутации сделаны в переменном домене. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций сделаны по аминокислотному остатку, который, как известно, изменен по сравнению с зародышевой линией в CDR или каркасной области переменного домена антитела или антигенсвязывающей части согласно настоящему изобретению.

[0144] В другом варианте осуществления мутации подвергают каркасную область (и) таким образом, чтобы полученная в результате каркасная область(и) имела аминокислотную последовательность соответствующего гена зародышевой линии. Мутация может быть сделана в каркасной области или константной области с целью увеличения периода полувыведения антитела против PD-1. См., например, публикацию PCT WO 00/09560. Мутация в каркасной области или в константном домене также может быть сделана для изменения иммуногенности антитела и/или для получения участка для ковалентного или нековалентного связывания с другой молекулой. Согласно изобретению одно антитело может иметь мутации в одной или более CDR-областей или каркасных областей переменного домена или в константной области.

[0145] В некоторых вариантах осуществления антитела против PD-1 согласно изобретению или их антигенсвязывающие части экспрессируют путем встраивания ДНК, кодирующих неполные или полноразмерные легкие и/или тяжелые цепи, полученные, как описано в настоящей заявке, в векторы экспрессии таким образом, чтобы гены были функционально соединены с необходимыми последовательностями регуляции экспрессии, такими как последовательности регуляции транскрипции и трансляции. Векторы экспрессии включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики; космиды, YAC, эписомы на основе ВЭБ и т.п. Последовательность, кодирующая антитело, может быть лигирована в вектор

таким образом, чтобы последовательности регуляции транскрипции и трансляции в данном векторе выполняли свою предполагаемую функцию регуляции транскрипции и трансляции последовательности, кодирующей антитело. Вектор экспрессии и последовательности регуляции экспрессии могут быть выбраны так, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином, используемой для экспрессии. Последовательность, кодирующая легкую цепь антитела, и последовательность, кодирующая тяжелую цепь антитела, могут быть встроены в отдельные векторы и могут быть функционально связаны с одними и теми же или разными последовательностями регуляции экспрессии (например, промоторами). В одном варианте осуществления обе кодирующие последовательности встроены в один вектор экспрессии и могут быть функционально связаны с одними и теми же последовательностями регуляции экспрессии (например, общим промотором), с отдельными идентичными последовательностями регуляции экспрессии (например, промоторами) или с разными последовательностями регуляции экспрессии (например, промоторами). Последовательности, кодирующие антитело, могут быть встроены в вектор экспрессии стандартными методами (например, путем лигирования комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и векторе, или лигирования тупых концов, если такие сайты рестрикции отсутствуют).

[0146] Удобный вектор представляет собой такой вектор, который кодирует функционально полную СН или СL последовательность иммуноглобулина человека, в котором соответствующие сайты рестрикции сконструированы таким образом, чтобы любую  $V_H$  или  $V_L$  последовательность можно было встраивать и экспрессировать, как описано выше. Кодирующие НС и LC гены в таких векторах могут содержать интронные последовательности, которые обеспечивают повышенные общие выходы белка антитела благодаря стабилизации соответствующей мРНК. Интронные последовательности фланкированы между донорными и акцепторными сайтами сплайсинга, которые определяют, где будет происходить сплайсинг РНК. Положение интронных последовательностей может находиться в переменных или константных областях цепей антитела, или в переменных и константных областях, в случае использования нескольких интронов. Полиаденилирование и терминация транскрипции могут происходить на нативных хромосомных участках, расположенных после кодирующих областей. Рекомбинантный вектор экспрессии также может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела может быть клонирован в вектор таким образом, чтобы такой сигнальный пептид был соединен с N-концом иммуноглобулиновой цепи в рамке считывания. Сигнальный пептид может быть сигнальным пептидом иммуноглобулина или гетерологичным сигнальным пептидом (то есть сигнальным пептидом не из иммуноглобулинового белка).

[0147] В дополнение к генам цепи антитела рекомбинантные векторы экспрессии согласно изобретению могут нести регуляторные последовательности, которые регулируют экспрессию генов цепи антитела в клетке-хозяине. Специалисту в данной области очевидно, что конструирование вектора экспрессии, в том числе выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор трансформируемой клетки-хозяина, уровень экспрессии нужного белка и т.п. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих включают вирусные элементы, которые направляют высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из LTR ретровирусов, цитомегаловируса (ЦМВ) (такие как промотор/энхансер ЦМВ), вируса обезьян 40 (SV40) (такие как промотор/энхансер SV40) и

аденовируса (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP)); промоторы полиомы и сильные промоторы млекопитающих, такие как нативные промоторы иммуноглобулина и актина. Дополнительное описание вирусных регуляторных элементов и их последовательности можно найти, например, в патентах США 5,168,062, 4,510,245 и 4,968,615. Способы экспрессии антител в растениях, в том числе описание промоторов и векторов, а также способы трансформации растений известны в уровне техники. См., например, патент США 6,517,529. Способы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или клетках грибов, например в дрожжевых клетках, также хорошо известно в уровне техники.

[0148] В дополнение к генам цепей антитела и регуляторным последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии согласно изобретению могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и селективные маркерные гены. Селективный маркерный ген облегчает отбор клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США 4,399,216, 4,634,665 и 5,179,017). Например, как правило, селективный маркерный ген придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, тем клеткам-хозяевам, в которые был введен данный вектор. Например, селективные маркерные гены включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr-клетках-хозяевах с отбором/амплификацией на метотрексате), ген neo (для отбора на G418) и ген глутамат-синтетазы.

[0149] Термин "последовательность регуляции экспрессии" при использовании в настоящем описании означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Последовательности регуляции экспрессии включают соответствующие последовательности инициации и терминации транскрипции, промоторные и энхансерные последовательности; сигналы эффективного процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (то есть консенсусную последовательность Козак); последовательности, которые повышают стабильность белка, и, при необходимости, последовательности, которые увеличивают секрецию белка. Природа таких регуляторных последовательностей отличается в зависимости от организма-хозяина; у прокариотов такие регуляторные последовательности обычно включают промотор, участок связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции; у эукариотов, как правило, такие регуляторные последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции. Предполагается, что термин "регуляторные последовательности" включает, как минимум, все компоненты, присутствие которых является необходимым для экспрессии и процессинга, а также данный термин может включать дополнительные компоненты, присутствие которых является предпочтительным, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров по слиянию.

#### *Клетки-хозяева и способы получения антител и композиций антител*

[0150] Дополнительный аспект изобретения относится к способам получения композиций антител и антител, и их антигенсвязывающих частей согласно настоящему изобретению. Один из вариантов осуществления данного аспекта изобретения относится к способу получения антитела, как определено в настоящей заявке, включающему получение рекомбинантной клетки-хозяина, способной экспрессировать антитело,

культивирование указанной клетки-хозяина при условиях, подходящих для экспрессии антитела, и выделение полученного в результате антитела. Антитела, полученные в результате такой экспрессии в таких рекомбинантных клетках-хозяевах, указаны в настоящей заявке как "рекомбинантные антитела". В изобретении также предложены

5 клетки потомства таких клеток-хозяев и антитела, продуцируемые ими.

[0151] Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") при использовании в настоящем описании означает клетку, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. В изобретении предложены клетки-хозяева, которые могут включать, например, вектор согласно изобретению, описанный выше. В

10 изобретении также предложены клетки-хозяева, которые включают, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или обе таких последовательности антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части согласно изобретению. Следует

15 понимать, что "рекомбинантная клетка-хозяин" и "клетка-хозяин" означают не только конкретную рассматриваемую клетку, но также и потомство такой клетки. Поскольку некоторые модификации могут происходить в последующих поколениях вследствие мутации или воздействий факторов окружающей среды, такое потомство, фактически, может не быть идентичным исходной клетке, но при этом все же будет включено в

20 рамки термина "клетка-хозяин", используемого в настоящем описании.

[0152] Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела против PD-1, и векторы, включающие такие молекулы нуклеиновых кислот, могут применяться для трансфекции подходящей клетки-хозяина млекопитающего, растения, бактериальной или дрожжевой клетки-хозяина. Трансформация может быть выполнена с помощью любого известного

25 способа введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в уровне техники и включают опосредованную декстраном трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(ов) в липосомах и прямую микроинъекцию ДНК

30 в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновых кислот могут быть введены в клетки млекопитающих при использовании вирусных векторов. Способы трансформации клеток хорошо известны в уровне техники. См., например, патенты США 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 и 4,959,455. Способы трансформации клеток растений хорошо известны в уровне техники и включают, например, *Agrobacterium*-опосредованную

35 трансформацию, биолистическую трансформацию, прямую инъекцию, электропорацию и вирусную трансформацию. Способы трансформации бактериальных и дрожжевых клеток также хорошо известны в уровне техники.

[0153] Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, известны в уровне техники и включают различные иммортализованные клеточные

40 линии, доступные в Американской коллекции типовых культур (ATCC). Они включают, среди прочих, клетки яичников китайского хомячка (CHO), клетки NS0, клетки SP2, клетки НЕК-293Т, клетки 293 Freestyle (Invitrogen), клетки NIH-3Т3, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (ВНК), клетки почки африканской зеленой марышки (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2), клетки

45 А549 и многие другие клеточные линии. Наиболее предпочтительные клеточные линии выбирают путем определения клеточных линий, имеющих высокие уровни экспрессии. Другими клеточными линиями, которые могут применяться, являются линии клеток насекомых, такие как клетки Sf9 или Sf21. При введении рекомбинантных векторов

экспрессии, кодирующих гены антител, в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают в результате культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для экспрессии антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, секрети антитела в среду культивирования, в которой выращивали такие клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из среды культивирования с помощью стандартных способов очистки белка. Растительные клетки-хозяева включают, например, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ряску, кукурузу, пшеницу, картофель и т.п. Бактериальные клетки-хозяева включают виды *E. coli* и *Streptomyces*. Дрожжевые клетки-хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

[0154] Кроме того, экспрессия антител согласно изобретению или их антигенсвязывающих частей из линий клеток-продуцентов может быть повышена путем применения ряда известных методов. Например, система экспрессии гена глутаминсинтетазы (система GS) является стандартным методом повышения экспрессии в некоторых условиях. Система GS полностью или частично обсуждается в патентах EP 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 и 0 338 841.

[0155] Вполне вероятно, что антитела, экспрессируемые различными линиями клеток или у трансгенных животных, будут иметь различный профиль гликозилирования. Однако все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновых кислот, представленными в настоящей заявке, или включающие представленные в настоящей заявке аминокислотные последовательности, являются частью настоящего изобретения, независимо от характера гликозилирования таких антител, и, в более широком смысле, независимо от присутствия или отсутствия посттрансляционной модификации(й).

#### Фармацевтические композиции

[0156] Другим аспектом изобретения является фармацевтическая композиция, включающая в качестве действующего вещества (или в качестве единственного действующего вещества) антитело против PD-1 или его антигенсвязывающую часть, или композицию антитела против PD-1 согласно изобретению. Фармацевтическая композиция может включать любую композицию антитела против PD-1 или антитело, или его антигенсвязывающую часть, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для облегчения, профилактики и/или лечения PD-1-ассоциированного нарушения (например, нарушения, характеризующего повышенной экспрессией или повышенной активностью PD-1) и/или рака. В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для активации иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для облегчения, профилактики и/или лечения рака, возникающего в таких тканях, как кожа, легкое, кишечник, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гемопоэтическая система, голова и шея, печень, мочевой пузырь, молочная железа, желудок, матка и поджелудочная железа.

[0157] Как правило, антитела согласно изобретению или их антигенсвязывающие части пригодны для введения в лекарственной форме в сочетании с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, например, как описано ниже.

[0158] Фармацевтические композиции согласно изобретению будут включать одно или более антител против PD-1 или связывающие части согласно изобретению, например, одно или два антитела против PD-1 или связывающие части. В одном варианте осуществления композиция включает одно антитело против PD-1 согласно изобретению или его связывающую часть.

[0159] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция может

включать по меньшей мере одно антитело против PD-1 или его антигенсвязывающую часть, например одно антитело против PD-1 или часть, и одно или более дополнительных антител, которые направлены взаимодействуют с одним или более соответствующими рецепторами клеточной поверхности, например, одним или более рецепторами, ассоциированными с раком.

[0160] Термин "вспомогательное вещество" используется в настоящей заявке для описания любого компонента кроме соединения(й) согласно изобретению. Выбор вспомогательного вещества (веществ) в большой степени будет зависеть от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние вспомогательного вещества на растворимость и стабильность, а также природа лекарственной формы. При использовании в настоящем описании "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" включает любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, противобактериальные и противогрибковые средства, изотонические вещества и вещества, задерживающие абсорбцию, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Некоторыми примерами фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ являются вода, раствор хлорида натрия, фосфатно-солевой буферный раствор, декстроза, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях в композицию предпочтительно включают изотонические вещества, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Дополнительными примерами фармацевтически приемлемых веществ являются смачивающие вещества или малые количества таких вспомогательных веществ, как смачивающие или эмульгирующие вещества, консерванты или буферные вещества, которые увеличивают срок хранения или эффективность антитела.

[0161] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению и способы их изготовления будут известны специалистам в данной области техники. Такие композиции и способы их изготовления можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19<sup>th</sup> Edition (Mack Publishing Company, 1995). Производство фармацевтических композиций предпочтительно осуществляют в соответствии со стандартом GMP (Правила производства и контроля качества лекарственных средств).

[0162] Фармацевтическая композиция изобретения может быть изготовлена, упакована или поставлена в нефасованной форме, в виде единичной стандартной дозы или в виде множества единичных стандартных доз. При использовании в настоящем описании "стандартная доза" представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, включающее заданное количество действующего вещества. Количество действующего вещества обычно равно дозе действующего вещества, которое будут вводить субъекту, или удобной части такой дозы, такой как, например, половина или треть такой дозы.

[0163] Любой способ введения пептидов, белков или антител, общепринятый в данной области техники, может соответственно применяться для антител и антигенсвязывающих частей согласно изобретению.

[0164] Фармацевтические композиции изобретения обычно подходят для парентерального введения. При использовании в настоящем описании "парентеральное введение" фармацевтической композиции включает любой путь введения, характеризующийся физическим нарушением целостности ткани субъекта и введением фармацевтической композиции в ткань через образовавшийся разрыв, что обычно приводит к прямому введению в кровоток, в мышцу или во внутренний орган. Парентеральное введение, таким образом, включает, без ограничения перечисленным, введение фармацевтической композиции посредством инъекции композиции, посредством

применения композиции через хирургический разрез, посредством применения композиции через проникающую нехирургическую рану и т.п. В частности, предполагается, что парентеральное введение включает, без ограничения перечисленным, подкожную, внутривенную, внутримышечную, внутривенную, внутриаартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, внутриуретральную, внутричерепную и внутрисуставную инъекцию или инфузии; и методы диализной инфузии почки. Также предусмотрена регионарная перфузия. Предпочтительные варианты осуществления включают внутривенный и подкожный пути.

[0165] Лекарственные формы фармацевтической композиции, подходящие для парентерального введения, как правило, включают действующее вещество, объединенное с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический раствор хлорида натрия. Такие лекарственные формы могут быть изготовлены, упакованы или поставлены в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Лекарственные формы для инъекций могут быть изготовлены, упакованы или поставлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах, содержащих консервант. Лекарственные формы для парентерального введения включают, без ограничения перечисленными, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных растворителях, пасты и т.п. Такие лекарственные формы могут дополнительно содержать один или более дополнительных компонентов, в том числе, без ограничения перечисленными, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие вещества. В одном варианте осуществления лекарственной формы для парентерального введения действующее вещество представлено в сухой (т.е. в порошковой или гранулированной) форме для восстановления подходящим растворителем (например, стерильной апиогенной водой) перед парентеральным введением восстановленной композиции. Лекарственные формы для парентерального применения также включают водные растворы, которые могут содержать такие вспомогательные вещества, как соли, углеводы и буферные вещества (предпочтительно с рН от 3 до 9), однако в случае некоторых применений они могут быть, более предпочтительно, изготовлены в форме стерильного неводного раствора или в сухой форме, применяемой вместе с подходящим растворителем, таким как стерильная апиогенная вода. Примеры форм для парентерального введения включают растворы или суспензии в стерильных водных растворах, например водных растворах пропиленгликоля или декстрозы. Такие лекарственные формы при необходимости могут содержать подходящие буферные вещества. Другие лекарственные формы для парентерального применения, которые могут использоваться, включают такие лекарственные формы, которые содержат действующее вещество в микрокристаллической форме или в липосомальном препарате. Лекарственные формы для парентерального введения могут быть изготовлены в форме с немедленным и/или модифицированным высвобождением. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, импульсное, регулируемое, направленное и программируемое высвобождение.

[0166] Например, в одном аспекте стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены путем включения антитела против PD-1 или его антигенсвязывающей части, или композиции антитела против PD-1 в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией компонентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсию получают при включении действующего соединения в стерильный растворитель,



который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые компоненты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами изготовления являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, которые позволяют получать порошок действующего вещества плюс любой дополнительный требуемый компонент из его предварительно простерилизованного фильтрованием раствора. Требуемую текучесть раствора можно поддерживать, например, при помощи покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии, и при помощи поверхностно-активных веществ. Пролонгированную абсорбцию композиций для инъекций можно обеспечить посредством включения в композицию вещества, которое задерживает абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина, и/или при помощи покрытий с модифицированным высвобождением (например, покрытий с замедленным высвобождением).

[0167] Антитела согласно изобретению также можно вводить интраназально или путем ингаляции, как правило, в форме сухого порошка (отдельно, в виде смеси или в частице из смеси компонентов, например, смеси с подходящим фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом), из ингалятора сухого порошка, в виде аэрозольного спрея из контейнера под давлением, насоса, спрея, распылителя (предпочтительно распылителя, в котором электрогидродинамическое устройство применяется для получения тонкодисперсного аэрозоля) или небулайзера, с применением или без применения подходящего пропеллента, или в виде назальных капель.

[0168] Контейнер под давлением, насос, спрей, распылитель или небулайзер обычно содержат раствор или суспензию антитела согласно изобретению, включающие, например, подходящее диспергирующее вещество, солюбилизующее вещество или вещество, обеспечивающее пролонгированное высвобождение действующего вещества, пропеллент(ы) в качестве растворителя.

[0169] Перед применением в форме сухого порошка или суспензии, фармацевтический продукт обычно микронизируют с получением частиц, имеющих размер, подходящий для доставки ингаляцией (как правило, меньше 5 микрон). Это может быть выполнено с помощью любого подходящего способа измельчения, такого как размол в спиральной струйной мельнице, размол в струйной мельнице с псевдоожиженным слоем, обработка сверхкритической жидкостью с получением наночастиц, гомогенизация высокого давления или сушка распылением.

[0170] Могут быть изготовлены капсулы, блистеры и картриджи для применения в ингаляторе или инсуффляторе, содержащие порошковую смесь соединения согласно изобретению, подходящую порошковую основу и модификатор технологических показателей.

[0171] Подходящая форма раствора для применения в распылителе, в котором электрогидродинамическое устройство используется для получения тонкодисперсного аэрозоля, может содержать подходящую дозу антитела согласно изобретению за одно нажатие, при этом выпускаемый при нажатии объем может изменяться, например, от 1 мкл до 100 мкл.

[0172] Подходящие ароматизаторы, такие как ментол и левоментол, или подсластители, такие как сахарин или сахаринат натрия, могут быть добавлены в такие лекарственные формы согласно изобретению, предназначенные для ингаляционного/интраназального применения.

[0173] Могут быть изготовлены лекарственные формы для ингаляционного/интраназального применения с немедленным и/или модифицированным

высвобождением. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, импульсное, регулируемое, направленное и программируемое высвобождение.

[0174] В случае ингаляторов сухого порошка и аэрозолей единичную дозу определяют посредством клапана, который выпускает дозированное количество. Единицы в соответствии с изобретением, как правило, отрегулированы для введения отмеренной дозы или "нажатия" антитела согласно изобретению. Полную суточную дозу, как правило, вводят в одной дозе или, что более характерно, в разделенных дозах в течение дня.

[0175] Антитела и части антител согласно изобретению также могут быть включены в лекарственную форму для применения внутрь. Пероральное введение может включать глотание, при этом соединение поступает в желудочно-кишечный тракт, и/или буккальное, лингвальное или подъязычное введение, при котором соединение поступает в кровоток непосредственно из ротовой полости.

[0176] Лекарственные формы, подходящие для перорального введения, включают твердые, полутвердые и жидкие системы, такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие мульти- или наночастицы, жидкости или порошки; таблетки для рассасывания (включая наполненные жидкостью); пастилки; гели; быстро диспергируемые лекарственные формы; пленки; суппозитории; спреи; и

транsbуккальные/мукоадгезивные пластыри.

[0177] Жидкие лекарственные формы включают суспензии, растворы, сиропы и настойки. Такие лекарственные формы могут применяться в качестве наполнителей в мягких или твердых капсулах (изготовленных, например, из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы) и, как правило, включают носитель, например, воду, этанол, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, метилцеллюлозу или подходящее масло, и один или более эмульгирующих веществ и/или суспендирующих веществ. Жидкие лекарственные формы также могут быть приготовлены при восстановлении твердой формы, например, из пакетика.

#### *Терапевтические применения антител и композиций изобретения*

[0178] В одном аспекте антитела против PD-1 и их антигенсвязывающие части, композиции антител против PD-1 и биспецифичные связывающие молекулы согласно изобретению применяются для усиления или активации иммунной системы у нуждающегося в этом человека. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет состояние, характеризующееся повышенной экспрессией или повышенной активностью PD-1. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет иммуносупрессию. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, композиции или фармацевтическая композиция биспецифичной связывающей молекулы предназначены для применения в лечении рака, например, раковых опухолей, которые возникают в таких тканях, как кожа, легкое, кишечник, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, гемопозитическая система, голова и шея, печень, мочевого пузырь, молочная железа, желудок, матка и поджелудочная железа, а также любых раковых опухолей или других состояний, которые ассоциированы с активностью PD-1, или при которых у пациента экспрессируется или повышенно экспрессируется PD-L1, PD-L2 или оба из них. Раковые опухоли, подвергаемые лечению антителами против PD-1, их антигенсвязывающими частями, композициями антитела против PD-1 и/или биспецифичными связывающими молекулами согласно изобретению, могут включать, например, меланому (такую как неизлечимая меланома или неоперабельная, или метастатическая меланома), немелкоклеточный рак легкого, рак

мочевого пузыря, плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак яичника, рак толстой и прямой кишки, лимфому Ходжкина и почечно-клеточную карциному (RCC).

[0179] В некоторых вариантах осуществления раковые опухоли, подвергаемые лечению антителами против PD-1, антигенсвязывающими частями, композициями антител против PD-1 и/или биспецифичными связывающими молекулами согласно изобретению, могут включать, например, меланому (например, неизлечимую или метастатическую меланому), немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак головы и шеи, почечно-клеточную карциному, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, глиобластому, глиому, почечно-клеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, гепатоцеллюлярную карциному, рак мочевого пузыря, рак верхних мочевыводящих путей, рак пищевода, рак желудочно-пищеводного соединения, рак желудка, рак печени, рак толстой кишки, карциному толстой и прямой кишки, множественную миелому, саркомы, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром, рак носоглотки, хронический лимфолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, рак яичника, рак желудочно-кишечного тракта, первичный рак брюшины, рак маточной трубы, уротелиальный рак, ТЛВЧ-ассоциированный Т-клеточный лейкоз/лимфому, рак предстательной железы, рак урогенитальной системы, менингиому, аденокортикальный рак, глиосаркому, фибросаркому, рак почки, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак эндометрия, базально-клеточный рак кожи, рак аппендикса, рак желчных протоков, рак слюнной железы, неизлечимый рак из клеток Меркеля, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, мезотелиому и солидные опухоли.

[0180] "Лечить" и "лечение" относятся к способу облегчения или устранения биологического нарушения и/или по меньшей мере одного из его сопутствующих симптомов. При использовании в настоящем описании "облегчение" заболевания, нарушения или состояния означает уменьшение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, нарушения или состояния. Кроме того, ссылки в настоящей заявке на "лечение" включают ссылки на лечебное, паллиативное и профилактическое лечение.

[0181] "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству применяемого терапевтического средства, которое будет до некоторой степени облегчать один или более симптомов подвергаемого лечению нарушения. Терапевтически эффективное количество противоопухолевого терапевтического средства может привести к уменьшению опухоли, увеличению выживаемости, устранению раковых клеток, уменьшению прогрессирования заболевания, прекращению метастаза или другим клиническим результатам, требуемым медицинским работникам.

[0182] Композиции антител или антитела, или их антигенсвязывающие части согласно изобретению могут вводить отдельно или в комбинации с одним или более другими лекарственными средствами или антителами (или в их любой комбинации). Фармацевтические композиции, способы и применения согласно изобретению, таким образом, также охватывают варианты осуществления комбинаций (совместное введение) с другими активными средствами, как подробно описано ниже.

[0183] При использовании в настоящем описании предполагается, что термины "совместное введение", "совместно вводимые" и "в комбинации с" в отношении композиций антител и антител, и их антигенсвязывающих частей согласно изобретению с одним или более другими терапевтическими средствами означают и действительно относятся к, и включают следующее:

- одновременное введение такой комбинации композиции антитела/антитела/антигенсвязывающей части согласно изобретению и терапевтического средства (средств) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты включены вместе в одну лекарственную форму, которая высвобождает указанные компоненты по существу в

одно и то же время в организме указанного пациента,

- по существу одновременное введение такой комбинации композиции антитела/антитела/антигенсвязывающей части согласно изобретению и терапевтического средства (средств) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты включены отдельно друг от друга в отдельные лекарственные формы, которые указанный пациент принимает по существу в одно и то же время, после чего указанные компоненты высвобождаются по существу в одно и то же время в организме указанного пациента,

- последовательное введение такой комбинации композиции антитела/антитела/антигенсвязывающей части согласно изобретению и терапевтического средства (средств) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты включены отдельно друг от друга в отдельные лекарственные формы, которые указанный пациент принимает последовательно, со значительным временным интервалом между каждым введением, после чего указанные компоненты высвобождаются по существу в разное время в организме указанного пациента; и

- последовательное введение такой комбинации композиции антитела/антитела/антигенсвязывающей части согласно изобретению и терапевтического средства (средств) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты включены вместе в одну лекарственную форму, которая высвобождает указанные компоненты регулируемым способом, после чего они одновременно, последовательно и/или с перекрытием высвобождаются в одно и то же и/или разное время в организме указанного пациента,

где каждую часть могут вводить одним и тем же или разными путями.

[0184] Композиции антител и антитела, и их антигенсвязывающие части согласно изобретению могут вводить без дополнительного терапевтического лечения, т.е. в качестве самостоятельной терапии. В альтернативе лечение композициями антител и антителами, и антигенсвязывающими частями согласно изобретению может включать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое лечение (комбинированную терапию). В некоторых вариантах осуществления композицию антитела или антитело, или антигенсвязывающую часть можно вводить совместно или включать в лекарственную форму вместе с другим лекарственным веществом/средством для лечения рака. Дополнительное терапевтическое лечение может включать, например,

химиотерапевтическое, противоопухолевое или антиангиогенное средство, другое противоопухолевое антитело и/или лучевую терапию.

[0185] При комбинировании композиций антител, антител или антигенсвязывающих частей согласно изобретению со средствами, которые, как известно, вызывают конечную дифференцировку раковых клеток, действие может быть дополнительно усилено. Такие соединения, например, могут быть выбраны из группы, включающей ретиноевую кислоту, транс-ретиноевые кислоты, цис-ретиноевые кислоты, фенилбутират, фактор роста нервов, диметилсульфоксид, активную форму витамина D3, активируемый пролифератором пероксисом гамма-рецептор, 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат, гексаметилен-бис-ацетамид, трансформирующий фактор роста бета, масляную кислоту, циклический АМФ и веснаринон. В некоторых вариантах осуществления соединения выбирают из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, фенилбутирата, полностью транс-ретиноевой кислоты и активной формы витамина D.

[0186] Фармацевтические продукты, включающие композицию антитела против PD-1

или антитело против PD-1, или его антигенсвязывающую часть согласно изобретению и по меньшей мере еще одно средство (например, химиотерапевтическое, противоопухолевое или антиангиогенное средство), могут применяться в качестве комбинированного лечения для одновременного, отдельного или последовательного применения в терапии рака. Другое средство может быть любым средством, подходящим для лечения конкретного рассматриваемого рака, например, средством, выбранным из группы, состоящей из алкилирующих средств, например, производных платины, таких как цисплатин, карбоплатин и/или оксалиплатин; растительных алкоидов, например, паклитаксела, доцетаксела и/или иринотекана; противоопухолевых антибиотиков, например, доксорубицина (адриамицина), даунорубицина, эпирубицина, идарубицина, митоксантрона, дактиномицина, блеомицина, актиномицина, лутеомицина и/или митомицина; ингибиторов топоизомеразы, таких как топотекан; и/или антиметаболитов, например, фторурацила и/или других фторпиримидинов.

[0187] Антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть, или композиция антитела против PD-1 согласно изобретению также могут применяться в комбинации с другими противоопухолевыми терапиями, такими как вакцины, цитокины, ингибиторы ферментов и Т-клеточные терапии. В случае вакцины это может быть, например, белковая, пептидная или ДНК вакцина, содержащая один или более антигенов, которые соответствуют раку, подвергаемому лечению, или вакцина, включающая дендритные клетки вместе с антигеном. Подходящие цитокины включают, например, IL-2, IFN-гамма и ГМ-КСФ. Примером типа ингибитора фермента, который обладает противоопухолевой активностью, является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО), например, 1-метил-D-триптофан (1-D-MT). Адоптивная Т-клеточная терапия относится к различным методам иммунотерапии, которые включают размножение или генно-инженерную модификацию собственных Т-клеток пациента, чтобы они могли распознавать и атаковать их опухоли.

[0188] Также предполагается, что антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть, или композиция антитела против PD-1 согласно изобретению могут применяться во вспомогательной терапии в сочетании с ингибиторами тирозинкиназы. Это - синтетические, являющиеся главным образом производными хиназолина, низкомолекулярные соединения, которые взаимодействуют с внутриклеточным тирозинкиназным доменом рецепторов и вызывают ингибирование лиганд-индуцированного фосфорилирования рецепторов, конкурируя за внутриклеточный Mg-АТФ связывающий участок.

[0189] В некоторых вариантах осуществления композиция антитела или антитело, или его антигенсвязывающая часть могут применяться в комбинации с другим лекарственным веществом/средством, которое опосредует активацию иммунной системы, включающим, без ограничения перечисленными, средство, которое опосредует экспрессию или активность A2AR, BLTA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD27, CD28, CD40, CD55, CD73, CD122, CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (например, CEACAM-1 и/или CEACAM-5), GAL9, GITR, HVEM, ICOS, IDO, KIR, LAIR1, LAG-3, OX40, TIGIT, TIM-3, TGFR-бета, VISTA и/или 2B4. В некоторых вариантах осуществления средство является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с одной из вышеуказанных молекул. В некоторых вариантах осуществления композиция антитела или антитело, или его антигенсвязывающая часть согласно изобретению могут применяться в комбинации с ингибитором CTLA-4 (например, антителом против CTLA-4, таким как тремелимуаб или ипилимуаб). В одном варианте осуществления композицию антитела или антитело, или его

антигенсвязывающую часть согласно изобретению могут вводить в комбинации с ипилимумабом.

[0190] В некоторых аспектах антитела и антигенсвязывающие части согласно изобретению могут применяться в комбинации с другим ингибитором пути PD-1, который может направленно воздействовать на PD-1 или на один из его лигандов. Примеры таких ингибиторов включают другие антитела против PD-1, антитела против PD-L1 и антитела против PD-L2. В некоторых вариантах осуществления композицию антитела, антитело и/или антигенсвязывающую часть согласно изобретению могут вводить в комбинации с пембролизумабом и/или ниволумабом.

[0191] Следует понимать, что композиции антител и антитела, и их антигенсвязывающие части согласно изобретению могут применяться в способе лечения, как описано в настоящей заявке, могут быть предназначены для применения в лечении, как описано в настоящей заявке, и/или могут быть предназначены для применения в производстве лекарственного средства для лечения, как описано в настоящей заявке,

#### *Доза и путь введения*

[0192] Композиции антител согласно изобретению будут вводить в эффективном количестве для лечения рассматриваемого состояния, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, подвергаемое лечению, возраст, пол и вес пациента, а также от того, применяются ли антитела в качестве самостоятельного лечения или в комбинации с одним или более дополнительными типами противоопухолевого лечения.

[0193] Схемы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального требуемого эффекта. Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько отделенных доз в течение времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от потребностей в терапевтической ситуации. Особенно выгодно включать парентеральные композиции в стандартную лекарственную форму для простоты введения и единообразия дозирования. Стандартная лекарственная форма, при использовании в настоящей заявке, относится к физически дискретным единицам, которые подходят в качестве стандартных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, вычисленное так, чтобы оказывать требуемое терапевтическое воздействие, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Требования к стандартным лекарственным формам согласно изобретению обычно продиктованы следующим и непосредственно зависят от: (а) уникальных свойств химиотерапевтического средства и конкретного терапевтического или профилактического действия, которое требуется достичь, и (б) ограничений, характерных для изготовления смесей такого активного соединения для лечения чувствительности у отдельных субъектов.

[0194] Таким образом, специалист на основе описания, представленного в настоящей заявке, сумеет оценить, что дозу и схему дозирования корректируют в соответствии со способами, известными в области терапии. Таким образом, максимальная переносимая доза может быть с легкостью установлена, при этом также может быть определено эффективное количество, обеспечивающее обнаружимое терапевтическое воздействие на пациента, как и временные требования для применения каждого средства, которые обеспечивают обнаружимое терапевтическое воздействие на пациента. Таким образом, хотя примеры определенной дозы и схемы введения представлены в настоящей заявке, такие примеры никоим образом не ограничивают дозу и схему введения, которые можно предоставить пациенту при осуществлении настоящего изобретения.

[0195] Следует отметить, что значения доз могут изменяться в зависимости от типа и тяжести состояния, которое надлежит облегчить, и могут включать одну или множество доз. Также необходимо понимать, что для каждого конкретного субъекта определенные схемы дозирования нужно корректировать с течением времени в зависимости от индивидуальной потребности и профессионального решения лица, осуществляющего или контролирующего применение композиций, при этом такие диапазоны дозы, представленные в настоящей заявке, являются лишь примерными и не должны ограничивать объем или практическое применение конкретной композиции. Кроме того, схема дозирования с применением композиций настоящего изобретения может быть основана на различных факторах, включающих тип заболевания, возраст, вес, пол, медицинское состояние пациента, тяжесть состояния, пути введения и конкретное применяемое антитело. Таким образом, схема дозирования может значительно различаться, но может быть определена в общем порядке при использовании стандартных методов. Например, дозы можно корректировать на основе фармакокинетических или фармакодинамических параметров, которые могут включать такие клинические действия, как токсические действия и/или лабораторные показатели. Таким образом, настоящее изобретение охватывает повышение дозы у отдельных пациентов, определяемое специалистом в данной области. Определение соответствующих доз и схем известно в данной области техники и, как подразумевается, будет известно специалисту при ознакомлении с описанием, раскрытым в настоящем документе.

[0196] Предполагается, что подходящая доза композиции антитела согласно изобретению будет находиться в диапазоне 0,1-100 мг/кг, таком как приблизительно 0,5-50 мг/кг, например, приблизительно 1-20 мг/кг. Композиция антитела, например, может применяться в дозе по меньшей мере 0,25 мг/кг, например, по меньшей мере 0,5 мг/кг, такой как по меньшей мере 1 мг/кг, например, по меньшей мере 1,5 мг/кг, такой как по меньшей мере 2 мг/кг, например, по меньшей мере 3 мг/кг, такой как по меньшей мере 4 мг/кг, например, по меньшей мере 5 мг/кг; и например, до не более чем 50 мг/кг, такой как до не более чем 30 мг/кг, например, до не более чем 20 мг/кг, такой как не более чем 15 мг/кг. Введение обычно будут повторять с подходящими интервалами, например, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели, и настолько долго, насколько сочтет подходящим ответственный врач, который необязательно сможет увеличить или уменьшить дозу при необходимости.

[0197] Эффективное количество для лечения опухолей может быть измерено по способности такого количества стабилизировать прогрессирование заболевания и/или облегчать симптомы у пациента, и, предпочтительно, вызывать регрессию заболевания, например, путем уменьшения размера опухоли. Способность антитела или композиции согласно изобретению ингибировать рак может быть оценена с помощью анализов *in vitro*, например, как описано в примерах, а также в подходящих моделях на животных, которые позволяют прогнозировать эффективность в отношении опухолей у человека. Подходящие схемы дозирования будут выбирать для обеспечения оптимального терапевтического ответа в каждой конкретной ситуации, например, при однократном болюсном введении или при введении непрерывной инфузией, и с возможной коррекцией дозы в соответствии с требованиями в каждом конкретном случае.

#### *Диагностические применения и композиции*

[0198] Антитела согласно настоящему изобретению также могут применяться в диагностических способах (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, антитела могут применяться для обнаружения и/или измерения уровня PD-1 в образце пациента (например, образце ткани или образце физиологической жидкости, таком как

воспалительный экссудат, кровь, сыворотка, кишечный сок, слюна или моча).

Подходящие способы обнаружения и измерения включают иммунологические методы, такие как проточную цитометрию, твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), хемилюминесцентные анализы, радиоиммуноанализ и иммуногистохимию. Изобретение также охватывает наборы (например, диагностические наборы), включающие антитела, описанные в настоящей заявке.

[0199] Если не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, которые обычно известны специалистам в данной области техники. Примеры способов и материалов описаны ниже, хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, также могут использоваться при практическом применении или проверке настоящего изобретения. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу.

[0200] Как правило, номенклатура, используемая в отношении, а также методики, культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, лекарственной и фармацевтической химии, а также химии и гибридизации белков и нуклеиновых кислот, хорошо известна и широко используется в данной области техники. Ферментативные реакции и способы очистки проводят в соответствии с инструкциями производителя, как обычно принято в данной области техники или как описано в настоящем документе.

[0201] Кроме того, если иное не следует из контекста, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. По всему тексту настоящего описания и вариантов осуществления слова "иметь" и "содержать" или вариации, такие как "имеет", "имеющий", "включает" или "включающий", будут означать включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение какого-либо другого целого числа или группы целых чисел.

[0202] Все публикации и другие источники, указанные в настоящем документе, полностью включены посредством отсылки. Хотя в настоящем документе цитируют ряд документов, такое цитирование не является признанием того, что какой-либо из этих документов является частью общеизвестных знаний в уровне техники.

[0203] Для лучшего понимания настоящего изобретения представлены следующие примеры. Эти примеры предназначены исключительно для иллюстрации и не должны рассматриваться как какое-либо ограничение объема изобретения.

## ПРИМЕРЫ

### **Пример 1: Клонирование антител против PD-1 из куриных В-клеток**

[0204] Клонирование куриных генов антитела из антитело-секретирующих В-клеток (АСК) выполняли с помощью технологии поиска антител Symplex<sup>TM</sup>. Коротко, АСК выделяли из лимфоидных органов куриц, которых иммунизировали антигеном PD-1 в виде растворимого белкового антигена и/или в его нативной мембраносвязанной форме, экспонированной на эукариотических клетках. Окрашивание АСК флуоресцентно-мечеными антителами позволяло дифференцировать АСК от других клеток (например, Т-клеток, наивных В-клеток, моноцитов и т.д.) перед сортировкой в пробирках для ПЦР. Одну сортировку АСК проводили с помощью проточной цитометрии. После этого процедуру Symplex<sup>TM</sup> проводили с целью получения ПЦР-продуктов, содержащих когнатные пары V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> для каждой отсортированной В-клетки, как описано далее.



[0205] Связывание кодирующих  $V_H$  и  $V_L$  последовательностей выполняли на отсортированных АСК, облегчая когнатное спаривание последовательностей. В данном процессе использовали процедуру двухэтапной ПЦР на основе одноэтапной мультиплексной ОТ-ПЦР с перекрывающимися праймерами, с последующей гнездовой ПЦР. Принцип связывания когнатных последовательностей  $V_H$  и  $V_L$  с применением технологии Symplex<sup>TM</sup> подробно описан в WO 2005/042774; WO 2008/104184; WO 2010/022738 и в публикации Meijer et al., J Mol Biol 358(3):764-72 (2006). Коротко, амплифицированные фрагменты когнатных  $V_H$  и  $V_L$  соединяли с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами в этапе так называемой гнездовой ПЦР. В последующем процессе ПЦР-продукты объединяли в пулы перед клонированием в плазмидный вектор. Это выполняли таким образом, чтобы клонированные фрагменты ДНК, кодирующие переменные домены куриного антитела, могли экспрессироваться в виде полноразмерного химерного антитела с одной конструкции экспрессионной плазмиды в трансфицированных клетках млекопитающих. Следовательно, можно проводить скрининг супернатантов клеток на химерные антитела, демонстрирующие специфичное связывание с антигеном PD-1.

#### Материалы и методы

[0206] Технология Symplex<sup>TM</sup>, описанная в перечисленных выше публикациях, была изменена с целью амплификации  $V_L$  и  $V_H$  из отсортированных куриных В-клеток. Клонирование функциональной экспрессионной конструкции проводили в два этапа, как описано ниже.

[0207] Этап 1. Амплифицированные ПЦР-продукты, содержащие спаренные  $V_H$  и  $V_L$  фрагменты, амплифицировали в реакции гнездовой ПЦР. Она давала возможность добавления фланкирующих сайтов, узнаваемых рестриктазами *ApaI* и *AviII*, на каждый конец. Поскольку когнатные  $V_H$  и  $V_L$  последовательности были спарены в одном ПЦР-продукте с каждой отсортированной АСК, клонирование ПЦР-продуктов выполняли после объединения всех ПЦР-фрагментов в пулы. Плазида rML392 была сконструирована для получения ПЦР-продуктов Symplex<sup>TM</sup> при расщеплении соответствующих сайтов рестрикции *ApaI* и *AviII*. Последующее лигирование пулов ПЦР-продуктов и rML392 показано на Фигуре 1. В данном случае вставка ПЦР-продукта приводила к помещению  $V_H$  и  $V_L$  последовательностей перед человеческими СН1-СН2-СН3 и лямбда константными кДНК областями, соответственно, при этом были получены полноразмерные рамки считывания тяжелой и легкой цепи.

[0208] Этап 2. В исходных конструкциях две рамки считывания, кодирующие последовательности тяжелой и легкой цепей, были расположены инвертированно ("голова к голове") и разделены ДНК последовательностью, которая содержала сайты узнавания для рестриктаз *AscI* и *NheI*. При вставке соответствующего расщепленного по *AscI/NheI* ДНК-фрагмента двойного промотора ЦМВ, включающего 5'-UTR области и сигнальные пептиды между двумя 5'-концами генов тяжелой и легкой цепей, получали полную экспрессионную конструкцию, как показано на Фигуре 2.

#### **Пример 2: Клонирование референсных аналогов антител против PD-1**

[0209] В данном примере кратко описано, как были получены референсные аналоги антител против PD-1, ниволумаба и пембролизумаба.

[0210] Аминокислотные последовательности, кодирующие переменные домены тяжелой и легкой цепей аналогов антител ниволумаба и пембролизумаба, были получены

из веб-сайта IMGT® [imgt.org/mAb-DB/](http://imgt.org/mAb-DB/); см. Таблицу 3 ниже. Белковые последовательности транслировали обратно в последовательности ДНК с использованием человеческих кодонов. Соответствующие последовательности ДНК затем синтезировали и клонировали в векторы экспрессии, содержащие константные человеческие IgG<sub>4</sub> домены тяжелой цепи или каппа легкой цепи, что приводило к экспрессии полноразмерных антител. Для предотвращения обмена Fab-плечами остаток серина в положении 228 заменяли пролином (Angal et al., Mol. Immunol. 30:105-108 (1993)). Клетки CHO трансфицировали соответствующими экспрессионными плазмидами при использовании стандартной системы экспрессии белков. Соответствующие супернатанты, содержащие антитела, очищали при помощи стандартной колоночной хроматографии с белком А.

**Таблица 3. Аналоги антител на основе синтезированных генов**

Антитело	Код в исследовании	Формат антитела	Ссылка на веб-сайт
Пембролизумаб/ КИТРУДА®	МК-3475	Рекомбинантный IgG <sub>4</sub> , S228P	<a href="http://imgt.org/mAb-DB/mAbcard?AbId=472">imgt.org/mAb-DB/mAbcard?AbId=472</a>
Ниволумаб/ ОПДИВО®	BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538	Рекомбинантный IgG <sub>4</sub> , S228P	<a href="http://imgt.org/mAb-DB/mAbcard?AbId=472">imgt.org/mAb-DB/mAbcard?AbId=472</a>

**Пример 3: Скрининг репертуара антител для связывания с PD-1, экспрессируемым на клеточной поверхности**

[0211] Клонированные антитела из репертуара антител против PD-1 индивидуально трансфицировали и экспрессировали в клетках HEK293 при использовании реактива для трансфекции 293fectin<sup>TM</sup> (Invitrogen, номер по кат. 12347-019) в 384-луночном формате, и содержащие антитела супернатанты собирали в день 6 после трансфекции.

[0212] Для скрининга антител на основе клеток, клетки CHO-S трансфицировали в 384-луночном формате с целью экспрессии полноразмерного человеческого PD-1 при использовании реактива FreeStyle<sup>TM</sup> MAX (Invitrogen, номер по кат. 16447-100) и использовали нетрансфицированные клетки в качестве отрицательного контроля. Для применения мультиплексной схемы скрининга, нетрансфицированные клетки метили при использовании CFSE и смешивали с немечеными PD-1-трансфицированными клетками при соотношении 1 к 1 и плотности 1Е6 клеток на мл, каждая. В 384-луночных планшетах по 40 мкл этой смеси клеток смешивали с 10 мкл содержащего антитело супернатанта и присутствие связавшегося с клетками антитела определяли путем добавления вторичного антитела козы против IgG человека (H+L), AF647 (Molecular Probes, номер по кат. A21445), в методике без промывки. Образцы получали при использовании высокопроизводительной проточной цитометрии (iQue® Screener, Intellicyt) и анализировали данные при использовании программы ForeCyt®, получая кривую зависимости CFSE от связывания человеческого IgG (AF647). Первичные PD-1-специфичные хиты идентифицировали как клоны антитела, связывающиеся только с клетками, трансфицированными человеческим PD-1 (CFSE-отрицательными), но не с контрольными клетками (CFSE-положительными), после чего номера планшетов и координаты лунок планшетов регистрировали для отбора хитов и последующего секвенирования.

[0213] На Фигурах 3А-3С показаны репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии для: (А) клона антитела, который специфично связывается с клетками, трансфицированными человеческим PD-1, (В) клона, который неспецифично связывается с клетками CHO-S, и (С) клона, который не связывается ни с одной из популяций клеток, используемых в скрининге.

**Пример 4: Гуманизация антител против PD-1**

[0214] Гуманизацию каркасных областей куриных антител против PD-1 проводили с целью получения молекул антител, обладающих минимальной иммуногенностью при введении людям, по существу сохраняющих специфичность и аффинность исходных куриных антител.

#### 5 Материалы и методы

[0215] Гуманизацию куриных антител проводили при использовании метода "CDR-графтинга", способа, первоначально описанного в публикации Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986). Сначала переменные домены тяжелой цепи ( $V_H$ ) и переменные домены легкой цепи ( $V_L$ ) антител проверяли с помощью BLAST в базах данных IgG человека для поиска ближайших человеческих генов зародышевой линии. В результате идентифицировали человеческие гены IGHV3-23\*01 (M99660) и IGLV3-19\*01 (X56178), как являющиеся ближайшими куриным генам  $V_H$  и  $V_L$ , соответственно. Аналогичным образом выбранные человеческие аминокислотные последовательности для гуманизации генов J-области были получены из IGHJ1\*01 (J00256) и IGLJ6\*01 (M18338) для  $V_H$  и  $V_L$ , соответственно. Кроме того,  $V_H$  и  $V_L$  гены антитела выравнивали с куриными генами иммуноглобулинов зародышевой линии для определения соматических мутаций в каркасных областях, которые могут играть роль в функции и/или структуре антитела. Такие остатки могут быть включены в конечные варианты гуманизированных генов антител как остатки, подвергнутые так называемой "обратной мутации". Наконец, некоторые аминокислотные положения, так называемые "остатки Верньера" (Foote and Winter, J Mol Biol. 224(2):487-99 (1992)), которые, как известно, играют важную роль в структуре, стабильности и функции антитела, рассматривали при получении альтернативных гуманизированных вариантов антител, включающих человеческие или куриные остатки из соответствующих зародышевых линий.

[0216] В настоящей заявке CDR-последовательности определяли согласно определениям IMGT<sup>®</sup> для CDR1 и CDR2. Для CDR3 тяжелой и легкой цепи определения в настоящей заявке включают один дополнительный аминокислотный остаток перед IMGT-CDR3 (Cys) и один дополнительный аминокислотный остаток после (Trp для  $V_H$  CDR3, Phe для  $V_L$  CDR3).

[0217] Сборка куриных CDR и человеческих каркасных областей проводили при помощи ПЦР с перекрывающимися праймерами. Полученные в результате гуманизированные  $V_H$  и  $V_L$  ПЦР-продукты клонировали в векторы экспрессии (плазмиды), несущие человеческие константные области тяжелой и легкой цепи. Для увеличения правильного отщепления сигнального пептида перед лямбда-цепью, вторую аминокислоту (Ser) лямбда-гена IGLV3.19 заменяли другой аминокислотой (Tyr), которая присутствует в других человеческих зародышевых линиях, например IGLV3.25. Последовательность тяжелой цепи содержит две "LALA" мутации (L234A/L235A), которые, как известно, уменьшают эффекторную функцию Fc-области IgG1 антител (Armour et al., Eur J Immunol. 29(8):2613-24 (1999); и Armour et al., Mol Immunol. 40(9):585-93 (2003)). Вектор экспрессии также содержал необходимые регуляторные последовательности, обеспечивающие одновременную экспрессию легких и тяжелых цепей, которые собирались в полноразмерные антитела после трансфекции клеток млекопитающих.

#### 40 Результаты

[0218] Последовательности конечных вариантов гуманизированных антител показаны ниже в Таблице 4, и CDR-последовательности показаны отдельно в Таблице 5. В

Таблицах CDR-последовательности определены в соответствии со схемой нумерации IMGT®.

Таблица 4. V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> последовательности гуманизированных антител против PD-1\*

Гуманизированное антитело	Аминокислотная последовательность V <sub>H</sub>	Аминокислотная последовательность V <sub>L</sub>
[12865.15377]	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFDFSDHGM</u> QWVRQAPGKGLEIV <u>GVIDTTGRYT</u> YYAPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKT <u>TCVGGYLCNTVGSIDAW</u> GQGTLTVT SS (SEQ ID NO: 6)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSG <u>GGSSSY</u> GWYQQKPGQAPVTVIY <u>DDT</u> NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLT ITGAQAEDEADYYCGGYEGSSHA <u>GIF</u> SGTKVTVL (SEQ ID NO: 7)
[12892.15378]	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFDFSSYT</u> MQWVRQAPGKGLEWVG <u>VISSTGGST</u> GYGPAVKGRATISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKSI <u>SGDAWSVDGLDAW</u> GQGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 8)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSG <u>GGSA</u> YGWYQQKPGQAPVTVIY <u>YN</u> NQRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTIT GAQAEDEADYYCGSYDSSAVGIF GSGTKVTVL (SEQ ID NO: 9)
[12796.15376]	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFDFSSYT</u> MQWVRQAPGKGLEWVG <u>VISSTGGST</u> GYGPAVKGRATISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKSI <u>SGDAWSVDGLDAW</u> GQGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 10)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSG <u>GGSA</u> YGWYQQKPGQAPVTVIY <u>YN</u> NQRPSDIPDRFSGSSSGNTASLTIT GAQAEDEADYYCGSYDSSAVGIF GSGTKVTVL (SEQ ID NO: 11)
[12777.15382]	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFDFSSYT</u> MQWVRQAPGKGLEWVG <u>VISGSGIT</u> LYAPAVKGRATISRDN KNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSP <u>SITDGWTYGGAWIDAW</u> GQGTLTVTS S (SEQ ID NO: 12)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSG <u>GDG</u> SYGWYQQKPGQAPVTVIY <u>DN</u> DNRPSPDIPDRFSGSSSGNTASLTIT GAQAEDEADYYCGNADLSGGIFG SGTKVTVL (SEQ ID NO: 13)
[12760.15375]	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSTFN</u> MVWVRQAPGKGLEIVA <u>EISSDGST</u> WYATAVKGRATISRDN KNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKS <u>DCSSSYGYSCIGIIDA</u> WGQGTLTVTS S (SEQ ID NO: 14)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSG <u>GISDDGS</u> YWGWFQQKPGQAPVT VIYINDRRPSNIPDRFSGSSSGNTA SLTITGAQAEDEADYYCGSYDSSA <u>GVGIF</u> SGTKVTVL (SEQ ID NO: 15)
[13112.15380]	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYN</u> MFWRQAPGKGLEFVAE <u>ISGNTGSRT</u> WYAPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKS <u>IYGGYCAGGYSCGVGLIDA</u> WGQGTL TVTVSS (SEQ ID NO: 16)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSG <u>GSSD</u> YWGWFQQKPGQAPVTVIY <u>Y</u> NNKRPSDIPDRFSGSSSGNTASLTIT TGAQAEDEADYYCGNADSSVGVF GSGTKVTVL (SEQ ID NO: 17)

\*CDR-области выделены курсивом, полужирным шрифтом и подчеркнуты.

Таблица 5. Последовательности H- и L-CDR гуманизированных антител против PD-1

Гуманизированное антитело	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
[12819.15384]	GFTFTRYD	IGDSNKMT	CAKGSCIACWDEAGRIDAW	GSYDGSSY	NNN	CGSYDRPETNSDYVGMF
SEQ ID NO:	18	19	20	21	22	23
[12748.15381]	GFTFSDYA	IGNDGSYT	CASDIRSRNDCSYFLGGCSSGFIDW	SSYS	ESN	CGNADSSSGIF
SEQ ID NO:	24	25	26	27	28	29
[12865.15377]	GFDFSDHG	IDTTGRYT	CAKTTCVGGYLCNTVGSIDAW	GSSSY	DDT	CGGYEGSSHAGIF
SEQ ID NO:	30	31	32	33	34	35
[12892.15378]	GFDFSSYT	ISSTGGST	CVKSISGDAWSVDGLDAW	GSA	YNN	CGSYDSSAVGIF

SEQ ID NO:	36	37	38	39	40	41
[12796.15376]	GFDFFSYT	ISSTGGST	CVKSVSGDAWSVDGLDAW	GSA	YNN	CGSYDSSAVGIF
SEQ ID NO:	42	43	44	45	46	47
[12777.15382]	GFDFFSYG	ISGSGITT	CTRSPSITDGWTYGGAWIDAW	DGS	DND	CGNADLSGGIF
SEQ ID NO:	48	49	50	51	52	53
[12760.15375]	GFTFSTFN	ISSDGSFT	CAKSDCSSSYGYSCIGIIDAW	ISDDGSYY	IND	CGSYDSSAGVGIF
SEQ ID NO:	54	55	56	57	58	59
[13112.15380]	GFTFSSYN	ISGSNTGSRT	CAKSIYGGYCAGGYSCGVGLIDAW	SSDY	YNN	CGNADSSVGVF
SEQ ID NO:	60	61	62	63	64	65

[0219] Все гуманизированные антитела включали "LALA" варианты аминокислотных последовательностей константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи IgG1, показанные ниже.

Константная область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 67):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSVWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP  
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVVFSCSVMHENHNTQKSLSLSPGK

Константная область легкой цепи (SEQ ID NO: 68):

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTK  
PSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

#### Пример 5: Скрининг кандидатных антител против PD-1

[0220] PD-1 экспрессируется главным образом на поверхности активированных Т-лимфоцитов, где он негативно регулирует Т-клеточную активность. С целью отбора наиболее функциональных кандидатных антител против PD-1 были созданы две разных системы скрининга *in vitro* - анализ цельной крови со стафилококковым энтеротоксином В (SEB) и анализ реакции однонаправленной смешанной культуры лимфоцитов.

#### Материалы и методы

[0221] Репертуар из 69 уникальных гуманизированных мАт в формате IgG1-LALA каркаса, т.е. имеющих "LALA" мутации, описанные в Примере 4, и клонированных и гуманизированных, как описано выше, первоначально подвергали скринингу на функциональную активность в анализе цельной крови с SEB. SEB является суперантигеном, который связывается с молекулами МНС II класса и специфическими V $\beta$  областями Т-клеточных рецепторов (TCR) и направляет неспецифическую стимуляцию Т-клеток. Это приводит к активации/пролиферации поликлональных Т-клеток и выбросу цитокинов, включающих IL-2 и IFN- $\gamma$ .

[0222] Для исследования пригодности SEB анализа для скрининга активности антител против PD-1, уровень экспрессии PD-1 исследовали у различных доноров до и после стимуляции SEB. МКПК шести различных доноров исследовали на экспрессию PD-1 с помощью проточной цитометрии в день 0 и день 3 после стимуляции SEB. Соответствующий диапазон сортировки лимфоцитов устанавливали для последующего анализа.

[0223] По результатам скрининга в анализах цельной крови с SEB, с использованием крови по меньшей мере трех различных доноров, идентифицировали 10 лучших основных кандидатных антител против PD-1. Основные кандидатные антитела против PD-1 затем дополнительно титровали с получением кривых зависимости доза-эффект для каждого отдельного антитела по сравнению с положительными контролями, референсными аналогами антител против PD-1, пембролизумаба (Merck) и ниволумаба (Bristol-Myers

Squibb); см. Пример 2.

[0224] Функциональность выбранных 10 лучших антител против PD-1 подтверждали в альтернативном *in vitro* анализе, анализе реакции односторонней смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ-реакции). В этом анализе дендритные клетки (ДК) одного

5 донора совместно культивировали с CD4<sup>+</sup> Т-клетками другого донора с получением аллоантигенспецифичной стимуляции, индуцированной у 10-15% всех Т-клеток, приводящей к активации/пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов.

[0225] Вследствие проблемы, связанной со стабильностью белка одного из кандидатов (12748.15381), использовали альтернативные последовательности зародышевой линии

10 для данного специфичного антитела. Одно из полученных в результате антител, 12748.16124, указано ниже. Данный вариант имеет другую V<sub>L</sub> последовательность, но такую же V<sub>H</sub> последовательность, как у 12748.15381 (Таблица 1, выше).

#### Результаты

[0226] Данные на Фигуре 4 четко показывают, что процент лимфоцитов, экспрессирующих PD-1, повышен у всех протестированных доноров после стимуляции SEB. Такие наблюдения подтверждают пригодность данного анализа для скрининга антител против PD-1.

[0227] Титрование наиболее функциональных антител против PD-1 в анализе с SEB, показанное на Фигурах 5А-І, позволило определить основные кандидатные антитела

20 против PD-1 с функциональностью, подобной или превосходящей функциональность аналогов антител положительного контроля, пембролизумаба и ниволумаба. В этом анализе цельную кровь стимулировали SEB в течение 48 ч в присутствии указанных антител и через 48 часов измеряли секрецию IL-2 с помощью ELISA. Каждая точка

25 данных представляет среднее для шести повторностей, планки указывают SEM.

[0228] На Фигурах 5А-Н показаны результаты, полученные с гуманизированными антителами против PD-1. Вследствие агрегации, превышающей 5%, у одного из антител [12748.15381], для этого антитела тестировали альтернативный каркас. Данные на

30 Фигуре 5І показывают подобную функциональность исходного гуманизированного антитела [12748.15381] и его варианта зародышевой линии (с другим каркасом) [12748.16124].

[0229] Функциональность антител против PD-1 подтверждали в анализе реакции односторонней СКЛ. В этом анализе совместно культивировали дендритные клетки и CD4<sup>+</sup> Т-клетки (в соотношении 1:10) двух разных доноров и через 5 дней измеряли

35 секрецию IFN-γ с помощью MesoScale. Каждая точка данных представляет среднее для шести повторностей, планки указывают SEM. Данные, полученные в анализе реакции односторонней СКЛ и представленные на Фигурах 6А-Н, показывают такую же функциональность и ранжирование антител против PD-1, как и данные, полученные в анализе SEB. Такое соответствие результатов разных анализов обеспечивает

40 дополнительное подтверждение того, что отобранные антитела являются функциональными.

[0230] Отобранные антитела происходят из двух разных основных эпитопных корзин, что указывает на то, что они связываются с двумя разными неперекрывающимися эпитопами. Все показанные антитела против PD-1 относятся к Корзине 1, за

45 исключением антител 12760 и 13112, которые относятся к Корзине 2. Было обнаружено, что антитела против PD-1 из Корзины 1 показывают наиболее высокую функциональность в этих анализах *in vitro*.

**Пример 6: Проточно-цитометрический анализ антител против PD-1 на блокирующую**

**активность в отношении лиганда PD-L1**

[0231] В данном примере проиллюстрировано, как панель антител против PD-1 тестировали на блокирующую активность в отношении лиганда PD-L1 с помощью проточно-цитометрического конкурентного анализа при использовании экспрессированного на клеточной поверхности PD-1 и меченного флуорохромом растворимого PD-L1.

**Материалы и методы**

[0232] Блокирующую активность в отношении лиганда PD-L1 исследовали в мультиплексном клеточном анализе, в котором клетки CHO-S рекомбинантно экспрессировали PD-1 человека и яванского макака, при этом связывание меченного R-PE (R-фикоэритрином), человеческого PD-L1-Fc химерного белка исследовали с помощью проточной цитометрии. Доступный в продаже рекомбинантный PD-L1-Fc химерный белок (R&D Systems, USA) конъюгировали с R-PE при использовании набора Lightning-Link® R-Phycoerythrin Conjugation Kit (Innova Biosciences, UK). Клетки CHO-S, транзистентно трансфицированные для экспрессии человеческого PD-1, смешивали с CFSE-окрашенными клетками CHO-S, транзистентно экспрессирующими PD-1 яванского макака. Эту смесь клеток затем инкубировали во льду с 50 мкл антитела против PD-1 при концентрации 20 мкг/мл, с последующим добавлением 50 мкл R-PE-меченого PD-L1-Fc при концентрации приблизительно 3,4 мкг/мл (конечная концентрация 16,4 нМ) и дополнительным инкубированием в течение еще 20 мин (конечная концентрация антитела против PD-1: 10 мкг/мл). Связанное антитело детектировали при использовании конъюгированного с АФЦ (аллофикоцианином) антитела против легкой цепи человеческого IgG. Связывание PD-L1 и антитела против PD-1 количественно определяли с помощью проточной цитометрии с детектированием флуоресценции R-PE и АФЦ, соответственно.

**Результаты**

[0233] Результаты эксперимента по конкурентному связыванию представлены на Фигурах 7А-В и приведены в Таблице 6 ниже. Все антитела против PD-1 тестировали при конечной концентрации антитела 10 мкг/мл (см. выше). Три из протестированных антител могли ингибировать связывание PD-L1 на 83% или больше, аналогично референсному антителу против PD-1, ламбролизумабу (Merck), которое является таким же, как пембролизумаб, и было включено в качестве положительного контроля. Одно антитело (12777.13362) только частично ингибировало связывание на 69%. Одно антитело (13112.13208) не блокировало связывание PD-1. Связывание PD-L1 с клетками, экспрессирующими PD-1, в присутствии антитела отрицательного контроля против VEGFR2, рамуцирумаба (Genentech), устанавливали равным 0%.

**Таблица 6. Ингибирование связывания PD-L1 в присутствии антител против PD-1**

Антитело	% ингибирования связывания PD-L1
12819.13367	87%
12748.13354	86%
12892.13195	88%
12777.13362	69%
13112.13208	5%
Ламбролизумаб (полож. контроль)	88%
Рамуцирумаб (отриц. контроль)	установлен равным 0%

[0234] Гуманизированные варианты, показанные в Таблице 6, имеют такие же аминокислотные последовательности, как варианты в Таблице 1, имеющие одинаковые первые 5 цифр в их обозначениях, за исключением того, что варианты в Таблице 1

имеют аминокислотные остатки "SY" на N-конце легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления дипептид SY улучшает процессинг сигнального пептида в ходе экспрессии легкой цепи антитела. Варианты в Таблицах 1 и 6, как ожидают, будут обладать идентичными функциональными свойствами.

**Пример 7: Измерение аффинностей антител против PD-1 в отношении антигена ECD PD-1 человека и яванского макака**

[0235] В данном примере продемонстрировано, что большинство антител против PD-1 проявляют высокую пикомолярную (пМ) аффинность и хорошую перекрестную реактивность против внеклеточных доменов (ECD) PD-1 человека и яванского макака.

**Материалы и методы**

[0236] Кинетический анализ связывания репертуара очищенных антител против PD-1 проводили на биосенсоре XPR-36 с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Bio-Rad, USA). His-меченые антигены ECD PD-1 человека или яванского макака были приобретены в Acro Biosystems, UK. Кинетику связывания измеряли в условиях связывания моновалентного антигена при иммобилизации антитела против PD-1 и в присутствии моновалентного антигена PD-1 в растворе, как описано ранее (Canziani et al., Anal Biochem 325 (2):301-307 (2004)). Антитело против PD-1 наносили с минимальной плотностью, чтобы предотвратить неспецифическое связывание и ограничение переноса массы. Для измерения кинетики антитела, антитела против PD-1 доводили до концентрации 1,0 мкг/мл и захватывали на поверхностях с антителом против Fc IgG человека, полученных путем иммобилизации приблизительно 1000 RU моноклонального антитела против Fc человека (BiaCore, Denmark). Антитела против PD-1 тестировали на связывание с ECD PD-1 человека или яванского макака в диапазоне 3-кратных концентраций от 25 нМ до 0,31 нМ, с последующей регенерацией поверхностей регенерирующим 3 М MgCl<sub>2</sub> буфером (BiaCore, Denmark). Использовали высокую скорость потока 20 мкл/мин, время ассоциации 3,33 мин и время диссоциации от 1,5 до 2,75 ч. Зарегистрированные результаты связывания аппроксимировали в простой модели связывания Ленгмюра 1:1 для вычисления констант скорости ассоциации ( $k_{on}$  или  $k_a$ ), скорости диссоциации ( $k_{off}$  или  $k_d$ ) и аффинности ( $K_D$ ) при использовании двойного сравнения.

**Результаты**

[0237] Кинетика связывания приведена в Таблице 7 ниже, в которой показано, что панель антител против PD-1 связывает PD-1 с очень высокими аффинностями в пМ диапазоне. Все антитела распознавали человеческий PD-1 с более высокой аффинностью, чем аналоги ниволумаба и пембролизумаба. Антитело с наиболее высокой аффинностью [12819.15384] связывает человеческий PD-1 с  $K_D$  20 пМ.

**Таблица 7. Кинетика связывания антител против PD-1 с ECD PD-1 человека или яванского макака при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR)**

Антитело	ECD PD-1	$k_{on}$ (M <sup>-1</sup> c <sup>-1</sup> )		Ошибка $k_{on}$	$k_{off}$ (c <sup>-1</sup> )		Ошибка $k_{off}$	K <sub>D</sub> (nM)
[12819.15384]	Человек	1,1E+06	±	1,7E+03	2,3E-05	±	1,3E-07	20
[12819.15384]	Макак	9,7E+05	±	1,6E+03	4,5E-06	±	1,5E-07	5
[12748.15381]	Человек	3,2E+06	±	1,0E+04	1,7E-04	±	7,1E-07	54
[12748.15381]	Макак	4,6E+06	±	1,6E+04	4,7E-04	±	9,1E-07	101
[12748.16124]	Человек	3,4E+06	±	8,2E+03	1,6E-04	±	5,9E-07	47
[12748.16124]	Макак	4,8E+06	±	1,8E+04	3,9E-04	±	9,8E-07	81
[12865.15377]	Человек	4,2E+05	±	2,2E+03	2,3E-04	±	5,5E-07	558
[12865.15377]	Макак	5,1E+05	±	2,2E+03	3,8E-04	±	7,3E-07	738
[12892.15378]	Человек	4,6E+05	±	2,3E+03	3,4E-04	±	7,1E-07	737



[12892.15378]	Макак	2,9E+05	±	1,0E+10	6,9E-04	±	8,5E-01	2340
[12796.15376]	Человек	7,1E+05	±	3,9E+03	3,8E-04	±	1,1E-06	542
[12796.15376]	Макак	3,2E+05	±	3,5E+03	7,0E-04	±	2,5E-06	2220
[12777.15382]	Человек	2,4E+05	±	1,7E+03	8,0E-05	±	4,0E-06	337
[12777.15382]	Макак	2,5E+05	±	7,3E+03	1,7E-04	±	3,5E-06	681
[12760.15375]	Человек	1,2E+06	±	3,4E+03	1,4E-04	±	6,5E-07	112
[12760.15375]	Макак	1,0E+06	±	1,7E+04	7,2E-03	±	5,8E-05	6940
[13112.15380]	Человек	1,2E+06	±	4,8E+03	6,9E-05	±	7,4E-07	60
[13112.15380]	Макак	2,5E+06	±	1,5E+04	1,1E-03	±	3,9E-06	452
аналог ниволумаба	Человек	1,4E+06	±	9,2E+03	1,1E-03	±	4,1E-06	758
аналог ниволумаба	Макак	1,4E+06	±	8,5E+03	7,7E-04	±	2,9E-06	542
аналог пембролизумаба	Человек	2,4E+06	±	2,7E+04	2,1E-03	±	1,1E-05	852
аналог пембролизумаба	Макак	1,7E+06	±	1,0E+04	3,3E-04	±	9,5E-07	190

### Пример 8: Бинирование эпитопов антител против PD-1

[0238] В данном примере проиллюстрировано, как антитела к PD-1 группировали в эпитопные корзины в зависимости от профилей парной конкуренции. Антитела, относящиеся к разным эпитопным корзинам, распознают разные эпитопы на ECD PD-1.

### Методы

[0239] Исследование парной конкуренции антител проводили с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR), при использовании микропоттера с непрерывным потоком (CFM) (Wasatch Microfluidics, USA), соединенного с прибором IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies, The Netherlands). Визуализационный анализ на основе поверхностного плазмонного резонанса проводили на SPR сенсорах E2S SensEye® (Ssens BV, The Netherlands). В общей сложности десять антител против PD-1 (человек, IgG1) разводили в концентрации 10 мкг/мл в 50 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 4,5. Антитела наносили на E2S SensEye® и конъюгировали в течение 15 минут при использовании микропоттера с непрерывным потоком. После нанесения, SensEye® помещали в биосенсор IBIS MX96 и деактивировали 1 М этаноламином, pH 8,5, в течение 10 минут. После подготовки сенсора конкурентный анализ антител проводили при помощи классического сэндвич-анализа. Моновалентный антиген ECD PD-1 (Sino Biological, China) разводили в рабочем буфере HBS-EP, вводили в концентрации 50 нМ и захватывали на конъюгированной матрице антител против PD-1. Затем отдельно вводили каждое из десяти антител к PD-1, разведенных в концентрации 100 нМ в рабочем буфере HBS-EP с целью определения профилей конкуренции антител. После каждого цикла конкуренции поверхность сенсора регенерировали 10 мМ глицин-HCl буфером, pH 2,0.

### Результаты

[0240] Профиль конкуренции десяти антител против PD-1 представлен на Фигуре 8. Как было установлено, 12866 и 12807 не обладали функциональной активностью в клеточных анализах, но были включены, потому что они распознают разные эпитопы. Протестированные функциональные антитела против PD-1, как обнаружили, связывали два неперекрывающихся эпитопа из эпитопных корзин. Функциональные антитела, относящиеся к эпитопной корзине 1, перекрестно блокировали друг друга и включали аналог ниволумаба ("Nivo"), аналог пембролизумаба ("Pembro"), 12819, 12892, 12865 и 12777. Было установлено, что указанные антитела значительно блокировали связывание PD-L1 и PD-L2. Как было установлено, 12760 и 13112 связывали отдельную эпитопную корзину 2, потому что они перекрестно блокировали друг друга, но не блокировали связывание ни одного из антител из эпитопной корзины 1. Следовательно, 12760 и 13112, вероятно, связывались с другим участком на PD-1, который не перекрывается с

участком связывания лиганда PD-L1 и PD-L2.

[0241] Перекрестно блокирующие функциональные антитела 12819, 12865, 12892, 12777, ниволумаб и пембролизумаб, относящиеся к эпитопной корзине 1, можно дополнительно подразделить на четыре субкорзины на основе конкуренции с 12866 и 12807 (Фигура 8). 12819 (Корзина 1C) являлось единственным антителом, которое одновременно блокировало связывание 12866 и 12807, тогда как ниволумаб (Корзина 1D) блокировал только 12866, а пембролизумаб (Корзина 1F) блокировал только 12807. Группа антител, относящихся к Корзине 1E (12865, 12892 и 12777), была уникальна тем, что они не блокировали связывание 12866 или 12807.

[0242] Наконец, 12866 (Корзина 1A) и 12807 (Корзина 1B) связывали уникальные эпитопные корзины. Антитело 12866 блокировало 12819 и ниволумаб, но не блокировало другие антитела против PD-1, и 12807 блокировало 12819 и пембролизумаб, но не блокировало другие антитела против PD-1.

#### **Пример 9: Измерение перекрестной реактивности антител к PD-1 в отношении антигена ECD PD-1 мыши и крысы**

[0243] В данном примере продемонстрировано, что антитело против PD-1, 12819.15384, сильно перекрестно реагирует с мышинным PD-1, но не связывается с крысиным PD-1.

##### **Материалы и методы**

[0244] His-меченые ECD PD-1 мыши и крысы приобретали в Sino Biologicals. Кинетический анализ связывания проводили, как описано в Примере 7.

##### **Результаты**

[0245] Кинетика связывания приведена в Таблице 8 ниже. Антитело против PD-1 12819.15384 связывает мышинный PD-1 с  $K_D$  809 пМ, но не распознает крысиный PD-1.

Аффинность в отношении ECD PD-1 человека была аналогична аффинности, измеренной в Примере 7. Антитело 12865.17150 не связывало мышинный или крысиный PD-1. Ни один из референсных аналогов ниволумаба и пембролизумаба не реагировал перекрестно с мышинным или крысиным PD-1 (данные не показаны).

**Таблица 8. Кинетика связывания антитела к PD-1 12819.15384 с ECD PD-1 человека, мыши или крысы при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR)**

Антитело	ECD PD-1	$k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	Ошибка $k_{on}$	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	Ошибка $k_{off}$	$K_D$ (пМ)
[12819.15384]	человек	3,26E+05	± 3E+02	8,85E-06	± 5E-08	28
[12819.15384]	мышь	3,71E+04	± 5E+01	3,04E-05	± 7E-09	809
[12819.15384]	крыса	N.B.*	±	N.B.	±	N.B.

\*N.B: Не связывает.

#### **Пример 10: Анализ блокирующей активности мАт к PD-1 в отношении лигандов PD-L1 и PD-L2**

[0246] В данном примере проиллюстрировано, как панель антител против PD-1 исследовали на блокирующую активность в отношении лигандов PD-L1 или PD-L2 путем проведения конкурентного анализа с использованием анализа методом биослойной интерферометрии.

##### **Материалы и методы**

[0247] Исследование блокирующей активности в отношении лигандов PD-L1 или PD-L2 проводили с помощью анализа биослойной интерферометрии (BLI) при использовании прибора Octet QK384 (Fortebio, USA). Доступный в продаже слитый белок Fc PD-1 человека (Sino Biological) в концентрации 5 мкг/мл захватывали на сенсорных чипах против Fc человека (Fortebio, USA) и оставшиеся анти-Fc участки

блокировали антителом отрицательного контроля Герцептином®. Затем покрытую антигеном поверхность насыщали антителом против PD-1 в концентрации 10 мкг/мл. После насыщения PD-1 антителом против PD-1, блокирующую активность против лиганда PD-L1 или PD-L2 оценивали при инкубировании со слитыми белками Fc PD-L1 или PD-L2 человека (Sino Biologicals), тестируемыми при концентрации 5 мкг/мл.

#### Результаты

[0248] Результат конкурентного анализа представлен в Таблице 9 ниже. Все антитела полностью блокировали связывание лигандов PD-L1 или PD-L2 за исключением антитела 12760.13169, которое не показало значимого блокирования PD-L1 или PD-L2 (26% и 36%, соответственно), и 13112.13208, которое не показало блокирование PD-L1 и показало слабое блокирование PD-L2 (27% и 53%, соответственно). Результаты хорошо согласовывались с анализом бинирования эпитопов (Пример 8) и анализом картирования эпитопов (Пример 11), что показало то, что все антитела кроме 12760 и 13112 связываются с перекрывающимися эпитопами, которые картированы на участке связывания PD-L1 и PD-L2 на PD-1, тогда как антитела 12760 и 13112 связываются с отдельным участком на PD-1 и не демонстрируют значимой перекрестной конкуренции с PD-L1 и PD-L2.

**Таблица 9. Ингибирование PD-L1 и PD-L2 после насыщения антителом против PD-1**

мАт	Лиганд	% блокирования
12748.13354	PD-L1-Fc	97
12748.13354	PD-L2-Fc	96
12760.13169	PD-L1-Fc	44
12760.13169	PD-L2-Fc	26
12777.13362	PD-L1-Fc	93
12777.13362	PD-L2-Fc	90
12796.13173	PD-L1-Fc	99
12796.13173	PD-L2-Fc	92
12819.13367	PD-L1-Fc	94
12819.13367	PD-L2-Fc	94
12865.13185	PD-L1-Fc	98
12865.13185	PD-L2-Fc	94
12892.13195	PD-L1-Fc	88
12892.13195	PD-L2-Fc	77
13112.13208	PD-L1-Fc	53
13112.13208	PD-L2-Fc	27
аналог ниволумаба	PD-L1-Fc	100
аналог ниволумаба	PD-L2-Fc	98
аналог пембролизумаба	PD-L1-Fc	100
аналог пембролизумаба	PD-L2-Fc	99
Отсутствует значимое блокирование лиганда		
50-70	Среднее блокирование лиганда	
70-90	Среднее блокирование лиганда	
90-100	Полное блокирование лиганда	

**Пример 11: Картирование эпитопов антител против PD-1 посредством мутагенеза PD-1**

[0249] Эпитопы антитела обычно можно описать как линейные эпитопы (также называемые непрерывными эпитопами) или конформационные эпитопы (также называемые прерывистыми эпитопами). Тогда как линейные эпитопы определяют на основе одной непрерывной аминокислотной последовательности, конформационные эпитопы могут состоять из множества менее протяженных прерывистых линейных последовательностей или отдельных контактных остатков. Группа контактных остатков, которые образуют кластер в межмолекулярном белковом интерфейсе между антителом и антигеном, также называются горячей точкой или внутренним эпитопом (Moreira et al., *Proteins* 68(4):803-12 (2007)). В настоящее время широко известно, что большинство В-клеточных эпитопов являются прерывистыми по природе (Sivalingam and Shepherd, *Mol Immunol.* 51(3-4):304-92012 (2012), Kringelum et al., *Mol Immunol.* 53(1-2):24-34 (2013)), причем средняя протяженность эпитопа составляет 15-22 аминокислотных остатка, из которых 2-5 аминокислот вносят большую часть энергии связывания (Sivalingam and Shepherd, выше).

[0250] При ранжировании аффинности связывания в отношении 111 различных мутантов PD-1, данный пример иллюстрирует, как эпитопы связывания антител 12819 и 12865 можно разделить на линейные эпитопы и горячие точки, которые отличаются от эпитопов, распознаваемых ниволумабом и пембролизумабом.

#### Методы

[0251] Рецептор PD-1 человека состоит из внеклеточного домена из 268 аминокислот (остатки 21-288). Внеклеточный домен охватывает аминокислоты 21-170, затем следует трансмембранный домен (остатки 171-191) и цитоплазматический домен (остатки 192-288). PD-1 относится к суперсемейству иммуноглобулинов и состоит из двухслойного  $\beta$ -сэндвича, сформированного взаимодействиями 8 антипараллельных  $\beta$ -цепей, расположенных в двух  $\beta$ -слоях, причем GFCC'  $\beta$ -цепи находятся на одной стороне, а ABED  $\beta$ -цепи расположены на противоположной стороне. Два  $\beta$ -слоя стабилизируют дисульфидная связь между остатками C54-C123. Для комплекса PD-1:PD-L1 человека доступна кристаллическая структура (PDB 4ZQK), однако структура C'D петли между C' и D  $\beta$ -цепями не была установлена и отсутствует, как и часть C-концевой последовательности после остатка 146 (PDB 4ZQK, Zak et al., *Structure* 23(12):2341-2348 (2015)). Недавно была опубликована кристаллическая структура комплекса человеческого PD-1:пембролизумаба (PDB 5JXE, Na et al., *Cell Res.* 2016 [предварительная электронная публикация], PMID: 27325296). В этой структуре C'D петля намного более упорядочена, при этом контактные остатки, важные для связывания пембролизумаба, как было показано, сгруппированы во внутреннем эпитопе на этой петле. Кристаллическая структура комплекса человеческого PD-1:человеческого PD-L2 не доступна. ЯМР-структура человеческого PD-1 в растворе показывает высокое структурное подобие с кристаллической структурой PDB 4ZQK (PDB 2M2D, Cheng et al., *J Biol Chem* 288(17):11771-85 (2013)). Человеческий PD-1 связывает лиганды PD-L1 или PD-L2 человека со стехиометрией 1:1, при этом связывание главным образом происходит при перекрывании связывающих участков, которое опосредовано GFCC'  $\beta$ -слоем (Cheng et al., *J Biol Chem* 288 (17):11771-11785 (2013)) (Фигура 9, панели А и В). Человеческий PD-L1 связывается с человеческим PD-1 через контактные остатки V64, N66, Y68, расположенные на C  $\beta$ -цепи, и G124, I126, L128, A132, I134 и E136, расположенные на F и G  $\beta$ -цепях (Zak et al., *Structure* 23(12):2341-8 (2015)). Человеческие PD-L1 и PD-L2 связываются с человеческим PD-1 с  $K_D$  8 мкМ и 2 мкМ, соответственно (Cheng et al., выше).

[0252] Белковая последовательность человеческого PD-1 была загружена из Uniprot

(рег. № Q15116; аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 1). Полноразмерная белковая последовательность *Macaca fascicularis* была загружена из Uniprot (рег. № B0LAJ3\_MACFA (SEQ ID NO: 89)). Полноразмерные последовательности PD-1 *Gallus gallus*, *Mus musculus* и *Rattus norvegicus* были загружены из NCBI (XP\_422723.1 (SEQ ID NO: 90), NP\_032824.1 (SEQ ID NO: 91) и XP\_006245633.1 (SEQ ID NO: 92), соответственно). Идентичность последовательности различных внеклеточных аминокислотных последовательностей PD-1 при сравнении с человеческим PD-1 показана в Таблице 10 ниже.

**Таблица 10. Сравнение последовательности ECD PD-1 разных биологических видов**

	Аминокислотные различия	% идентичности последовательности
ECD PD-1 <i>Macaca fascicularis</i>	6	96,0
ECD PD-1 <i>Rattus norvegicus</i>	50	66,7
ECD PD-1 <i>Mus musculus</i>	57	62,0
ECD PD-1 <i>Gallus gallus</i>	73	51,3

[0253] Молекулярная модель человеческого PD-1 была построена при объединении структурной информации из кристаллической структуры комплекса человеческого PD-1:человеческого PD-L1, установленной с разрешением 2,45 Å (PDB 4ZQK), и ЯМР-структуры APO PD-1 человека (PDB 2M2D). Структуру PDB 4ZQK использовали в качестве основы для модели с недостающими C'D петлей и C-концевой частью PD-1, полученными из ЯМР-структуры. Затем отметили поверхностные аминокислотные остатки и подготовили 83 отдельных замены на аланин поверхностных остатков на ECD человеческого PD-1 (аланиновое сканирование), и 5 положений поверхностных остатков, которые отличались в PD-1 человека, мыши и крысы, подвергали обратной мутации с заменой на остатки крысиного PD-1.

[0254] Для картирования линейных эпитопов антитела в рамках структуры нативного человеческого PD-1, были созданы 23 химерных белка, в которых 10 аминокислот в последовательности ECD человеческого PD-1 последовательно заменяли куриной последовательностью по сегментам, которые перекрывались по 5 аминокислотам. Замены последовательности проводили во внеклеточном домене человеческого PD-1, охватывающем аминокислоты 31-146, поскольку последовательность белка *Gallus gallus* за пределами данного сегмента не удавалось хорошо выравнивать с PD-1 человека, и ее исключали.

[0255] Последовательность кДНК PD-1, кодирующую внеклеточный домен человеческого PD-1, синтезировали и клонировали в вектор, содержащий промотор ЦМВ и последовательность Fc IgG<sub>1</sub> человека (остатки P101-K330), со слиянием Fc IgG<sub>1</sub> с C-концом клонированного ECD PD-1. Слитые конструкции Fc с мутантным человеческим PD-1 получали с помощью стандартной ПЦР и методик генной инженерии, при этом белок экспрессировался транзientно в 2 мл культуре при использовании системы экспрессии ExpiCHO<sup>TM</sup>. Слитые конструкции Fc с человеческим PD-1 собирали через 9 дней и исследовали супернатанты на аффинность связывания с Fab-фрагментами против PD-1 с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Супернатанты культур, содержащие слитые белки PD-1, иммобилизовали на G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, The Netherlands) в течение 15 минут при использовании микроспоттера с непрерывным потоком (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, US). После нанесения, SensEye® помещали на биосенсор IBIS MX96 и фиксировали захваченные белки на поверхности при использовании набора FixIT (Ssens BV, The Netherlands). Кинетический анализ проводили путем применения так называемого серийного кинетического

титрования (Karlsson R., 2006), в котором мономерные Fab-фрагменты антител согласно изобретению вводили в повышаемых концентрациях от 1 нМ до 50 нМ, без применения этапов регенерации поверхности после введения каждого антигена. Ассоциацию Fab-фрагментов проводили в течение 15 минут, а диссоциацию антигена проводили в течение 30 минут. Зарегистрированные результаты связывания аппроксимировали в простой модели связывания Ленгмюра 1:1 с помощью программы Scrubber 2 для вычисления констант скорости ассоциации ( $k_{on}$  или  $k_a$ ), скорости диссоциации ( $k_{off}$  или  $k_d$ ) и аффинности ( $K_D$ ).

#### Результаты

[0256] Оценивали аффинности связывания Fab-фрагментов против PD-1, 12819.17149 и 12865.17150, и референсных аналогов ниволумаба и пембролизумаба. 12819.17149 и 12865.17150 идентичны по аминокислотной последовательности  $V_H$  и  $V_L$  12819.15384 и 12865.15377, соответственно, но обозначены разными 10-значными номерами, потому что последовательности тяжелой и легкой цепей каждого из двух первых вариантов совместно экспрессировали на одной и той же плазмиде, а не на отдельных плаزمиде, в клетках-хозяевах. Не блокирующие связывание лигандов PD-L1 и PD-L2 Fab 13112.15380 и Герцептин® были включены в качестве контроля.

[0257] Все 111 протестированных мутантов PD-1 хорошо экспрессировались. Только три химерных конструкции не связывали ни одно из протестированных антител, что позволяет предположить, что мутации, введенные в эти три конструкции, по-видимому, приводили к большим конформационным изменениям, которые затрагивали связывание всех протестированных антител к PD-1. Изменение аффинности связывания Fab-антител при связывании с мутантными конструкциями PD-1 по сравнению с диким типом было выражено как отношение  $K_D$  мутанта/ $K_D$  дикого типа (нормализованная аффинность связывания). Обзор результатов сканирования линейных эпитопов, выполненного путем вставки последовательностей *Gallus gallus* из 10 аминокислот в ECD PD-1 человека, показан в Таблице 11 ниже. По меньшей мере 5-кратное снижение аффинности использовали в качестве порогового критерия для обнаружения снижения аффинности связывания с конструкциями мутантного PD-1. В некоторых случаях связывание с определенными антителами не удавалось обнаружить. Эти конструкции были перечислены как N.B. (нет связывания).

[0258] Отдельные контактные остатки также картировали при выполнении 83 замен на аланин или 5 обратных мутаций с заменой крысиными остатками (Таблица 12 ниже).

[0259] Обзор линейных эпитопов или контактных остатков, идентифицированных для протестированных антител, представлен в Таблице 13. Иллюстрация картированных эпитопов связывания, показанных в виде диаграмм плотности на структуре ECD PD-1 человека, показана на Фигуре 9.

[0260] Анализ показал, что эпитопы связывания антител против PD-1 12819 и 12865 явно отличались при сравнении с референсными антителами ниволумабом и пембролизумабом (Таблицы 11-13, Фигура 9). Внутренний эпитоп пембролизумаба (Фигура 9, панель C) был расположен на C'  $\beta$ -цепи и на C'-D петле. Контактные остатки/линейные эпитопы также были обнаружены на C и F  $\beta$ -цепи, где также присутствуют контактные остатки для PD-L1. Внутренний эпитоп ниволумаба (Фигура 9, панель D) присутствовал на конце F  $\beta$ -цепи и на всей G  $\beta$ -цепи, охватывая некоторые описанные контактные остатки PD-1, используемые человеческим PD-L1. Внутренние эпитопы 12819 и 12865 (Фигура 9, панели E и F) были расположены на F и G  $\beta$ -цепях, с охватом большей области, чем ниволумаб, и перекрытием со всеми контактными остатками,

описанными для человеческого PD-L1 в данной области. Также 12865 было очень чувствительно к мутациям по остаткам 69-75. 12819 также имело один общий контактный остаток с пембролизумабом (V64) на С β-цепи, который, как также сообщали, являлся контактным остатком для человеческого PD-L1. Оба 12819 и 12865 имели общие линейные эпитопы, которые были картированы на С и С' β-цепях и части С'D петли. Кроме остатка V64, никакие другие контактные остатки у протестированных антител не были общими. Не блокирующее лиганд антитело 13112, как показывало аланиновое сканирование, было картировано в области, удаленной от участка, блокирующего связывание лигандов PD-L1 и PD-L2 (Фигура 9, панель G).

[0261] Подводя итог, следует отметить, что данный пример иллюстрирует, что, хотя 12819, 12865, ниволумаб и пембролизумаб связываются с перекрывающимися эпитопами на человеческом PD-1, которые могут блокировать связывание лигандов PD-L1 и PD-L2, антитела имеют разные эпитопы связывания, что подтверждается из конкурентного анализа связывания (бинирование эпитопов, Пример 8) и показано на молекулярном уровне при картировании отдельных линейных эпитопов и контактных остатков с панелью из 111 мутантов PD-1, как представлено в Таблице 13. Также 12819 является единственным антителом в исследуемой панели антител против PD-1, которое перекрестно реагирует с ECD PD-1 мыши ( $K_D$  809 пМ, Пример 9), подчеркивая, что эпитоп связывания этого антитела является уникальным по сравнению с другими протестированными антителами к PD-1.

**Таблица 11. Анализ аффинности связывания Fab-антител с химерными конструкциями ECD PD-1 со вставками сегментов последовательностей *Gallus gallus*\***

Химерная конструкция #	Сканируемая область hu PD-1	Мутантная область hu PD-1	Введенные <i>Gallus gallus</i> мутации	12819.17149	12865.17150	ниволумаб	пембролизумаб	13112.15380
1	31-40	AK 37-38	F37L;S38F	1,2	0,6	0,4	0,9	0,4
2	36-45	AK 37-45	F37L;S38F;L41T;V43T;V44R;T45P	2,3	0,7	0,9	0,5	1,0
3	41-50	AK 41-49	L41T;V43T;V44R;T45P;E46A;D48S;N49S	1,3	0,6	0,5	0,6	0,7
4	46-55	AK 46-55	E46A;D48S;N49S;T53I;S55N	0,3	0,6	0,5	0,6	0,6
5	51-60	AK 53-59	T53I;S55N;S56I;T59S	1,2	0,9	0,8	0,9	2,5
6	56-65	AK 56-64	F56I;T59S;E61L;S62E;V64N	7,1	0,2	0,9	12,0	0,8
8	66-75	AK 69-75	R69Q;M70K;S71T;P72N;S73N;N74S;Q75N	6,4	N.B.	1,2	0,9	1,6
10	76-85	AK 76-85	T76P;D77Q;L79I;A81G;F82I;P83IE84R;D85N	33,7	13,8	0,8	N.B.	1,0
11	81-90	AK 81-90	A81G;F82I;P83IE84R;D85N;R86I;S87P;P89K;G90K	17,7	5,4	2,0	N.B.	0,8
12	86-95	AK 86-95	R86I;S87P;P89K;G90K;Q91M;D92E;R94K;F95Y	2,2	0,6	0,5	N.B.	0,6
15	101-110	AK 103-110	G103T;R104P;D105V;H107K;S109E;V110I	1,3	0,8	0,9	0,6	0,9
16	106-115	AK 107-115	H107K;S109E;V110I;V111L;R112N;A113L;R114H R115Q	3,6	0,4	0,6	0,7	0,7
17	111-120	AK 111-120	V111L;R112N;A113L;R114H R115Q;T120F	0,2	0,5	0,4	0,7	0,7
18	116-125	AK 120-125	T120F;L122Y;A125L	3,8	4,6	2,7	8,8	1,5
19	121-130	AK 122-130	L122Y;A125L;S127T;L128F;A129S;P130R	175,0	N.B.	0,8	2,3	0,8
20	126-135	AK 127-135	S127T;L128F;A129S;P130R;K131S;A132D;Q133K;I134VKI35V	N.B.	N.B.	N.B.	3,7	0,6
21	131-140	AK 131-140	K131S;A132D;Q133K;I134VKI35V;L138S;R139H;A140S	N.B.	N.B.	1,0	3,1	0,5
22	136-145	AK 138-143	L138S;R139H;A140S;E141Q;R	1,9	1,0	0,5	0,8	1,0

			143V					
23	141-146	AK 141-143	E141Q;R143V	1,7	1,0	0,5	1,1	1,5
			KD Hu PD-1 ECD дикого типа (nM)	2,68E-11	3,38E-09	5,67E-09	6,08E-09	1,24E-09

	<5-кратное изменение $K_D$ Химерные мутанты
5-10	5-10-кратное изменение $K_D$ Химерные мутанты
10-50	10-50-кратное изменение $K_D$ Химерные мутанты
50-1000	50-1000-кратное изменение $K_D$ Химерные мутанты
N.B.	Связывание химерных мутантов отсутствует

\* Перечислено нормализованное связывание, выраженное как  $K_D$  мутанта/ $K_D$  дикого типа.

Таблица 12. Аффинность связывания Fab-антител с ECD PD-1 человека с аланин-сканированными остатками\*



	Мутация	12819. 17149	12865. 17150	ниволумаб	пембролизумаб	13112. 15380
	P21A	2,1	1,0	0,5	0,6	1,1
	G22A	1,0	0,9	0,6	0,8	1,0
5	D26A	1,1	0,8	1,7	0,7	1,2
	S27A	0,8	0,8	2,7	0,8	1,1
	D29A	1,0	0,9	1,7	0,7	1,0
	R30A	1,2	1,2	1,9	1,3	1,0
	P31A	1,1	1,0	2,6	1,0	1,1
10	N33A	1,0	1,1	0,8	0,8	1,0
	T36A	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9
	L42A	1,3	0,5	0,3	0,2	2,2
	V44A	1,4	0,8	0,5	0,3	9,9
	G47A	1,6	0,5	0,2	0,2	0,6
15	D48A	1,0	0,6	0,6	0,4	2,4
	N49A	1,1	0,7	0,5	0,5	1,0
	A50G	1,4	0,6	0,5	0,4	1,7
	F56A	1,5	0,5	1,7	0,6	0,8
	S57A	1,2	1,0	0,9	0,9	1,1
20	N58A	1,3	0,7	1,9	0,7	1,0
	T59A	0,9	1,0	1,3	0,3	0,9
	S60A	1,8	0,6	1,5	0,7	1,0
	E61A	1,2	1,1	0,5	0,3	1,0
	N66A	2,2	2,1	0,8	201,3	1,0
25	Y68A	2,2	1,4	0,2	0,2	0,8
	S71A	0,9	0,9	0,6	0,6	0,9
	P72A	1,1	1,8	0,9	0,8	1,0
	S73A	0,9	0,5	0,9	0,7	0,9
	Q75A	1,0	0,5	1,0	0,8	0,9
30	T76A	1,4	0,3	1,2	0,9	1,2
	D77A	2,8	0,3	1,0	134,2	1,0
	K78A	2,6	0,7	1,0	268,5	1,1
	A80G	1,2	0,4	1,1	0,8	1,0
	P83A	1,5	0,8	0,9	N.B.	0,9
35	E84A	1,3	1,0	0,8	1,3	1,0
	D85A	2,5	1,6	0,6	N.B.	0,9
	R86A	1,1	0,7	0,4	0,3	0,9
	S87A	1,3	0,9	0,8	107,4	1,0
	Q88A	1,4	1,4	0,8	0,2	0,9
40	P89A	1,1	0,9	1,1	N.B.	0,9
	G90A	1,0	0,8	1,0	671,1	1,0
	Q91A	0,8	1,0	1,0	0,7	1,0
	D92A	1,2	0,8	1,0	335,6	0,9
	C93A	1,2	0,9	1,1	1,2	1,1
45	R96A	1,0	0,8	0,9	0,5	1,0
	T98A	1,1	0,9	0,8	0,6	1,0
	P101A	1,1	1,0	0,6	0,5	0,9

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Мутация	12819. 17149	12865. 17150	ниволумаб	пембролизумаб	13112. 15380
N102A	1,5	0,6	0,2	0,3	0,7
G103A	1,1	0,8	0,5	0,5	0,9
R104A	1,0	0,8	0,6	0,4	0,7
R112A	0,7	0,9	0,8	0,6	0,9
R114A	0,8	0,8	0,7	0,6	0,9
N116A	1,4	0,8	0,6	0,6	0,9
G119A	1,0	0,4	0,5	0,5	1,0
G124A	0,5	4,0	0,3	0,6	1,0
L128A	17,1	2,1	1,5	335,6	0,9
P130A	105,1	0,5	2,6	0,6	0,9
K131A	N.B.	N.B.	1,0	1,6	0,9
A132G	53,4	1,4	0,9	0,5	1,0
Q133A	0,7	1,4	1,2	0,6	0,9
K135A	4,2	1,1	0,7	1,4	1,2
E136A	0,8	N.B.	0,9	0,9	1,0
L138A	1,0	1,1	1,0	1,0	1,2
R143A	0,9	0,7	0,7	0,5	1,0
T145A	1,1	0,7	0,9	0,5	82,4
E146A	1,2	1,0	1,0	0,9	1,0
R147A	0,7	1,0	0,8	0,7	0,7
R148A	0,3	1,0	0,8	0,8	1,1
A149G	0,8	1,0	0,8	0,8	1,0
E150A	1,0	1,0	0,7	0,7	1,0
P152A	1,4	0,9	0,6	0,6	1,0
T153A	0,9	1,0	0,9	0,9	1,0
A154G	0,8	1,0	1,0	1,0	1,0
H155A	1,1	1,0	1,3	1,2	1,0
P156A	1,0	1,1	2,2	1,2	1,5
S157A	0,9	1,0	2,2	1,8	1,0
P158A	1,2	0,9	0,9	0,9	1,0
S159A	1,1	0,8	0,7	0,7	0,9
P160A	1,0	0,8	0,9	0,7	1,0
R161A	0,9	1,1	1,0	1,1	1,1
P162A	1,3	1,1	1,0	1,0	1,1
A163G	1,0	1,1	0,8	0,8	1,1
G164A	1,1	0,9	0,5	0,6	1,0
Q165A	1,1	1,1	0,9	1,0	1,1
Крысиная мутация Q167A	0,8	1,0	0,8	0,7	0,9
Крысиная мутация P28L	1,9	0,5	0,8	0,7	0,7
Крысиная мутация R30K	2,9	0,5	0,5	1,1	0,7
Крысиная мутация A40T	2,0	1,0	0,8	0,8	0,6
Крысиная мутация V64K	35,7	1,3	0,7	N.B.	1,0
Крысиная мутация S157R	1,6	0,9	0,9	0,8	1,0

Мутация	12819. 17149	12865. 17150	ниволумаб	пембролизумаб	13112. 15380
$K_D$ hu PD-1 ECD (нМ)	2,68E-11	3,38E-09	5,67E-09	6,08E-09	1,24E-09
	<5-кратное изменение $K_D$ Аланиновые мутанты				
5-10	5-10-кратное изменение $K_D$ Аланиновые мутанты				
10-50	10-50-кратное изменение $K_D$ Аланиновые мутанты				
50-1000	50-1000-кратное изменение $K_D$ Аланиновые мутанты				
N.B.	Связывание аланиновых мутантов отсутствует				

\*Перечислено нормализованное связывание, выраженное как  $K_D$  мутанта/ $K_D$  дикого типа.

Таблица 13. Эпитопы связывания антител против PD-1, идентифицированные при помощи слитых конструкций Fc с мутантным PD-1

Антитело	Значимое блокирование PD-L1/L2	Эпитопная корзина	Линейный эпитоп	Контактные остатки
12819.17149	Да	1C	56-64, 69-90, 122-140	V64, L128, P130, K131, A132
12865.17150	Да	1E	69-90, 122-140	K131, E136
ниволумаб	Да	1D	127-135	
пембролизумаб	Да	1F	56-64, 76-95, 120-125	V64, N66, D77, K78, P83, D85, S87, P89, G90, D92, L128
13112.15380	Нет	2		V44, T145

#### Пример 12: Эффективность *in vivo* антитела 12819 в четырех моделях сингенных мышинных опухолей

[0262] В данном примере продемонстрирована эффективность *in vivo* антитела 12819 в четырех моделях сингенных мышинных опухолей.

#### Методы

[0263]  $2 \times 10^5$  Sa1N (фибросаркома),  $1 \times 10^6$  CT26 (карцинома толстой кишки),  $5 \times 10^6$  ASB-XIV (карцинома легкого) или  $8 \times 10^6$  MC38 (карцинома толстой кишки) клеток инокулировали подкожно, в бок самки возрастом 6-8 недель мыши линии A/J (Sa1N), BALB/cAnNRj (CT26 и ASB-XIV) или C57BL/6 (MC38). Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля по двум измерениям и вычисляли объем опухоли в  $\text{мм}^3$  согласно следующей формуле: (ширина)<sup>2</sup> × длина × 0,5. При среднем размере опухоли 30-50  $\text{мм}^3$  мышей рандомизировали в две группы по десять животных и начинали лечение. Мыши три раза в неделю получали в общей сложности шесть внутрибрюшинных инъекций буфера для разведения или моноклональное антитело 12819.17149 с последующим периодом наблюдения. Антитела вводили в дозе 10 мг/кг. Двухфакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Бонферрони применяли для сравнения объемов опухолей в каждый момент времени в разных группах лечения. Статистические анализы выполняли при использовании GraphPad Prism версии 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

#### Результаты

[0264] Результаты демонстрируют выраженное ингибирующее опухоль действие антитела 12819.17149 во всех протестированных моделях сингенных опухолей ( $P < 0,001$

в сравнении с растворителем) (Фигура 10). Антитело 12819.17149 вызывало регрессию роста опухоли в модели опухоли Sa1N и приводило к задержке роста опухоли в моделях опухолей CT26, MC38 и ASB-XIV.

**Пример 13: Эффективность *in vivo* антитела 12819 в модели полугуманизированной ксенотрансплантатной опухоли со смесью CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Т-клеток и клеток меланомы A375**  
 [0265] В данном примере продемонстрирована эффективность *in vivo* антитела 12819 в модели полугуманизированной ксенотрансплантатной опухоли, в которой линию клеток меланомы человека A375 смешивали с очищенными человеческими CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетками.

#### Методы

[0266] 4,5×10<sup>5</sup> CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток выделяли у человека донора МКПК и смешивали с 2,05×10<sup>6</sup> раковых клеток A375 (меланома человека) перед подкожной инокуляцией в бок самкам мышей NOD<sup>scid</sup> возрастом 6-8 недель. Лечение начинали в день инокуляции опухоли, при этом мыши три раза в неделю получали в общей сложности шесть внутривенных инъекций буфера для разведения, Китруды® (пембролизумаба) (10 мг/кг) или моноклонального антитела 12819.17149 (10 мг/кг), с последующим периодом наблюдения. Опухоли измеряли три раза в неделю с помощью штангенциркуля по двум измерениям и вычисляли объем опухоли в мм<sup>3</sup> согласно следующей формуле:

(ширина)<sup>2</sup>×длина×0,5. Двухфакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Бонферрони применяли для сравнения объемов опухолей в каждый момент времени в различных группах лечения. Статистические анализы выполняли при использовании GraphPad Prism версии 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

#### Результаты

[0267] В модели полугуманизированной опухоли лечение антителом 12819.17149 приводило к значимой задержке роста опухоли (P<0,001 в сравнении с растворителем), тогда как Китруда® показала ограниченное воздействие на рост опухоли при сравнении с группой, получавшей растворитель (Фигура 11).

**Таблица 14. Список SEQ ID NO**

SEQ ID NO	Последовательность
1	Аминокислотная последовательность человеческого PD-1
2	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>H</sub> [12819.15384]
3	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>L</sub> [12819.15384]
4	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>H</sub> [12748.15381]
5	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>L</sub> [12748.15381]
6	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>H</sub> [12865.15377]
7	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>L</sub> [12865.15377]
8	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>H</sub> [12892.15378]
9	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>L</sub> [12892.15378]
10	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>H</sub> [12796.15376]
11	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>L</sub> [12796.15376]
12	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>H</sub> [12777.15382]
13	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>L</sub> [12777.15382]
14	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>H</sub> [12760.15375]
15	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>L</sub> [12760.15375]
16	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>H</sub> [13112.15380]
17	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>L</sub> [13112.15380]

	18-65	CDR-последовательности; см. SEQ ID NO в Таблице 2 и последовательности в Таблице 5, а также Список последовательностей ниже
	66	Гуманизированная аминокислотная последовательность V <sub>L</sub> [12748.16124] (альтернативная зародышевая линия)
5	67	Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 (вариант LALA)
	68	Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи
	69	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>H</sub> [12819.15384]
	70	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>L</sub> [12819.15384]
	71	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>H</sub> [12748.15381]
	72	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>L</sub> [12748.15381]
10	73	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>H</sub> [12865.15377]
	74	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>L</sub> [12865.15377]
	75	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>H</sub> [12892.15378]
	76	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>L</sub> [12892.15378]
	77	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>H</sub> [12796.15376]
15	78	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>L</sub> [12796.15376]
	79	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>H</sub> [12777.15382]
	80	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>L</sub> [12777.15382]
	81	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>H</sub> [12760.15375]
	82	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>L</sub> [12760.15375]
20	83	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>H</sub> [13112.15380]
	84	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>L</sub> [13112.15380]
	85	Гуманизированная последовательность ДНК V <sub>L</sub> [12748.16124] (альтернативная зародышевая линия)
	86	Последовательность геномной ДНК константной области тяжелой цепи с включенными интронами
	87	Последовательность кДНК константной области тяжелой цепи
	88	Последовательность ДНК лямбда константной области легкой цепи
25	89	Полипептид PD-1 <i>Macaca fascicularis</i> , рег. номер NCBI B0LAJ3_MACFA
	90	Полипептид PD-1 <i>Gallus Gallus</i> , рег. номер NCBI XP_422723.3
	91	Полипептид PD-1 <i>Mus musculus</i> , рег. номер NCBI NP_032824.1
	92	Полипептид PD-1 <i>Rattus norvegicus</i> , рег. номер NCBI XP_006245633.1

### Список последовательностей

- 30 \*Выделением курсивом в последовательностях ДНК обозначены сайты клонирования.  
 SEQ ID NO: 1 (полипептид PD-1 человека, рег. номер Uniprot Q15116 (PDCD1\_HUMAN))  
 MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSF  
 SNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR  
 RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRAGQFQTLVGVV  
 35 GLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWRE  
 KTPPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL  
 SEQ ID NO: 2 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>H</sub>  
 [12819.15384])  
 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTRYDMVWVRQAPGKGLEWVAGIGDSN  
 40 KMTRYAPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GSCIACWDEAGRID  
 AWGQGTLVTVSS  
 SEQ ID NO: 3 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>L</sub>  
 [12819.15384])  
 SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGGSYDGSSYYGWYQQKPGQAPVTVIYN NNNRNP  
 45 SDIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCGSYDRPETNSDYVGMFGSGTKVTVL  
 SEQ ID NO: 4 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>H</sub>  
 [12748.15381] и [12748.16124])

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMNWVRQAPGKGLEWVAGIGNDG  
SYTNYGA AVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDIRSRNDCSYFLGGC  
SSGFIDVWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 5 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>L</sub>

5 [12748.15381])

SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGSSSYSGWFQQKPGQAPVTVIYESNNRPSDIPDR  
FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCGNADSSSGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 6 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>H</sub>

[12865.15377])

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSDHGMQWVRQAPGKGLEYYVGVIDTTGR  
YTTYAPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTTCVGGYLCNTVGSID  
AWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 7 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>L</sub>

[12865.15377])

15 SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGGSSSYSGWYQQKPGQAPVTVIYDDTNRPSGIP  
DRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCGGYEGSSHAGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 8 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>H</sub>

[12892.15378])

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSYTMQWVRQAPGKGLEWVGVISSTGG  
STGYGPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKSISGDAWSVDGLDAW  
QGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 9 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>L</sub>

[12892.15378])

25 SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGGSAYGWYQQKPGQAPVTVIYYNNQRPSGIPDR  
FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCGSYDSSAVGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 10 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>H</sub>

[12796.15376])

30 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSYTMQWVRQAPGKGLEWVGVISSTGG  
STGYGPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKSVSGDAWSVDGLDAW  
QGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 11 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>L</sub>

[12796.15376])

35 SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGGSAYGWYQQKPGQAPVTVIYYNNQRPSDIPDR  
FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCGSYDSSAVGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 12 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>H</sub>

[12777.15382])

40 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSYGMQWVRQAPGKGLEWVGVISGSGI  
TTLYAPAVKGRATISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSPSITDGWTYGGAWID  
AWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 13 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>L</sub>

[12777.15382])

45 SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGDGSYSGWFQQKPGQAPVTVIYDNDNRPSDIPDR  
FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCGNADLSGGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 14 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>H</sub>

[12760.15375])

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFNMVWVRQAPGKGLEYYVAEISSDGSF

TWYATAVKGRATISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSDCSSSYGYSCIGHID  
AWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 15 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>L</sub>  
[12760.15375])

SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGISDDGSYYYGWFFQKPGQAPVTVIYINDRRPS  
NIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCGSYDSSAGVGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 16 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>H</sub>  
[13112.15380])

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMFVWRQAPGKGLFVAEISGSNTG  
SRTWYAPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSIYGGYCAGGYSCG  
VGLIDAWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 17 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>L</sub>  
[13112.15380])

SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGSSDYYGWFQKPGQAPVTVIYYNNKRPSDIPD  
RFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCGNADSSVGVFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 18 (аминокислотная последовательность HCDR1 12819)  
GFTFTRYD

SEQ ID NO: 19 (аминокислотная последовательность HCDR2 12819)

IGDSNKMT

SEQ ID NO: 20 (аминокислотная последовательность HCDR3 12819)

CAKGSCIACWDEAGRIDAW

SEQ ID NO: 21 (аминокислотная последовательность LCDR1 12819)  
GSYDGSSY

SEQ ID NO: 22 (аминокислотная последовательность LCDR2 12819)  
NNN

SEQ ID NO: 23 (аминокислотная последовательность LCDR3 12819)  
CGSYDRPETNSDYVGMF

SEQ ID NO: 24 (аминокислотная последовательность HCDR1 12748)  
GFTFSDYA

SEQ ID NO: 25 (аминокислотная последовательность HCDR2 12748)  
IGNDGSYT

SEQ ID NO: 26 (аминокислотная последовательность HCDR3 12748)  
CASDIRSRNDCSYFLGGCSSGFIDVW

SEQ ID NO: 27 (аминокислотная последовательность LCDR1 12748)  
SSYS

SEQ ID NO: 28 (аминокислотная последовательность LCDR2 12748)  
ESN

SEQ ID NO: 29 (аминокислотная последовательность LCDR3 12748)  
CGNADSSSGIF

SEQ ID NO: 30 (аминокислотная последовательность HCDR1 12865)  
GFD FSDHG

SEQ ID NO: 31 (аминокислотная последовательность HCDR2 12865)  
IDTTGRYT

SEQ ID NO: 32 (аминокислотная последовательность HCDR3 12865)  
CAKTTTCVGGYLCNTVGSIDAW

SEQ ID NO: 33 (аминокислотная последовательность LCDR1 12865)  
GSSSY

SEQ ID NO: 34 (аминокислотная последовательность LCDR2 12865)  
DDT

SEQ ID NO: 35 (аминокислотная последовательность LCDR3 12865)  
CGGYEGSSHAGIF

5 SEQ ID NO: 36 (аминокислотная последовательность HCDR1 12892)  
GFDFSSYT

SEQ ID NO: 37 (аминокислотная последовательность HCDR2 12892)  
ISSTGGST

10 SEQ ID NO: 38 (аминокислотная последовательность HCDR3 12892)  
CVKSISGDAWSVDGLDAW

SEQ ID NO: 39 (аминокислотная последовательность LCDR1 12892)  
GSA

SEQ ID NO: 40 (аминокислотная последовательность LCDR2 12892)  
YNN

15 SEQ ID NO: 41 (аминокислотная последовательность LCDR3 12892)  
CGSYDSSAVGIF

SEQ ID NO: 42 (аминокислотная последовательность HCDR1 12796)  
GFDFSSYT

SEQ ID NO: 43 (аминокислотная последовательность HCDR2 12796)  
20 ISSTGGST

SEQ ID NO: 44 (аминокислотная последовательность HCDR3 12796)  
CVKSVSGDAWSVDGLDAW

SEQ ID NO: 45 (аминокислотная последовательность LCDR1 12796)  
GSA

25 SEQ ID NO: 46 (аминокислотная последовательность LCDR2 12796)  
YNN

SEQ ID NO: 47 (аминокислотная последовательность LCDR3 12796)  
CGSYDSSAVGIF

SEQ ID NO: 48 (аминокислотная последовательность HCDR1 12777)  
30 GFDFSSYG

SEQ ID NO: 49 (аминокислотная последовательность HCDR2 12777)  
ISGSGITT

SEQ ID NO: 50 (аминокислотная последовательность HCDR3 12777)  
CTRSPSITDGWTYGGAWIDAW

35 SEQ ID NO: 51 (аминокислотная последовательность LCDR1 12777)  
DGS

SEQ ID NO: 52 (аминокислотная последовательность LCDR2 12777)  
DND

SEQ ID NO: 53 (аминокислотная последовательность LCDR3 12777)  
40 CGNADLSGGIF

SEQ ID NO: 54 (аминокислотная последовательность HCDR1 12760)  
GFTFSTFN

SEQ ID NO: 55 (аминокислотная последовательность HCDR2 12760)  
ISSDGSFT

45 SEQ ID NO: 56 (аминокислотная последовательность HCDR3 12760)  
CAKSDCSSSYGYSCIGIIDAW

SEQ ID NO: 57 (аминокислотная последовательность LCDR1 12760)  
ISDDGSYY



SEQ ID NO: 58 (аминокислотная последовательность LCDR2 12760)

IND

SEQ ID NO: 59 (аминокислотная последовательность LCDR3 12760)

CGSYDSSAGVGIF

5 SEQ ID NO: 60 (аминокислотная последовательность HCDR1 13112)

GFTFSSYN

SEQ ID NO: 61 (аминокислотная последовательность HCDR2 13112)

ISGSNTGSRT

SEQ ID NO: 62 (аминокислотная последовательность HCDR3 13112)

10 CAKSIYGGYCAGGYSCGVGLIDAW

SEQ ID NO: 63 (аминокислотная последовательность LCDR1 13112)

SSDY

SEQ ID NO: 64 (аминокислотная последовательность LCDR2 13112)

YNN

15 SEQ ID NO: 65 (аминокислотная последовательность LCDR3 13112)

CGNADSSVGVF

SEQ ID NO: 66 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V<sub>L</sub>

[12748.16124] (альтернативная зародышевая линия))

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSSYSYGWFQQKPGQAPVTVIYESNNRPSDIPERF

20 SGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGNADSSSGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 67 (Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG

25 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP

PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT

VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30 SEQ ID NO: 68 (Аминокислотная последовательность лямбда константной области легкой цепи)

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTK

PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 69 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>H</sub> [12819.15384])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTG

35 GATCCCTGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCTGGATTCACCTTTACAAGATACGACATGG

TGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTGGCTGGTATCGGCGAT

AGTAACAAGATGACCCGCTACGCACCTGCCGTCAAAGGGAGGGCAACAATTAGTCG

GGACAACCTCAAAGAATACTCTGTATCTGCAGATGAATCCCTGCGAGCTGAGGATA

40 CAGCAGTGTACTATTGTGCCAAAGGTAGCTGCATCGCCTGTTGGGACGAAGCTGGC

CGTATTGATGCATGGGGACAGGGGACTCTGGTGACCGTCTCGAG

SEQ ID NO: 70 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>L</sub> [12819.15384])

GCTAGCCTCTTACGAGCTGACTCAGGACCCTGCAGTGAGTGTGCGCCCTGGGCCAG

ACAGTGAGAATCACTTGCTCCGGCGGAGGGAGCTACGATGGTTCCAGCTACTATGG

45 CTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTGTGACCGTCATCTATAACAATAACA

ATAGGCCATCTGACATTCCCGATCGGTTTCAGTGGATCTAGTTCAGGGAACACAGCTT

CTCTGACCATTACAGGAGCCCAGGCTGAGGACGAAGCAGATTACTATTGTGGGTCA

TACGACAGGCCAGAAACAAATCCGATTATGTGGGAATGTTTGGTAGCGGCACTAA

AGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 71 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>H</sub> [12748.15381] и [12748.16124])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAAGCGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTG  
 5 GATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACATTTTCTGACTACGCCATGA  
 ACTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTTCGAGGAATCGGGAA  
 CGATGGAAGTTACACTAATTATGGAGCAGCCGTGAAGGGGAGAGCTACTATTTCCC  
 GCGACAACAGCAAAAATACCCTGTACCTGCAGATGAACTCACTGAGAGCTGAAGAT  
 ACCGCAGTGTACTATTGTGCCTCTGACATCAGGAGTCGGAATGATTGCTCCTATTTT  
 10 CTGGGAGGGTGTTCAGCGGCTTTATTGACGTGTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCAC  
 AGTCTCGAG

SEQ ID NO: 72 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>L</sub> [12748.15381])

GCTAGCCTCTTACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTCGCCCTGGGCCAG  
 ACAGTGAGAATCACTTGCTCCGGCGGATCCAGCTACAGCTATGGGTGGTTCCAGCA  
 15 GAAGCCCGGTGAGGCCCTGTGACCGTCATCTATGAAAGTAACAATAGGCCATCAG  
 ACATTCCCGATCGGTTTTCTGGCTCTAGTTCAGGAAACACAGCTAGTCTGACCATCA  
 CAGGGGCCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGCAATGCAGATTCCAGC  
 TCTGGAATTTTCGGGTCCGGTACTAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 73 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>H</sub> [12865.15377])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTG  
 GATCCCTGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCTGGATTCGACTTTAGCGATCACGGGATGC  
 AGTGGGTGAGACAGGCACCAGGCAAGGGACTGGAGTACGTGGGTGTCATCGACAC  
 CACAGGCCGCTATACATACTATGCACCTGCCGTCAAGGGCAGGGCTACCATTAGTC  
 25 GGGACAACCTCAAAAATACACTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGAGGGCTGAAGAT  
 ACTGCAGTGTACTATTGCGCCAAAACCTACCTGCGTGGGAGGGTACCTGTGCAATAC  
 CGTCGGAAGTATCGATGCTTGGGGACAGGGGACACTGGTGACTGTCTCGAG

SEQ ID NO: 74 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>L</sub> [12865.15377])

GCTAGCCTCCTACGAGCTGACTCAGGACCCAGCAGTGAGCGTCGCCCTGGGCCA  
 30 GACAGTGAGAATCACTTGCTCTGGCGGAGGGTCCAGCTCTTACTATGGTTGGTACCA  
 GCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGACCGTCATCTATGACGATACAAACAGGCCAA  
 GTGGAATTCCCGATCGGTTCTCAGGTAGTTCATCCGGCAATACAGCTTCTCTGACCA  
 TCACAGGGGCCCAGGCTGAGGACGAAGCAGATTACTATTGTGGTGGCTATGAAGGA  
 AGCTCTCACGCCGGGATTTTTTGAAGTGGGACTAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 75 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>H</sub> [12892.15378])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAAGTGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTG  
 GAAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCTAGTGGCTTCGACTTTTCCAGCTACACCATGC  
 AGTGGGTGAGGCAGGCACCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGGCGTCATCTCTAGT  
 ACTGGAGGGTCTACCGGATACGGGCCTGCTGTGAAGGGAAGGGCAACAATTTACG  
 40 GGATAACTCCAAAATACTCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAAGACA  
 CAGCCGTGTACTATTGCGTGAAATCAATCTCCGGAGATGCCTGGTCTGTGGACGGGC  
 TGGATGCTTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACAGTCTCGAG

SEQ ID NO: 76 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>L</sub> [12892.15378])

GCTAGCCTCATACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTCGCCCTGGGACA  
 45 GACAGTGAGAATCACTTGCTCCGGAGGAGGATCCGCCTACGGTTGGTATCAGCAGA  
 AGCCCGGCCAGGCACCTGTGACCGTCATCTACTATAACAATCAGAGGCCATCTGGC  
 ATTCCCGACCGGTTTCAGTGGATCCAGCTCTGGGAACACAGCAAGTCTGACCATCAC  
 AGGCGCCCAGGCTGAGGACGAAGCCGATTACTATTGTGGAAGCTATGATAGTTCAG

CTGTGGGGATTTTTGGTTCTGGCACTAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 77 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>H</sub> [12796.15376])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAAGGTGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTG  
 GAAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCTAGTGGCTTCGACTTTTCCAGCTACACCATGC  
 5 AGTGGGTGAGGCAGGCACCAAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGGCGTCATCTCTAGT  
 ACTGGAGGGTCTACCGGATACGGGCCTGCTGTGAAGGGAAGGGCAACAATTTACG  
 GGATAACTCCAAAAATACTCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAAGACA  
 CAGCCGTGTACTATTGCGTGAAATCAGTCTCCGGAGATGCCTGGTCTGTGGACGGGC  
 TGGATGCTTGGGGTCAGGGCACCTGGTCACAGTCTCGAG

10 SEQ ID NO: 78 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>L</sub> [12796.15376])

GCTAGCCTCATACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTCGCCCTGGGCCAG  
 ACAGTGAGAATCACTTGCTCCGGAGGAGGATCCGCCTACGGTTGGTATCAGCAGAA  
 GCCCGGCCAGGCACCTGTGACCGTCATCTACTATAACAATCAGAGGCCATCTGACA  
 TTCCCGATCGGTTCACTGGATCCAGCTCTGGGAACACAGCAAGTCTGACCATCACA  
 15 GGCGCCCAGGCTGAGGACGAAGCCGATTACTATTGTGGAAGCTATGATAGTTCAGC  
 TGTGGGGATTTTTGGTTCTGGCACTAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 79 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>H</sub> [12777.15382])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTG  
 20 GAAGCCTGCGACTGTCTTGCGCCGCTAGTGGATTCGACTTTTCCAGCTACGGAATGC  
 AGTGGGTGAGGCAGGCACCAAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGGCGTCATCTCTGG  
 AAGTGGGATTACCACACTGTACGCACCTGCCGTCAAGGGAAGGGCTACTATCTCAC  
 GGGACAACCTCTAAAAATACAGTGTATCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCTGAAGAT  
 ACCGCAGTCTACTATTGTACACGCTCACCTCCATCACAGACGGCTGGACTTATGGA  
 25 GGGGCCTGGATTGATGCTTGGGGTCAGGGCACTCTGGTGACCGTCTCGAG

SEQ ID NO: 80 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>L</sub> [12777.15382])

GCTAGCCAGCTACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTCGCCCTGGGCCA  
 GACAGTGAGAATCACTTGCACTGGCGGAGATGGGTTCATACGGTTGGTTCCAGCAGA  
 AGCCCGGACAGGCCCCTGTGACCGTCATCTATGACAACGATAATAGGCCATCTGAC  
 30 ATTCCCGATCGGTTTAGTGGCTCCAGCTCTGGAAACACAGCTTCTCTGACCATCACA  
 GGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGCAATGCAGACCTGTCCGG  
 GGGTATTTTCGGCAGCGGAACCTAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 81 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>H</sub> [12760.15375])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTG  
 35 GATCCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTTCTGGATTCACCTTTAGTACATTCAACATGG  
 TGTGGGTGAGGCAGGCACCTGGAAAGGGACTGGAGTACGTGGCTGAAATCTCCAGC  
 GACGGCTCTTTTACATGGTATGCAACTGCCGTCAAGGGCAGGGCCACCATTAGTCG  
 GGATAACTCAAAAAATACAGTGTACCTGCAGATGAATTCCCTGAGGGCTGAGGACA  
 CCGCAGTCTACTATTGCGCAAAATCCGATTGTTCTAGTTCATACTATGGATATAGCT  
 40 GTATCGGGATCATTGACGCTTGGGGTCAGGGCACTCTGGTGACCGTCTCGAG

SEQ ID NO: 82 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>L</sub> [12760.15375])

GCTAGCCTCCTATGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGAGCGTCGCCCTGGGCCA  
 GACAGTGAGAATCACTTGCTCCGGCGGAATTAGCGACGATGGCTCTTACTATTACG  
 45 GATGGTTCCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCCTGTGACCGTCATCTATATTAACGAC  
 AGGCGGCCAAGTAATATCCCCGATAGGTTTTTCAGGGTCCAGCTCTGGTAACACAGC  
 TTCTCTGACCATTACAGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTATTACTGTGGCTC  
 TTACGATAGTTCAGCAGGGGTGGGTATCTTCGGCAGTGGAACCTAAAGTCACCGTCC  
 TAGG

SEQ ID NO: 83 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>H</sub> [13112.15380])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTG  
GATCACTGAGACTGTCTTGCGCCGCCCTCCGGCTTCACCTTTTCCAGCTACAACATGT  
TCTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTTTGTGCTGAAATCTCTGGT  
5 AGTAATACTGGAAGCCGAACCTGGTACGCACCTGCCGTGAAGGGCAGGGCTACAAT  
TTCTCGGGACAACAGTAAAAATACTCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAGGGCTGA  
GGATACAGCAGTGTACTATTGTGCAAAATCAATCTACGGAGGGTATTGCGCCGGTG  
GCTATTCCTGTGGTGTGGGCCTGATTGACGCATGGGGACAGGGGACCCTGGTCACA  
GTCTCGAG

10 SEQ ID NO: 84 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>L</sub> [13112.15380])

GCTAGCCTCATACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTCGCCCTGGGCCAG  
ACAGTGAGAATCACTTGCAGTGGCGGATCCAGCGATTACTATGGGTGGTTCCAGCA  
GAAGCCCGGTTCAGGCCCCCTGTGACCGTCATCTACTATAACAACAAGAGGCCATCTG  
ACATTCCCGATCGGTTTAGTGGCTCTAGTTCAGGAAACACAGCCTCCCTGACCATTA  
15 CAGGGGCCCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGCAATGCAGACTCCAGC  
GTGGGAGTCTTCGGGTCTGGTACTAAGGTGACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 85 (Гуманизированная последовательность ДНК V<sub>L</sub> [12748.16124]

(альтернативная зародышевая линия))

20 GCTAGCCTCTTACGAGCTGACTCAGCCACCTTCCGTGTCCGTGTCCCCAGGACAG  
ACCGCAAGAATCACATGCAGTGGCGGATCCAGCTACTCATATGGGTGGTTCCAGCA  
GAAGCCTGGTCAGGCCCCCGTGACAGTCATCTATGAGAGCAACAATAGGCCTTCTG  
ACATTCCAGAACGGTTTAGTGGCTCTAGTTCAGGAACCACAGTGAATCTGACCATCA  
GCGGGGTCCAGGCCGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGCAACGCTGATTCCAGC  
25 TCTGGAATTTTCGGGTCCGGTACAAAAGTGAATGTCTCCTAGG

SEQ ID NO: 86 (Последовательность геномной ДНК константной области тяжелой цепи с включенными интронами)

CTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG  
AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA  
30 ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC  
CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT  
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC  
ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTG  
CTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCAGTC  
35 CAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTACCCCGAGGCCTCTGCCCCGCCCC  
ACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAG  
GCTAGGTGCCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGAC  
CTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGG  
CCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAACTC  
40 CCAATCTTCTCTCTGCAAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGT  
GCCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCT  
AGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCA  
TCTCTTCCTCAGCACCTGAAGcgcgcGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA  
CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGG  
45 CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG  
TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT  
GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT  
GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC

AAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGGAGGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCCA  
 CCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGA  
 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT  
 CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG  
 5 AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC  
 GACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAACAAGAGCAGGTGGCAGCA  
 GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA  
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 87 (Последовательность кДНК константной области тяжелой цепи)

10 CTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG  
 AGCACCTCTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA  
 ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC  
 CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT  
 CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC  
 15 ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCC  
 ACCGTGCCCAGCACCTGAAGccgccGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCAAAC  
 CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC  
 GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT  
 GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG  
 20 GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG  
 CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA  
 AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG  
 ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT  
 CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT  
 25 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAACAAG  
 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA  
 CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 88 (Последовательность ДНК лямбда константной области легкой цепи)

CCTAGGTCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAG  
 30 GAGCTCCAAGCCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGG  
 AGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAG  
 ACCACCAAACCTCCAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAG  
 CCTGACGCCCCGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATG  
 AAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTTCATAA

35 SEQ ID NO: 89 (Полипептид PD-1 *Macaca fascicularis*, рег. номер NCBI B0LAJ3\_MACFA)

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLESPDR PWNAPTFSPA LLLVTEGDNA  
 TFTCSFSNAS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFVTRL  
 PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP  
 RPAGQFQALV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAAQGTI EARRTGQPLK  
 40 EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPAP CVPEQTEYAT IVFPSGLGTS SPARRGSADG  
 PRSPRPLRPE DGHCSWPL

SEQ ID NO: 90 (Полипептид PD-1 *Gallus Gallus*, рег. номер NCBI XP\_422723.3)

MGKEAPSGTG HRHRAQQGTR RPAMALGTSR TMWDSTEAL VVLCVLLLCC  
 NPPLAGCHQV TLFPATLTRP AGSSATFICN ISMENSSELEF NLNWDYQKTN SNPKIAGII  
 45 RNIPQKKMEK YRLFNNTPVF KMEILNLHQND SGFYCYGLI TFSRSDKVVE SSHSQILVTE  
 APEKNTIDE PSEEESSPPD HIKAVLLGTL LLAGVIVLLL FGYYIINNRR ADVQKPSSGN  
 TLAEVKPPVV PVPTVDYGVLEFQRDPHSQV PLETCPAEQT EYATIVFPPEE KPITPERGKR  
 HKDERTWQLP

## SQPC

SEQ ID NO: 91 (Полипептид PD-1 *Mus musculus*, рег. номер NCBI NP\_032824.1)

MWVRQVPWSF TWAVLQLSWQ SGWLLEVPNG PWRSLTFYPA WLTVSEGAN  
 TFTCSLSNWS EDLMLNWNRL SPSNQTEKQA AFCNGLSQPV QDARFQIIQL  
 5 PNRHDFHMNI LDTRRNDSGI YLCGAISLHP KAKIEESPGA ELVVTERILE TSTRYPSPSP  
 KPEGRFQGMV IGIMSALVGI PVLLLLLAWAL AVFCSTSMSE ARGAGSKDDT  
 LKEEPSAAPV PSVAYEELDF QGREKTPELP TACVHTEYAT IVFTEGLGAS AMGRRGSADG  
 LQGPRPPRHE DGHCSWPL

SEQ ID NO: 92 (Полипептид PD-1 *Rattus norvegicus*, рег. номер NCBI XP\_006245633.1)

10 MWVRQVPWSF TWAVLQLSWQ SGWLLEVPNG PWRSLTFYPA WLTVSEGAN  
 TFTCSLSNWS EDLMLNWNRL SPSNQTEKQA AFCNGLSQPV QDARFQIIQL  
 PNRHDFHMNI LDTRRNDSGI YLCGAISLHP KAKIEESPGA ELVVTERILE TSTRYPSPSP  
 KPEGRFQGMV IGIMSALVGI PVLLLLLAWAL AVFCSTSMSE ARGAGSKDDT  
 LKEEPSAAPV PSVAYEELDF QGREKTPELP TACVHTEYAT IVFTEGLGAS AMGRRGSADG  
 15 LQGPRPPRHE DGHCSWPL

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

&lt;110&gt; SYMPHOGEN A/S

&lt;120&gt; АНТИТЕЛЯ ПРОТИВ PD-1 И КОМПОЗИЦИИ

&lt;130&gt; 022675.WO052

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; 62/236,341

&lt;151&gt; 2015-10-02

&lt;160&gt; 92

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 288

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln  
 1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp  
 20 25 30

35 Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp  
 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val  
 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala  
 40 65 70 75 80

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

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg  
 100 105 110

45 Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu  
 115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val  
 130 135 140

# RU 2750675 C1

	Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro
	145					150					155					160
	Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly
						165					170					175
5	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys
						180					185				190	
	Ser	Arg	Ala	Ala	Arg	Gly	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro
						195					200				205	
	Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Tyr	Gly
10						210					215				220	
	Glu	Leu	Asp	Phe	Gln	Trp	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Val	Pro
	225					230					235					240
	Cys	Val	Pro	Glu	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	Ser	Gly
						245					250					255
15	Met	Gly	Thr	Ser	Ser	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Pro	Arg
						260					265				270	
	Ser	Ala	Gln	Pro	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Gly	His	Cys	Ser	Trp	Pro	Leu
						275					280				285	
	<210> 2															
20	<211> 124															
	<212> Белок															
	<213> Искусственная последовательность															
	<220>															
	<221> источник															
25	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"															
	<400> 2															
	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1					5					10				15	
30	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr
						20					25				30	
	Asp	Met	Val	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
						35					40				45	
	Ala	Gly	Ile	Gly	Asp	Ser	Asn	Lys	Met	Thr	Arg	Tyr	Ala	Pro	Ala	Val
35						50					55				60	
	Lys	Gly	Arg	Ala	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	
40	Ala	Lys	Gly	Ser	Cys	Ile	Ala	Cys	Trp	Asp	Glu	Ala	Gly	Arg	Ile	Asp
						100					105				110	
	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
						115					120					
	<210> 3															
45	<211> 114															
	<212> Белок															
	<213> Искусственная последовательность															
	<220>															

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 3

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

Val Leu

20 <210> 4

<211> 131

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

25 <221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 4

30 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 35 40 45  
Ala Gly Ile Gly Asn Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Gly Ala Ala Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Ala 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  
40 85 90 95  
Ala Ser Asp Ile Arg Ser Arg Asn Asp Cys Ser Tyr Phe Leu Gly Gly  
100 105 110  
Cys Ser Ser Gly Phe Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115 120 125

45 Val Ser Ser

130

<210> 5

<211> 104



&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

&lt;400&gt; 5

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
1 5 10 15

10 Thr Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Ser Tyr Ser Tyr Gly Trp  
20 25 30

Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Glu Ser  
35 40 45

15 Asn Asn Arg Pro Ser Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser  
50 55 60

Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu  
65 70 75 80

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Asn Ala Asp Ser Ser Ser Gly Ile Phe Gly  
85 90 95

20 Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; Белок

25 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

&lt;400&gt; 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Asp His  
20 25 30

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

Gly Val Ile Asp Thr Thr Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Pro Ala Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Thr Thr Cys Val Gly Gly Tyr Leu Cys Asn Thr Val Gly Ser  
100 105 110

45 Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

&lt;400&gt; 7

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
1 5 10 15

10 Thr Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly  
20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Asp  
35 40 45

15 Asp Thr Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser  
50 55 60

Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp  
65 70 75 80

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly Tyr Glu Gly Ser Ser His Ala Gly  
85 90 95

20 Ile Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; Белок

25 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

&lt;400&gt; 8

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

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

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

Gly Val Ile Ser Ser Thr Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Gly Pro Ala Val  
50 55 60

40 Lys Gly Arg Ala 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

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

45 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 104

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

&lt;400&gt; 9

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
1 5 10 15

10 Thr Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Gly Trp Tyr  
20 25 30

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Tyr Asn Asn  
35 40 45

15 Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly  
50 55 60

Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala  
65 70 75 80

Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Ala Val Gly Ile Phe Gly  
85 90 95

20 Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; Белок

25 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

30 <400> 10

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

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

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

Gly Val Ile Ser Ser Thr Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Gly Pro Ala Val  
50 55 60

40 Lys Gly Arg Ala 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

Val Lys Ser Val Ser Gly Asp Ala Trp Ser Val Asp Gly Leu Asp Ala  
100 105 110

45 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 104

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

&lt;400&gt; 11

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
1 5 10 15

10 Thr Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Gly Trp Tyr  
20 25 30

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Tyr Asn Asn  
35 40 45

15 Gln Arg Pro Ser Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly  
50 55 60

Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala  
65 70 75 80

Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Ala Val Gly Ile Phe Gly  
85 90 95

20 Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; Белок

25 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

&lt;400&gt; 12

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

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

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

Gly Val Ile Ser Gly Ser Gly Ile Thr Thr Leu Tyr Ala Pro Ala Val  
50 55 60

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

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

Thr Arg Ser Pro Ser Ile Thr Asp Gly Trp Thr Tyr Gly Gly Ala Trp  
100 105 110

45 Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 103

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

&lt;400&gt; 13

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
1 5 10 15

10 Thr Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Asp Gly Ser Tyr Gly Trp Phe  
20 25 30

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Asp Asn Asp  
35 40 45

15 Asn Arg Pro Ser Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly  
50 55 60

Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala  
65 70 75 80

Asp Tyr Tyr Cys Gly Asn Ala Asp Leu Ser Gly Gly Ile Phe Gly Ser  
85 90 95

20 Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 127

&lt;212&gt; Белок

25 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

&lt;400&gt; 14

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

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

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

Ala Glu Ile Ser Ser Asp Gly Ser Phe Thr Trp Tyr Ala Thr Ala Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Ser Asp Cys Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Tyr Ser Cys Ile Gly  
100 105 110

45 Ile Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 110

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 15

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
1 5 10 15

10 Thr Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ile Ser Asp Asp Gly Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Tyr Gly Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Val  
35 40 45

15 Ile Tyr Ile Asn Asp Arg Arg Pro Ser Asn Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln  
65 70 75 80

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Ala  
85 90 95

20 Gly Val Gly Ile Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 16

<211> 131

<212> Белок

25 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

30 <400> 16

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

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

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

Ala Glu Ile Ser Gly Ser Asn Thr Gly Ser Arg Thr Trp Tyr Ala Pro  
50 55 60

40 Ala Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Lys Ser Ile Tyr Gly Gly Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser  
100 105 110

45 Cys Gly Val Gly Leu Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115 120 125

Val Ser Ser  
130

<210> 17  
 <211> 104  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 5 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полипептид"  
 <400> 17  
 10 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Ser Asp Tyr Tyr Gly Trp  
 20 25 30  
 Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Tyr Asn  
 15 35 40 45  
 Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu  
 65 70 75 80  
 20 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Asn Ala Asp Ser Ser Val Gly Val Phe Gly  
 85 90 95  
 Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100  
 <210> 18  
 25 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 30 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 18  
 Gly Phe Thr Phe Thr Arg Tyr Asp  
 1 5  
 35 <210> 19  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 40 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 19  
 Ile Gly Asp Ser Asn Lys Met Thr  
 45 1 5  
 <210> 20  
 <211> 19  
 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 5 пептид"  
 <400> 20  
 Cys Ala Lys Gly Ser Cys Ile Ala Cys Trp Asp Glu Ala Gly Arg Ile  
 1 5 10 15  
 Asp Ala Trp  
 10 <210> 21  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 15 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 21  
 Gly Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Tyr  
 20 1 5  
 <210> 22  
 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 25 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 22  
 30 Asn Asn Asn  
 1  
 <210> 23  
 <211> 17  
 <212> Белок  
 35 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 40 <400> 23  
 Cys Gly Ser Tyr Asp Arg Pro Glu Thr Asn Ser Asp Tyr Val Gly Met  
 1 5 10 15  
 Phe  
 <210> 24  
 45 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>



<221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 <400> 24  
 5 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala  
 1 5  
 <210> 25  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 10 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 15 <400> 25  
 Ile Gly Asn Asp Gly Ser Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 26  
 <211> 26  
 20 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 25 <400> 26  
 Cys Ala Ser Asp Ile Arg Ser Arg Asn Asp Cys Ser Tyr Phe Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Ser Ser Gly Phe Ile Asp Val Trp  
 30 20 25  
 <210> 27  
 <211> 4  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 35 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 <400> 27  
 40 Ser Ser Tyr Ser  
 1  
 <210> 28  
 <211> 3  
 <212> Белок  
 45 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический

пептид"  
 <400> 28  
 Glu Ser Asn  
 1  
 5 <210> 29  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 10 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 29  
 Cys Gly Asn Ala Asp Ser Ser Ser Gly Ile Phe  
 15 1 5 10  
 <210> 30  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 20 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 30  
 25 Gly Phe Asp Phe Ser Asp His Gly  
 1 5  
 <210> 31  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 30 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 35 <400> 31  
 Ile Asp Thr Thr Gly Arg Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 32  
 <211> 21  
 40 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 45 пептид"  
 <400> 32  
 Cys Ala Lys Thr Thr Cys Val Gly Gly Tyr Leu Cys Asn Thr Val Gly  
 1 5 10 15

Ser Ile Asp Ala Trp  
 20  
 <210> 33  
 <211> 5  
 5 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 10 пептид"  
 <400> 33  
 Gly Ser Ser Ser Tyr  
 1 5  
 <210> 34  
 15 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 20 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 34  
 Asp Asp Thr  
 1  
 25 <210> 35  
 <211> 13  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 30 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 35  
 Cys Gly Gly Tyr Glu Gly Ser Ser His Ala Gly Ile Phe  
 35 1 5 10  
 <210> 36  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 40 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 36  
 45 Gly Phe Asp Phe Ser Ser Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 37  
 <211> 8

<212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 37  
 Ile Ser Ser Thr Gly Gly Ser Thr  
 1 5  
 10 <210> 38  
 <211> 18  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 15 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 38  
 Cys Val Lys Ser Ile Ser Gly Asp Ala Trp Ser Val Asp Gly Leu Asp  
 20 1 5 10 15  
 Ala Trp  
 <210> 39  
 <211> 3  
 <212> Белок  
 25 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 30 <400> 39  
 Gly Ser Ala  
 1  
 <210> 40  
 <211> 3  
 35 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 40 пептид"  
 <400> 40  
 Tyr Asn Asn  
 1  
 <210> 41  
 45 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

<221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 <400> 41  
 5 Cys Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Ala Val Gly Ile Phe  
 1 5 10  
 <210> 42  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 10 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 15 <400> 42  
 Gly Phe Asp Phe Ser Ser Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 43  
 <211> 8  
 20 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 25 <400> 43  
 Ile Ser Ser Thr Gly Gly Ser Thr  
 1 5  
 <210> 44  
 30 <211> 18  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 35 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 <400> 44  
 Cys Val Lys Ser Val Ser Gly Asp Ala Trp Ser Val Asp Gly Leu Asp  
 1 5 10 15  
 40 Ala Trp  
 <210> 45  
 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 45 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 45  
 Gly Ser Ala  
 1  
 <210> 46  
 5 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 10 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 46  
 Tyr Asn Asn  
 1  
 15 <210> 47  
 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 20 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 47  
 Cys Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Ala Val Gly Ile Phe  
 25 1 5 10  
 <210> 48  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 30 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 48  
 35 Gly Phe Asp Phe Ser Ser Tyr Gly  
 1 5  
 <210> 49  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 40 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 45 <400> 49  
 Ile Ser Gly Ser Gly Ile Thr Thr  
 1 5  
 <210> 50

<211> 21  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 5 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 50  
 Cys Thr Arg Ser Pro Ser Ile Thr Asp Gly Trp Thr Tyr Gly Gly Ala  
 10 1 5 10 15  
 Trp Ile Asp Ala Trp  
 20  
 <210> 51  
 <211> 3  
 15 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 20 пептид"  
 <400> 51  
 Asp Gly Ser  
 1  
 <210> 52  
 25 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 30 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 52  
 Asp Asn Asp  
 1  
 35 <210> 53  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 40 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 53  
 Cys Gly Asn Ala Asp Leu Ser Gly Gly Ile Phe  
 45 1 5 10  
 <210> 54  
 <211> 8  
 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 5 пептид"  
 <400> 54  
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe Asn  
 1 5  
 <210> 55  
 10 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 15 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 55  
 Ile Ser Ser Asp Gly Ser Phe Thr  
 1 5  
 20 <210> 56  
 <211> 22  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 25 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 56  
 Cys Ala Lys Ser Asp Cys Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Tyr Ser Cys Ile  
 30 1 5 10 15  
 Gly Ile Ile Asp Ala Trp  
 20  
 <210> 57  
 <211> 8  
 35 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 40 пептид"  
 <400> 57  
 Ile Ser Asp Asp Gly Ser Tyr Tyr  
 1 5  
 <210> 58  
 45 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>



<221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 <400> 58  
 5 Ile Asn Asp  
 1  
 <210> 59  
 <211> 13  
 <212> Белок  
 10 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 15 <400> 59  
 Cys Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Ala Gly Val Gly Ile Phe  
 1 5 10  
 <210> 60  
 <211> 8  
 20 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 25 <400> 60  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asn  
 1 5  
 <210> 61  
 30 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 35 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 <400> 61  
 Ile Ser Gly Ser Asn Thr Gly Ser Arg Thr  
 1 5 10  
 40 <210> 62  
 <211> 24  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 45 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"  
 <400> 62

Cys Ala Lys Ser Ile Tyr Gly Gly Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser Cys  
 1 5 10 15  
 Gly Val Gly Leu Ile Asp Ala Trp  
 20

5 <210> 63  
 <211> 4  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 10 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 63  
 Ser Ser Asp Tyr  
 15 1  
 <210> 64  
 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 20 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 <400> 64  
 25 Tyr Asn Asn  
 1  
 <210> 65  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 30 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 пептид"  
 35 <400> 65  
 Cys Gly Asn Ala Asp Ser Ser Val Gly Val Phe  
 1 5 10  
 <210> 66  
 <211> 104  
 40 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полипептид"  
 45 <400> 66  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

RU 2 750 675 C1

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Gly Ser Ser Tyr Ser Tyr Gly Trp  
20 25 30  
Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Glu Ser  
35 40 45  
5 Asn Asn Arg Pro Ser Asp Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser  
50 55 60  
Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu  
65 70 75 80  
Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Asn Ala Asp Ser Ser Ser Gly Ile Phe Gly  
10 85 90 95  
Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100  
<210> 67  
<211> 330  
15 <212> Белок  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
20 полипептид"  
<400> 67  
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15  
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
25 20 25 30  
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45  
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60  
30 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80  
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95  
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
35 100 105 110  
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125  
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140  
40 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160  
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175  
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
45 180 185 190  
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205  
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

# RU 2750675 C1

210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 5 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 10 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 15 325 330  
 <210> 68  
 <211> 106  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 20 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полипептид"  
 <400> 68  
 25 Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
 20 25 30  
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro  
 30 35 40 45  
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 50 55 60  
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 65 70 75 80  
 35 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 85 90 95  
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105  
 <210> 69  
 40 <211> 379  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 45 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полинуклеотид"  
 <400> 69  
 ggcgcgccga ggtgcagctg ctggaatctg gaggaggact ggtccagcca ggtggatccc 60

	tgcgactgag ctgcgccgct tctggattca cctttacaag atacgacatg gtgtgggtcc	120
	gccaggcacc aggaaaggga ctggagtggg tggctggtat cggcgatagt aacaagatga	180
	cccgtacgc acctgccgtc aaaggaggag caacaattag tcgggacaac tcaaagaata	240
	ctctgtatct gcagatgaat tccctgcgag ctgaggatac agcagtgtac tattgtgccca	300
5	aaggtagctg catcgccctgt tgggacgaag ctggccgtat tgatgcatgg ggacagggga	360
	ctctgggtgac cgtctcagag	379
	<210> 70	
	<211> 351	
	<212> ДНК	
10	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
15	<400> 70	
	gctagcctct tacgagctga ctcaggaccc tgcagtgagt gtcgccctgg gccagacagt	60
	gagaatcact tgctccggcg gagggagcta cgatgggtcc agctactatg gctggtatca	120
	gcagaagcca ggacaggcac ctgtgaccgt catctataac aataacaata ggccatctga	180
	cattccccgat cggttcagtg gatctagttc agggaacaca gcttctctga ccattacagg	240
20	agcccaggct gaggacgaag cagattacta ttgtgggtca tacgacaggc cagaaacaaa	300
	ttccgattat gtgggaatgt ttggtagcgg cactaaagtc accgtcctag g	351
	<210> 71	
	<211> 400	
	<212> ДНК	
25	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
30	<400> 71	
	ggcgcgcccga ggtgcagctg ctggaaagcg gaggaggact ggtccagcca ggtggatctc	60
	tgcgactgag ttgcgccgct tcaggcttca cattttctga ctacgccatg aactgggtga	120
	ggcaggctcc tggcaaggga ctggagtggg tcgcaggaat cgggaacgat ggaagttaca	180
	ctaattatgg agcagccgtg aaggggagag ctactatttc ccgcgacaac agcaaaaata	240
35	ccctgtacct gcagatgaac tcaactgagag ctgaagatac cgcagtgtac tattgtgcct	300
	ctgacatcag gagtcggaat gattgctcct atttcctggg aggggtgtcc agcggcttta	360
	ttgacgtgtg gggtcagggc accctggtca cagtctcagag	400
	<210> 72	
	<211> 321	
40	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
45	<400> 72	
	gctagcctct tacgagctga cccaggaccc agcagtgtcc gtcgccctgg gccagacagt	60
	gagaatcact tgctccggcg gatccagcta cagctatggg tggttccagc agaagcccgg	120

	tcaggccccct gtgaccgtca tctatgaaag taacaatagg ccatcagaca ttccccgatcg	180
	gtttttctggc tctagtctcag gaaacacagc tagtctgacc atcacagggg cccagggtga	240
	ggacgaagct gattactatt gtggcaatgc agattccagc tctggaattt tcgggtccgg	300
	tactaaagtc accgtcctag g	321
5	<210> 73	
	<211> 385	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
10	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 73	
	ggcgcgccga ggtgcagctg ctggaatccg gaggaggact ggtccagcca ggtggatccc	60
15	tgcgactgag ctgcgccgct tctggattcg acttttagcga tcacgggatg cagtgggtga	120
	gacaggcacc aggcaaggga ctggagtacg tgggtgtcat cgacaccaca ggccgctata	180
	catactatgc acctgccgtc aagggcaggg ctaccattag tcgggacaac tcaaaaaata	240
	caactgtacct gcagatgaac tctctgaggg ctgaagatac tgcaagtgtac tattgcgcca	300
	aaactacctg cgtgggaggg tacctgtgca ataccgtcgg aagtatcgat gcttggggac	360
20	aggggacact ggtgactgtc tcgag	385
	<210> 74	
	<211> 330	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
25	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 74	
30	gctagcctcc tacgagctga ctcaggaccc agcagtgagc gtcgccctgg gccagacagt	60
	gagaatcact tgctctggcg gaggggtccag ctcttactat ggttggtacc agcagaagcc	120
	cggccaggct cctgtgaccg tcatctatga cgatacaaac aggccaagtg gaattcccga	180
	tcggttctca ggtagttcat ccggcaatac agcttctctg accatcacag gggcccaggc	240
	tgaggacgaa gcagattact attgtggtgg ctatgaagga agctctcacg ccgggatttt	300
35	tggaagtggg actaaagtca ccgtcctag	330
	<210> 75	
	<211> 376	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
40	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 75	
45	ggcgcgccga ggtgcagctg ctggaaagtg gaggaggact ggtccagcca ggtggaagcc	60
	tgagactgtc ttgcgccgct agtggcttcg acttttccag ctacaccatg cagtgggtga	120
	ggcaggcacc aggcaaggga ctggagtggg tgggcgtcat ctctagtact ggagggtcta	180
	ccggatacgg gcctgctgtg aagggaaggg caacaatttc acgggataac tcaaaaaata	240

	ctctgtatct gcagatgaac agcctgaggg cagaagacac agccgtgtac tattgcgtga	300
	aatcaatctc cggagatgcc tggctctgtgg acgggctgga tgcttgggggt cagggcaccc	360
	tggtcacagt ctcgag	376
	<210> 76	
5	<211> 321	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
10	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 76	
	gctagcctca tacgagctga cccaggaccc agcagtgtcc gtcgccctgg gacagacagt	60
	gagaatcaact tgctccggag gaggatccgc ctacggttgg tatcagcaga agcccggcca	120
15	ggcacctgtg accgtcatct actataacaa tcagaggcca tctggcattc ccgaccggtt	180
	cagtggatcc agctctggga acacagcaag tctgaccatc acaggcgccc aggctgagga	240
	cgaagccgat tactattgtg gaagctatga tagttcagct gtggggattt ttggttctgg	300
	сactaaagtc accgtcctag g	321
	<210> 77	
20	<211> 376	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
25	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 77	
	ggcgcgccga ggtgcagctg ctggaaaagtg gaggaggact ggtccagcca ggtggaagcc	60
	tgagactgtc ttgcgcccgt agtggcttcg acttttccag ctacaccatg cagtgggtga	120
30	ggcaggcacc aggcaaggga ctggagtggg tgggcgtcat ctctagtact ggaggggtcta	180
	ccggatacgg gcctgctgtg aagggaaggg caacaatttc acgggataac tccaaaaata	240
	ctctgtatct gcagatgaac agcctgaggg cagaagacac agccgtgtac tattgcgtga	300
	aatcagctctc cggagatgcc tggctctgtgg acgggctgga tgcttgggggt cagggcaccc	360
	tggtcacagt ctcgag	376
35	<210> 78	
	<211> 321	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
40	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 78	
	gctagcctca tacgagctga cccaggaccc agcagtgtcc gtcgccctgg gccagacagt	60
45	gagaatcaact tgctccggag gaggatccgc ctacggttgg tatcagcaga agcccggcca	120
	ggcacctgtg accgtcatct actataacaa tcagaggcca tctgacattc ccgatcgggtt	180
	cagtggatcc agctctggga acacagcaag tctgaccatc acaggcgccc aggctgagga	240
	cgaagccgat tactattgtg gaagctatga tagttcagct gtggggattt ttggttctgg	300

састaaagtc accgtcctag g  
 <210> 79  
 <211> 385  
 <212> ДНК  
 5 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полинуклеотид"  
 10 <400> 79  
 ggcgcgcсga ggtgcagctg ctggaatccg gaggaggact ggtccagcca ggtggaagcc 60  
 tgcgactgtc ttgcgccgct agtggattcg acttttccag ctacggaatg cagtgggtga 120  
 ggcaggcacc aggcaaggga ctggagtggg tgggcgtcat ctctggaagt gggattacca 180  
 cactgtacgc acctgccgtc aagggaaggg ctactatctc acgggacaac tctaaaaata 240  
 15 cagtgtatct gcagatgaac tccctgagag ctgaagatac cgcagtctac tattgtacac 300  
 gctcaccctc catcacagac ggctggactt atggaggggc ctggattgat gcttggggtc 360  
 agggcactct ggtgaccgtc tcgag 385  
 <210> 80  
 <211> 318  
 20 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полинуклеотид"  
 25 <400> 80  
 gctagccagc tacgagctga cccaggaccc agcagtgtcc gtcgccctgg gccagacagt 60  
 gagaatcact tgcagtggcg gagatgggtc atacggttgg ttccagcaga agcccggaca 120  
 ggcccctgtg accgtcatct atgacaacga taataggcca tctgacattc ccgatcggtt 180  
 30 tagtggtcc agctctgga acacagcttc tctgaccatc acaggggccc aggctgagga 240  
 cgaagctgat tactattgtg gcaatgcaga cctgtccggg ggtattttcg gcagcggaac 300  
 taaagtcacc gtcctagg 318  
 <210> 81  
 <211> 388  
 35 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полинуклеотид"  
 40 <400> 81  
 ggcgcgcсga ggtgcagctg ctggaatctg gaggaggact ggtccagcca ggtggatccc 60  
 tgagactgag ctgcgccgct tctggattca ccttttagtac attcaacatg gtgtgggtca 120  
 ggcaggcacc tggaaggga ctggagtacg tggctgaaat ctccagcgac ggctctttta 180  
 45 catggtatgc aactgccgtc aagggcaggg ccaccattag tcgggataac tcaaaaaata 240  
 cagtgtacct gcagatgaat tccctgaggg ctgaggacac cgcagtctac tattgcgcaa 300  
 aatccgattg ttctagttca tactatggat atagctgtat cgggatcatt gacgcttggg 360  
 gtcagggcac tctggtgacc gtctcgag 388



<210> 82  
 <211> 339  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 5 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полинуклеотид"  
 <400> 82  
 10 gctagcctcc tatgagctga cccaggaccc agcagtgagc gtcgccctgg gccagacagt 60  
 gagaatcact tgctccggcg gaattagcga cgatggctct tactattacg gatgggtcca 120  
 gcagaagccc ggacaggccc ctgtgaccgt catctatatt aacgacaggc ggccaagtaa 180  
 tatccccgat aggttttcag ggtccagctc tggtaacaca gcttctctga ccattacagg 240  
 ggcccaggct gaggacgaag ctgattatta ctgtggctct tacgatagtt cagcaggggt 300  
 15 gggatatcttc ggcagtggaa ctaaagtcac cgtcctagg 339  
 <210> 83  
 <211> 400  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 20 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полинуклеотид"  
 <400> 83  
 25 ggcgcgccga ggtgcagctg ctggaaagtg gaggaggact ggtccagcca ggtggatcac 60  
 tgagactgtc ctgcgccgcc tccggcttca ccttttccag ctacaacatg ttctgggtgc 120  
 gccaggcacc aggaagggga ctggagtttg tcgctgaaat ctctggtagt aatactggaa 180  
 gccgaacctg gtacgcacct gccgtgaagg gcagggctac aatttctcgg gacaacagta 240  
 aaaatactct gtatctgcag atgaactctc tgagggctga ggatacagca gtgtactatt 300  
 30 gtgcaaaatc aatctacgga gggatattgcg ccggtggcta ttcctgtggg gtgggcctga 360  
 ttgacgcatg gggacagggg accctgggtca cagtctcag 400  
 <210> 84  
 <211> 321  
 <212> ДНК  
 35 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полинуклеотид"  
 40 <400> 84  
 gctagcctca tacgagctga cccaggaccc agcagtgtcc gtcgccctgg gccagacagt 60  
 gagaatcact tgcagtggcg gatccagcga ttactatggg tggttccagc agaagcccgg 120  
 tcaggcccct gtgaccgtca tctactataa caacaagagg ccatctgaca ttcccgatcg 180  
 gtttagtggc tctagttcag gaaacacagc ctccctgacc attacagggg cccaggctga 240  
 45 ggacgaagct gattactatt gtggcaatgc agactccagc gtgggagtct tcgggtctgg 300  
 tactaagggtg accgtcctag g 321  
 <210> 85  
 <211> 321

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полинуклеотид"  
 <400> 85  
 gctagcctct tacgagctga ctcagccacc ttccgtgtcc gtgtccccag gacagaccgc 60  
 aagaatcaca tgcagtggcg gatccagcta ctcatatggg tggttccagc agaagcctgg 120  
 10 tcaggccccc gtgacagtca tctatgagag caacaatagg ccttctgaca ttccagaacg 180  
 gtttagtggt tctagttcag gaaccacagt gactctgacc atcagcgggg tccaggccga 240  
 ggacgaagct gattactatt gtggcaacgc tgattccagc tctggaattt tcgggtccgg 300  
 taaaaagtg actgtcctag g 321  
 <210> 86  
 15 <211> 1606  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <221> источник  
 20 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полинуклеотид"  
 <400> 86  
 ctcgagtgcc tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac 60  
 ctctgggggg acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac 120  
 25 ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca 180  
 gtccctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac 240  
 ccagacctac atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaagggtg acaagagagt 300  
 tggtgagagg ccagcacagg gagggagggg gtctgctgga agccaggctc agcgtcctg 360  
 cctggacgca tcccggctat gcagtcccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc 420  
 30 tcttcacccg gaggcctctg cccgccccac tcatgctcag ggagagggtc ttctggcttt 480  
 ttccccaggc tctgggcagg cacaggctag gtgcccctaa cccaggccct gcacacaaag 540  
 gggcagggtg tgggctcaga cctgccaaga gccatatccg ggaggaccct gccctgacc 600  
 taagcccacc ccaaaggcca aactctccac tccctcagct cggacacctt ctctcctccc 660  
 agattccagt aactcccaat cttctctctg cagagcccaa atcttgtgac aaaactcaca 720  
 35 catgcccacc gtgcccagggt aagccagccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca 780  
 ggtgccctag agtagcctgc atccagggac aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc 840  
 tccatctctt cctcagcacc tgaagccgcc gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca 900  
 aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgctg ggtggtggac 960  
 gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggagggtgcat 1020  
 40 aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1080  
 ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1140  
 aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtg gaccctgggg 1200  
 gtgcgagggc cacatggaca gaggccggct cggcccaccc tctgccctga gagtgaccgc 1260  
 tgtaccaacc tctgtcccta cagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc 1320  
 45 atcccgggag gagatgacca agaaccagggt cagcctgacc tgccctggta aaggcttcta 1380  
 tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac 1440  
 cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga 1500  
 caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca 1560

## RU 2 750 675 C1

	саaccactac acgcagaaga gcctctccct gtccccgggt aaatga	1606
	<210> 87	
	<211> 1000	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
10	<400> 87	
	ctcgagtgcc tccaccaagg gcccatcgggt cttccccctg gcacctctct ccaagagcac	60
	ctctggggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac	120
	ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca	180
	gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac	240
15	ccagacctac atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaagggtg acaagagagt	300
	tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagccgc	360
	cgggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg	420
	gacctctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt	480
	caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca	540
20	gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa	600
	tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac	660
	catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacacctgc ccccatcccg	720
	ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag	780
	cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc	840
25	tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag	900
	cagggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca	960
	ctacacgcag aagagcctct ccctgtcccc gggtaaata	1000
	<210> 88	
	<211> 325	
30	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
35	<400> 88	
	cctagggtcag cccaaggcca accccactgt cactctgttc ccgccctct ctgaggagct	60
	ccaagccaac aaggccacac tagtgtgtct gatcagtgac ttctaccgg gagctgtgac	120
	agtggcctgg aaggcagatg gcagccccgt caaggcggga gtggagacca ccaaaccctc	180
40	сааасагагс аасаасаагт асгсггссгс агсгтасгтг агсгтгасгс ссгсгсгтг	240
	гаагтсссас агааггтаса гсггссгггт сасгсатгаа гсгсгсгсгг тггсгсгсгс	300
	агтггсгсгсгт асгсгсгсгсгт сатаа	325
	<210> 89	
	<211> 288	
45	<212> Белок	
	<213> Macaca fascicularis	
	<400> 89	
	Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln	

## RU 2 750 675 C1

5	1	Leu	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu	Glu	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp
		20					25					30					
	Asn	Ala	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Glu	Gly	Asp	
		35					40					45					
	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Ala	Ser	Glu	Ser	Phe	Val	
10		50					55					60					
	Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala	
	65		70					75					80				
	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg	
		85					90					95					
15	Val	Thr	Arg	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg	
		100					105					110					
	Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	
		115					120					125					
	Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val	
20		130					135					140					
	Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	
	145		150					155					160				
	Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Ala	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly	
		165					170					175					
25	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys	
		180					185					190					
	Ser	Arg	Ala	Ala	Gln	Gly	Thr	Ile	Glu	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	
		195					200					205					
	Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Tyr	Gly	
30		210					215					220					
	Glu	Leu	Asp	Phe	Gln	Trp	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Ala	Pro	
	225		230					235					240				
	Cys	Val	Pro	Glu	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	Ser	Gly	
		245					250					255					
35	Leu	Gly	Thr	Ser	Ser	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Pro	Arg	
		260					265					270					
	Ser	Pro	Arg	Pro	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Gly	His	Cys	Ser	Trp	Pro	Leu	
		275					280					285					
		<210> 90															
40		<211> 304															
		<212> Белок															
		<213> Gallus gallus															
		<400> 90															
	Met	Gly	Lys	Glu	Ala	Pro	Ser	Gly	Thr	Gly	His	Arg	His	Arg	Ala	Gln	
45	1		5					10					15				
	Gln	Gly	Thr	Arg	Arg	Pro	Ala	Met	Ala	Leu	Gly	Thr	Ser	Arg	Thr	Met	
		20					25					30					
	Trp	Asp	Ser	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	Val	Val	Leu	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	
		35					40					45					
	Cys	Cys	Asn	Pro	Pro	Leu	Ala	Gly	Cys	His	Gln	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	
		50					55					60					

RU 2750675 C1

	Ala	Thr	Leu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Ser	Ser	Ala	Thr	Phe	Ile	Cys	Asn
	65					70					75					80
	Ile	Ser	Met	Glu	Asn	Ser	Ser	Leu	Glu	Phe	Asn	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln
					85					90					95	
5	Lys	Thr	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Gln	Lys	Ile	Ala	Gly	Ile	Ile	Arg	Asn
					100					105					110	
	Ile	Pro	Gln	Lys	Lys	Met	Glu	Lys	Tyr	Arg	Leu	Phe	Asn	Asn	Thr	Pro
					115					120					125	
	Val	Phe	Lys	Met	Glu	Ile	Leu	Asn	Leu	His	Gln	Asn	Asp	Ser	Gly	Phe
10																
		130														140
	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Leu	Ile	Thr	Phe	Ser	Arg	Ser	Asp	Lys	Val	Val	Glu
	145					150					155					160
	Ser	Ser	His	Ser	Gln	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Ala	Pro	Glu	Lys	Thr	Asn
					165					170						175
15	Thr	Ile	Asp	Glu	Pro	Ser	Glu	Glu	Glu	Ser	Ser	Pro	Pro	Asp	His	Ile
					180					185					190	
	Lys	Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Val	Ile	Val	Leu
					195					200					205	
	Leu	Leu	Phe	Gly	Tyr	Ile	Ile	Ile	Asn	Asn	Arg	Arg	Ala	Asp	Val	Gln
20																
		210														220
	Lys	Pro	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Leu	Ala	Glu	Val	Lys	Pro	Pro	Val	Val
					225					230					235	240
	Pro	Val	Pro	Thr	Val	Asp	Tyr	Gly	Val	Leu	Glu	Phe	Gln	Arg	Asp	Pro
					245					250					255	
25	His	Ser	Gln	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Cys	Pro	Ala	Glu	Gln	Thr	Glu	Tyr
					260					265					270	
	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	Glu	Glu	Lys	Pro	Ile	Thr	Pro	Glu	Arg	Gly
					275					280					285	
	Lys	Arg	His	Lys	Asp	Glu	Arg	Thr	Trp	Gln	Leu	Pro	Ser	Gln	Pro	Cys
30																
		290								295					300	
	<210>	91														
	<211>	288														
	<212>	Белок														
	<213>	Mus musculus														
35	<400>	91														
	Met	Trp	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Trp	Ser	Phe	Thr	Trp	Ala	Val	Leu	Gln
	1				5					10					15	
	Leu	Ser	Trp	Gln	Ser	Gly	Trp	Leu	Leu	Glu	Val	Pro	Asn	Gly	Pro	Trp
					20					25					30	
40	Arg	Ser	Leu	Thr	Phe	Tyr	Pro	Ala	Trp	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	Gly	Ala
					35					40					45	
	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Leu	Ser	Asn	Trp	Ser	Glu	Asp	Leu	Met
					50					55					60	
	Leu	Asn	Trp	Asn	Arg	Leu	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Glu	Lys	Gln	Ala
45																
	65					70				75					80	
	Ala	Phe	Cys	Asn	Gly	Leu	Ser	Gln	Pro	Val	Gln	Asp	Ala	Arg	Phe	Gln
					85					90					95	
	Ile	Ile	Gln	Leu	Pro	Asn	Arg	His	Asp	Phe	His	Met	Asn	Ile	Leu	Asp

RU 2750675 C1

		100		105		110										
	Thr	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu
			115					120					125			
	His	Pro	Lys	Ala	Lys	Ile	Glu	Glu	Ser	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Val
5			130				135					140				
	Thr	Glu	Arg	Ile	Leu	Glu	Thr	Ser	Thr	Arg	Tyr	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro
	145					150					155					160
	Lys	Pro	Glu	Gly	Arg	Phe	Gln	Gly	Met	Val	Ile	Gly	Ile	Met	Ser	Ala
					165					170						175
10	Leu	Val	Gly	Ile	Pro	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Trp	Ala	Leu	Ala	Val
				180					185				190			
	Phe	Cys	Ser	Thr	Ser	Met	Ser	Glu	Ala	Arg	Gly	Ala	Gly	Ser	Lys	Asp
			195					200				205				
	Asp	Thr	Leu	Lys	Glu	Glu	Pro	Ser	Ala	Ala	Pro	Val	Pro	Ser	Val	Ala
15		210					215				220					
	Tyr	Glu	Glu	Leu	Asp	Phe	Gln	Gly	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Leu	Pro
	225					230				235						240
	Thr	Ala	Cys	Val	His	Thr	Glu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Thr	Glu	Gly
				245					250						255	
20	Leu	Gly	Ala	Ser	Ala	Met	Gly	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Leu	Gln
				260					265				270			
	Gly	Pro	Arg	Pro	Pro	Arg	His	Glu	Asp	Gly	His	Cys	Ser	Trp	Pro	Leu
		275					280				285					
	<210>	92														
25	<211>	288														
	<212>	Белок														
	<213>	Rattus norvegicus														
	<400>	92														
	Met	Trp	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Trp	Ser	Phe	Thr	Trp	Ala	Val	Leu	Gln
30	1			5					10					15		
	Leu	Ser	Trp	Gln	Ser	Gly	Trp	Leu	Leu	Glu	Val	Pro	Asn	Gly	Pro	Trp
			20					25					30			
	Arg	Ser	Leu	Thr	Phe	Tyr	Pro	Ala	Trp	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	Gly	Ala
		35					40					45				
35	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Leu	Ser	Asn	Trp	Ser	Glu	Asp	Leu	Met
	50					55				60						
	Leu	Asn	Trp	Asn	Arg	Leu	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Glu	Lys	Gln	Ala
	65				70				75							80
	Ala	Phe	Cys	Asn	Gly	Leu	Ser	Gln	Pro	Val	Gln	Asp	Ala	Arg	Phe	Gln
40				85				90					95			
	Ile	Ile	Gln	Leu	Pro	Asn	Arg	His	Asp	Phe	His	Met	Asn	Ile	Leu	Asp
			100					105					110			
	Thr	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu
		115					120					125				
45	His	Pro	Lys	Ala	Lys	Ile	Glu	Glu	Ser	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Val
		130				135				140						
	Thr	Glu	Arg	Ile	Leu	Glu	Thr	Ser	Thr	Arg	Tyr	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro
	145				150					155						160

	Lys	Pro	Glu	Gly	Arg	Phe	Gln	Gly	Met	Val	Ile	Gly	Ile	Met	Ser	Ala	
							165				170				175		
	Leu	Val	Gly	Ile	Pro	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Trp	Ala	Leu	Ala	Val	
							180				185				190		
5	Phe	Cys	Ser	Thr	Ser	Met	Ser	Glu	Ala	Arg	Gly	Ala	Gly	Ser	Lys	Asp	
							195				200				205		
	Asp	Thr	Leu	Lys	Glu	Glu	Pro	Ser	Ala	Ala	Pro	Val	Pro	Ser	Val	Ala	
							210				215				220		
	Tyr	Glu	Glu	Leu	Asp	Phe	Gln	Gly	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Leu	Pro	
10							225				230				235		
	Thr	Ala	Cys	Val	His	Thr	Glu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Thr	Glu	Gly	
							245				250				255		
	Leu	Gly	Ala	Ser	Ala	Met	Gly	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Leu	Gln	
							260				265				270		
15	Gly	Pro	Arg	Pro	Pro	Arg	His	Glu	Asp	Gly	His	Cys	Ser	Trp	Pro	Leu	
							275				280				285		

## (57) Формула изобретения

1. Антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий  
фрагмент, где указанное антитело содержит аминокислотные последовательности H-  
CDR1-3 и L-CDR1-3:

- a) SEQ ID NO:18, 19, 20, 21, 22 и 23, соответственно;
- b) SEQ ID NO:24, 25, 26, 27, 28 и 29, соответственно;
- c) SEQ ID NO:30, 31, 32, 33, 34 и 35, соответственно;
- d) SEQ ID NO:36, 37, 38, 39, 40 и 41, соответственно;
- e) SEQ ID NO:42, 43, 44, 45, 46 и 47, соответственно;
- f) SEQ ID NO:48, 49, 50, 51, 52 и 53, соответственно;
- g) SEQ ID NO:54, 55, 56, 57, 58 и 59, соответственно; или
- h) SEQ ID NO:60, 61, 62, 63, 64 и 65, соответственно.

2. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по п.1, где антитело выбрано  
из группы, состоящей из:

- a) антитела, V<sub>H</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;
- b) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные  
последовательности SEQ ID NO:2 и 67;
- c) антитела, V<sub>L</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3;
- d) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности  
SEQ ID NO:3 и 68;
- e) антитела, H-CDR 1-3 и L-CDR 1-3 которого содержат аминокислотные  
последовательности SEQ ID NO:18-23, соответственно;
- f) антитела, V<sub>H</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и V<sub>L</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и
- g) антитела, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2 и 67, и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:3 и 68.

3. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по п.1, где антитело выбрано  
из группы, состоящей из:

а) антитела,  $V_H$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

б) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 и 67;

5      с) антитела,  $V_L$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или 66;

д) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:5 или 66 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68;

10     е) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:24-29, соответственно;

ф) антитела,  $V_H$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и  $V_L$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или 66; и

15     г) антитела, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 и 67, и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:5 или 66, и SEQ ID NO:68.

4. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по п.1, где антитело выбрано из группы, состоящей из:

20     а) антитела,  $V_H$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6;

б) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:6 и 67;

25     с) антитела,  $V_L$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7;

д) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 и 68;

е) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:30-35, соответственно;

30     ф) антитела,  $V_H$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и  $V_L$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; и

35     г) антитела, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:6 и 67, и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 и 68.

5. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по п.1, где антитело выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела,  $V_H$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8;

40     б) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:8 и 67;

с) антитела,  $V_L$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9;

45     д) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:9 и 68;

е) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:36-41, соответственно;

ф) антитела,  $V_H$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID



NO:8, и V<sub>L</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9; и

г) антитела, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:8 и 67, и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:9 и 68.

5 6. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по п.1, где антитело выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела, V<sub>H</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10;

10 б) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 и 67;

с) антитела, V<sub>L</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11;

15 д) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:11 и 68;

е) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:42-47, соответственно;

ф) антитела, V<sub>H</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и V<sub>L</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11;

20 и

г) антитела, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 и 67, и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:11 и 68.

25 7. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по п.1, где антитело выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела, V<sub>H</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12;

б) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12 и 67;

30 с) антитела, V<sub>L</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13;

д) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 и 68;

35 е) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:48-53, соответственно;

ф) антитела, V<sub>H</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, и V<sub>L</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13;

и

40 г) антитела, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12 и 67, и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 и 68.

8. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по п.1, где антитело выбрано из группы, состоящей из:

45 а) антитела, V<sub>H</sub> которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14;

б) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:14 и 67;

с) антитела,  $V_L$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15;

d) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:15 и 68;

5 е) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:54-59, соответственно;

f) антитела,  $V_H$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и  $V_L$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15;

10 и

g) антитела, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:14 и 67, и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:15 и 68.

9. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по п.1, где антитело выбрано из группы, состоящей из:

15 а) антитела,  $V_H$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16;

b) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 и 67;

20 с) антитела,  $V_L$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17;

d) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:17 и 68;

25 е) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:60-65, соответственно;

f) антитела,  $V_H$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, и  $V_L$  которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17;

и

30 g) антитела, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 и 67, и LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:17 и 68.

10. Антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент,

35 где указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи со следующими аминокислотными последовательностями:

a) SEQ ID NO:2 и 3, соответственно;

b) SEQ ID NO:4 и 5, соответственно;

c) SEQ ID NO:4 и 66, соответственно;

40 d) SEQ ID NO:6 и 7, соответственно;

e) SEQ ID NO:8 и 9, соответственно;

f) SEQ ID NO:10 и 11, соответственно;

g) SEQ ID NO:12 и 13, соответственно;

h) SEQ ID NO:14 и 15, соответственно; или

45 i) SEQ ID NO:16 и 17, соответственно.

11. Антитело, которое специфически связывается с PD-1, где указанное антитело содержит:

a) тяжелую цепь (HC), включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2 и 67, и легкую цепь (LC), включающую аминокислотные последовательности SEQ

ID NO:3 и 68;

б) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:5 и 68;

в) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:4 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:66 и 68;

г) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:6 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 и 68;

д) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:8 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:9 и 68;

е) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:10 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:11 и 68;

ж) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 и 68;

з) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:14 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:15 и 68; или

и) НС, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:16 и 67, и LC, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:17 и 68.

12. Антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело содержит H-CDR1-3 и L-CDR1-3, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO:18-20 и SEQ ID NO:21-23, соответственно.

13. Антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело содержит  $V_H$ , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и  $V_L$ , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

14. Антитело, которое специфически связывается с PD-1, где указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2 и 67, и легкую цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO:3 и 68.

15. Антитело по любому из пп.1-10, 12 и 13, где антитело является IgG.

16. Антитело по п.15, где антитело является IgG<sub>1</sub>.

17. Антитело по п.15 или 16, где антитело содержит по меньшей мере одну мутацию в F<sub>C</sub>-области.

18. Антитело по п.17, где:

а) антитело представляет собой IgG<sub>1</sub>, и один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 мутированы в Ala, или

б) антитело представляет собой IgG<sub>4</sub>, и аминокислотный остаток в положении 228 мутирован в Pro,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с нумерацией IMGT.

19. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-18, где антитело или фрагмент обладают по меньшей мере одним из следующих свойств:

а) связываются с PD-1 человека с  $K_D$  750 пМ или меньше;

б) связываются с PD-1 яванского макака с  $K_D$  7 нМ или меньше;

в) связываются с PD-1 мыши с  $K_D$  1 нМ или меньше;

г) не связываются с PD-1 крысы;

д) повышают секрецию IL-2 в анализе цельной крови с SEB;

f) повышают секрецию IFN- $\gamma$  в анализе реакции однонаправленной смешанной культуры лимфоцитов;

g) ингибируют взаимодействие PD-1 с PD-L1 по меньшей мере на 60% при концентрации 10 мкг/мл в проточно-цитометрическом конкурентном анализе;

5 h) блокируют связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1 по меньшей мере на 90% в концентрации 10 мкг/мл при определении с помощью анализа методом биослойной интерферометрии; и

i) ингибируют рост опухоли *in vivo*.

10 20. Фармацевтическая композиция для усиления иммунитета у пациента, содержащая эффективное количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-19 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, дополнительно содержащая химиотерапевтическое средство, противоопухолевое средство, антиангиогенное средство, ингибитор тирозинкиназы или ингибитор пути PD-1.

15 22. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты для получения антитела или антигенсвязывающей части, которое специфически связывается с PD-1, где выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-19.

20 23. Вектор экспрессии, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.22, где указанный вектор дополнительно содержит последовательность регуляции экспрессии.

24. Клетка-хозяин для получения антитела, или его антигенсвязывающей части, которое связывается с PD-1, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-19.

25. Способ получения антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PD-1, предусматривающий наличие клетки-хозяина по п.24, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение полученного в результате антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

26. Способ повышения иммунитета у пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-19 или фармацевтической композиции по п.20 или 21.

35 27. Способ лечения рака у пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-19 или фармацевтической композиции по п.20 или 21.

28. Способ по п.27, где рак возникает в ткани, выбранной из группы, состоящей из кожи, легкого, кишечника, яичника, головного мозга, предстательной железы, почки, мягких тканей, гемопоэтической системы, головы и шеи, печени, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, матки и поджелудочной железы.

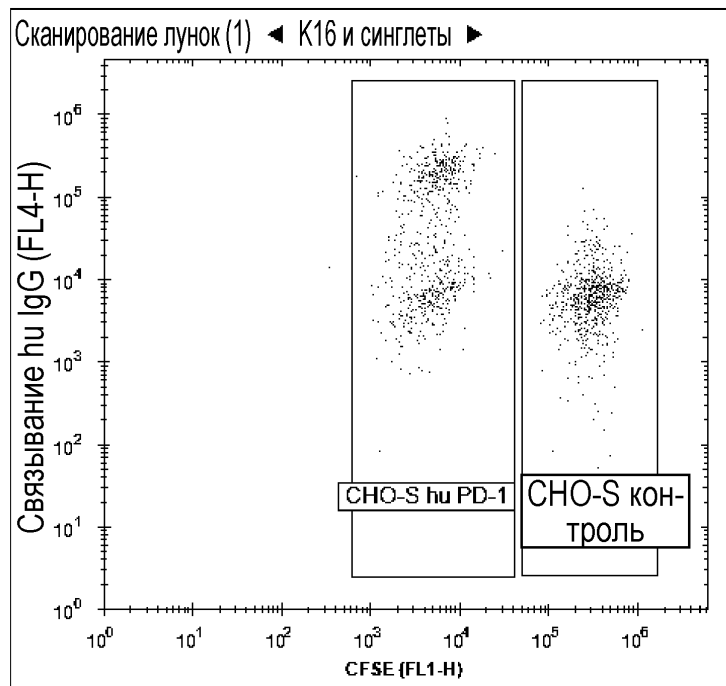
29. Способ по п.27, где рак выбран из группы, состоящей из прогрессирующей или метастатической меланомы, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака головы и шеи, почечно-клеточной карциномы или лимфомы Ходжкина.

45 30. Способ по любому из пп.26-29, дополнительно включающий введение пациенту химиотерапевтического средства, противоопухолевого средства, антиангиогенного средства, ингибитора тирозинкиназы или ингибитора пути PD-1.

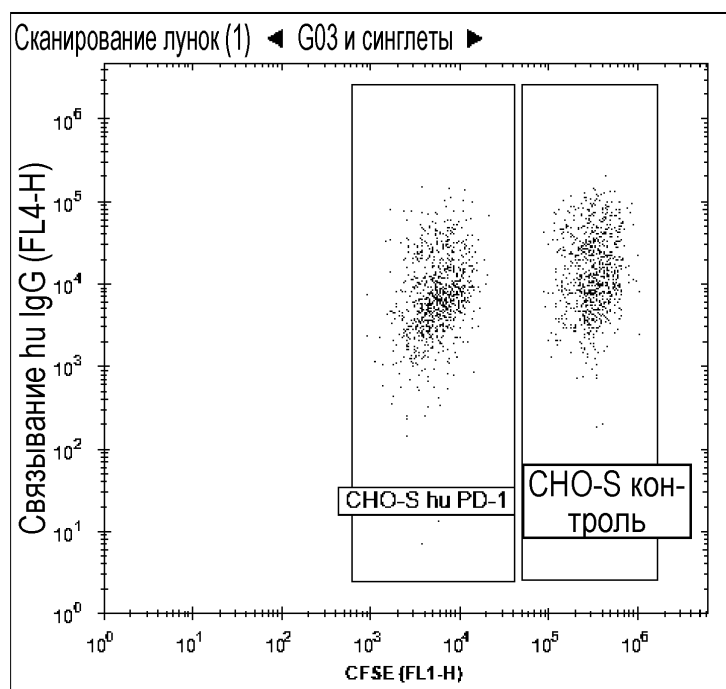
[illegible]

2

2/20

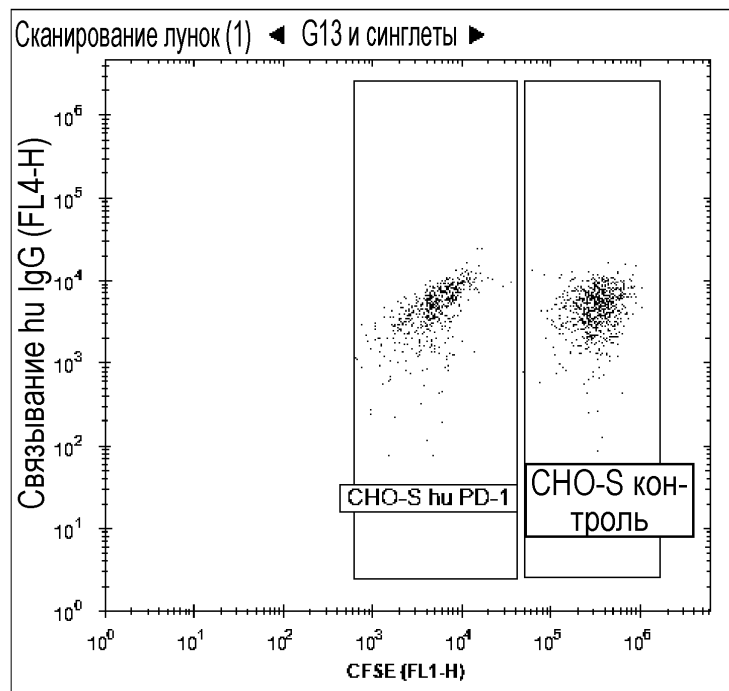


ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

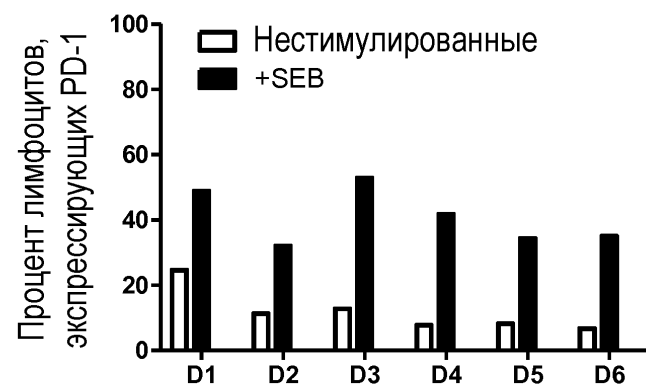
3/20



ФИГ. 3С

4/20

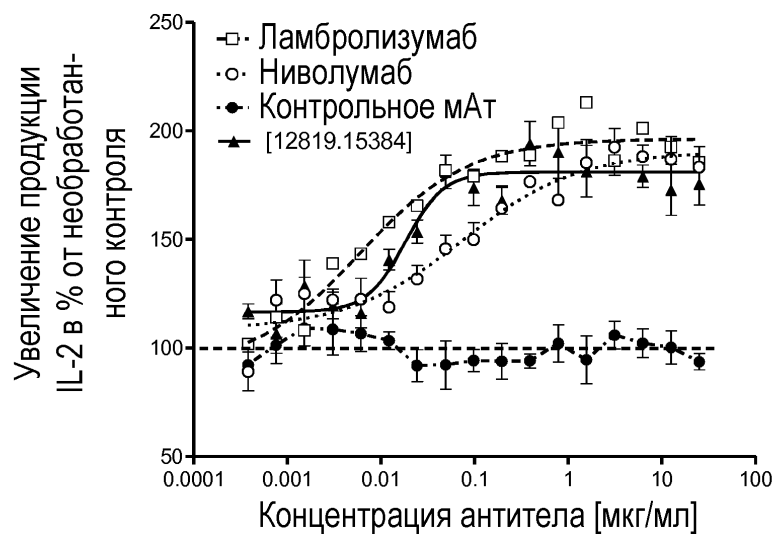
ФИГ. 4



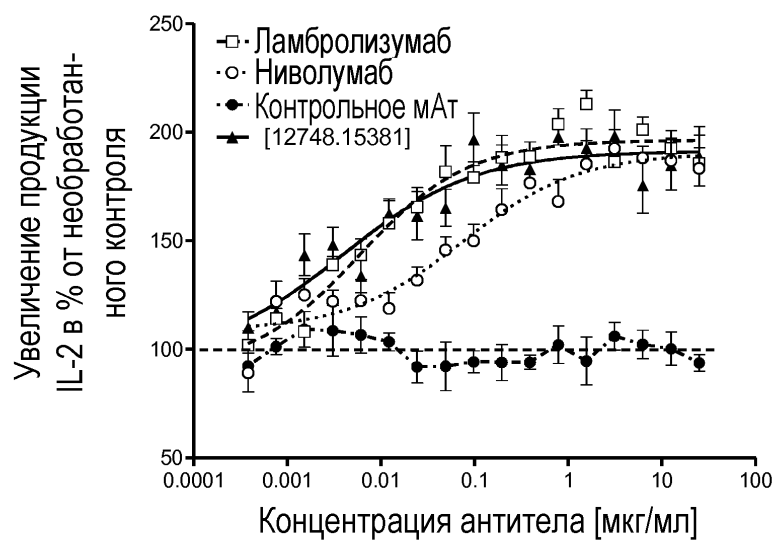


5/20

ФИГ. 5А

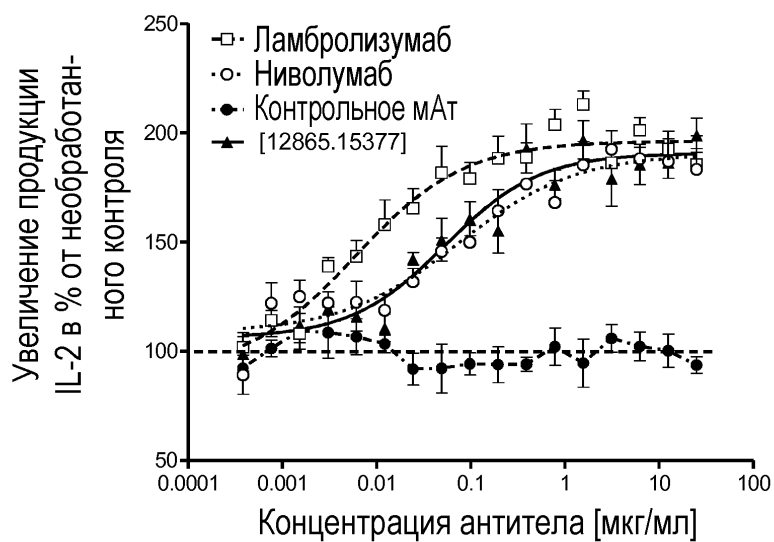


ФИГ. 5В

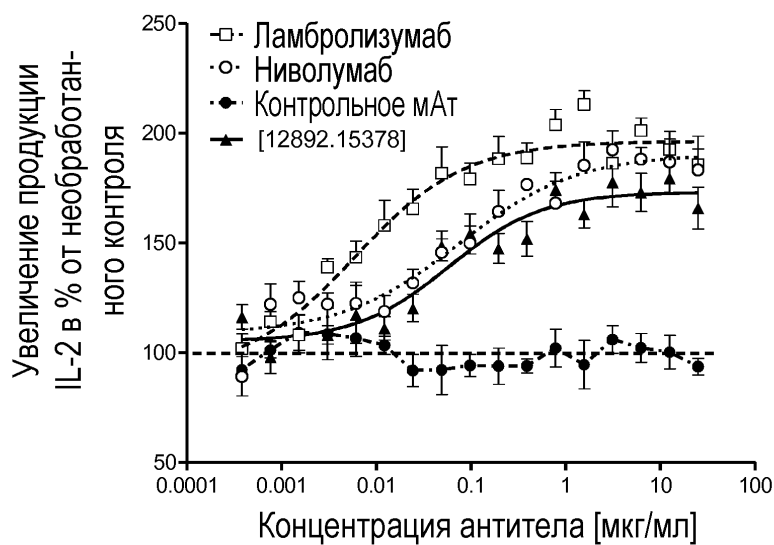


6/20

ФИГ. 5С

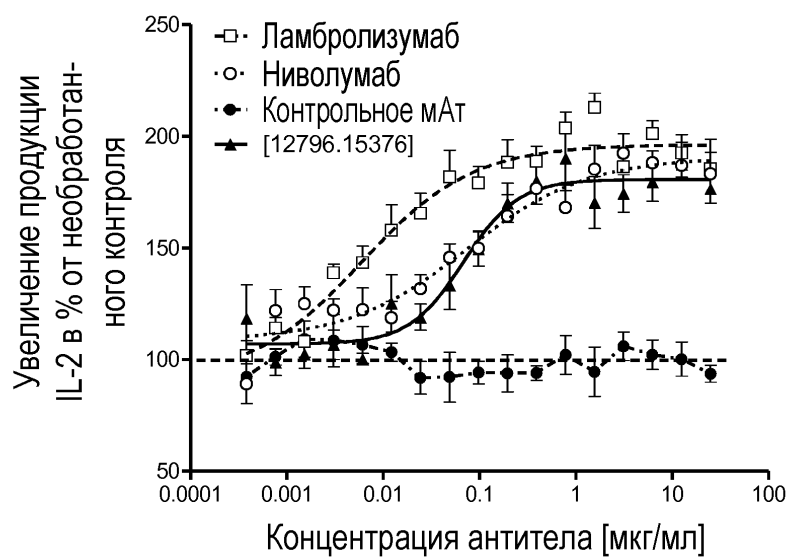


ФИГ. 5D

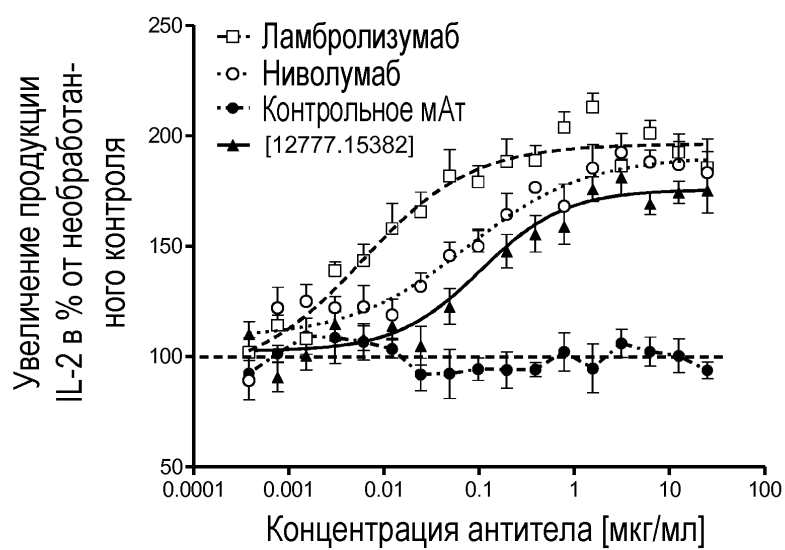


7/20

ФИГ. 5Е

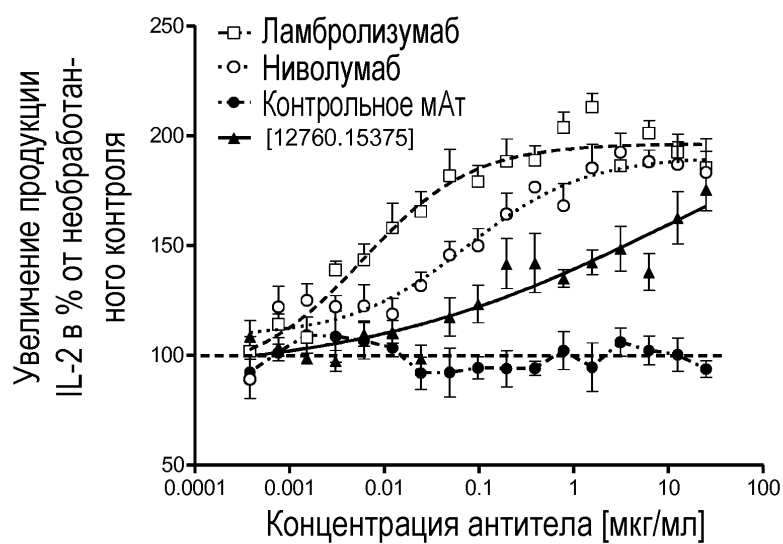


ФИГ. 5F

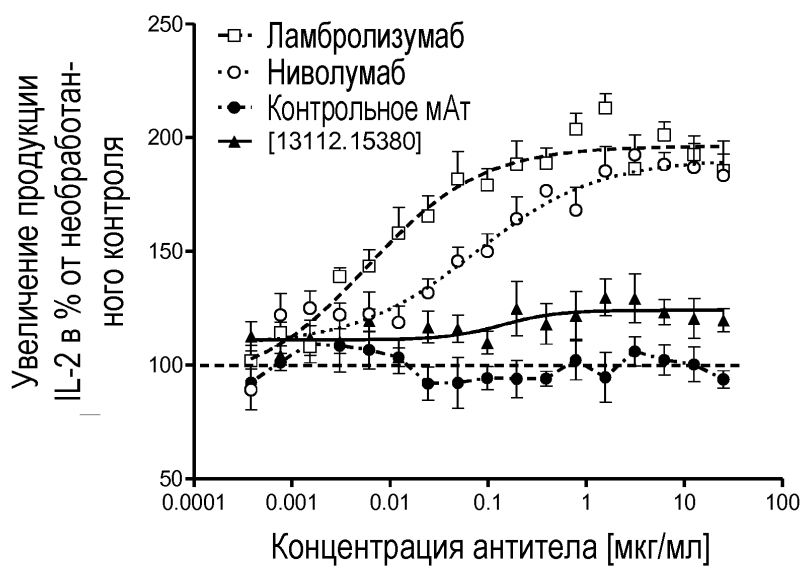


8/20

ФИГ. 5G

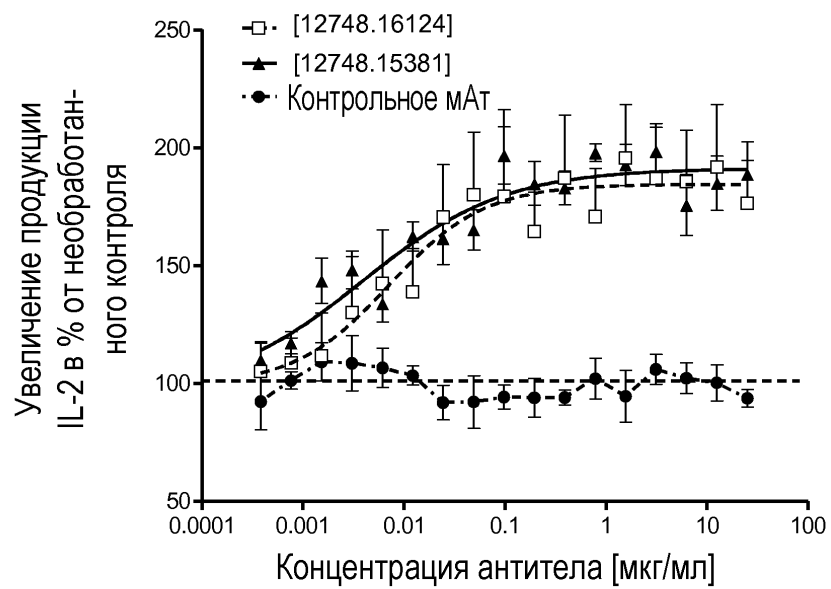


ФИГ. 5H



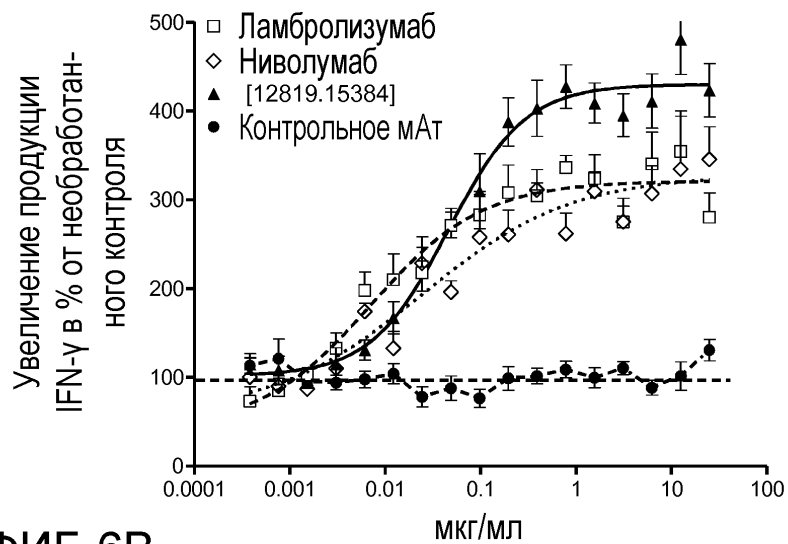
9/20

ФИГ. 5I

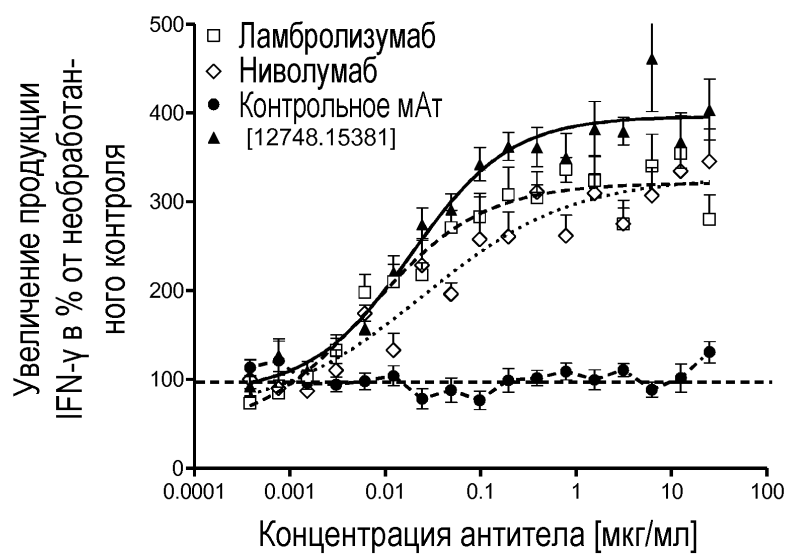


10/20

ФИГ. 6А

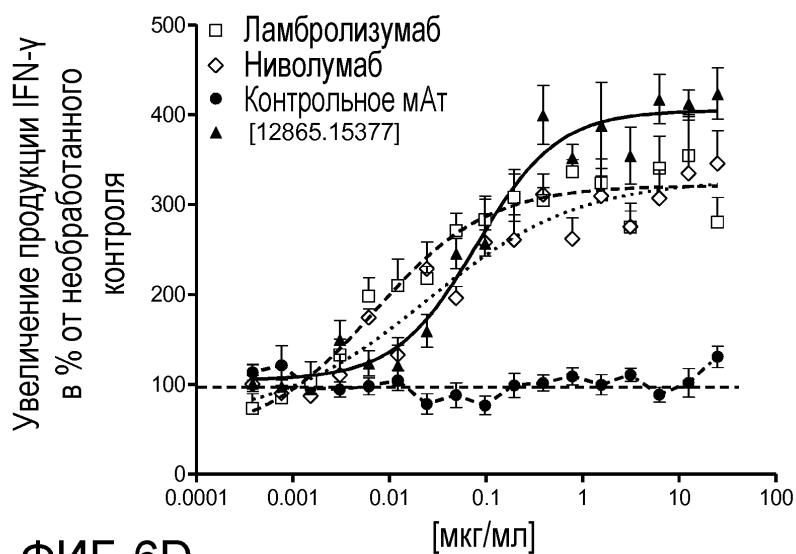


ФИГ. 6В

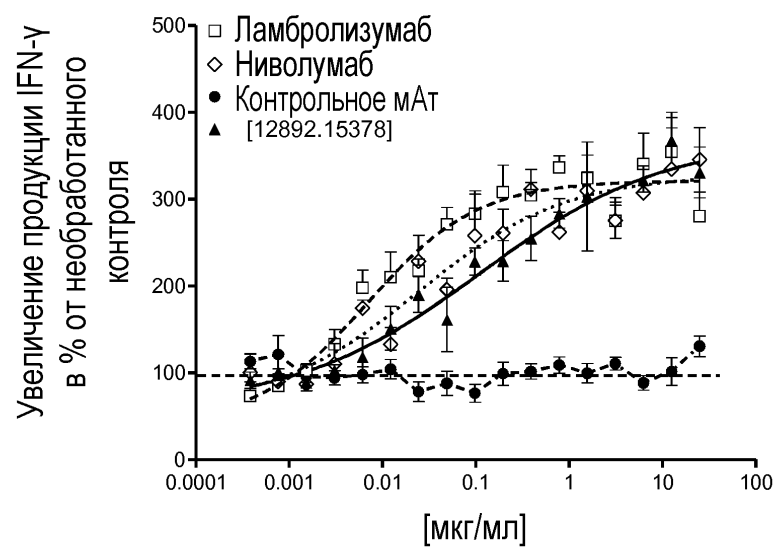


11/20

ФИГ. 6С

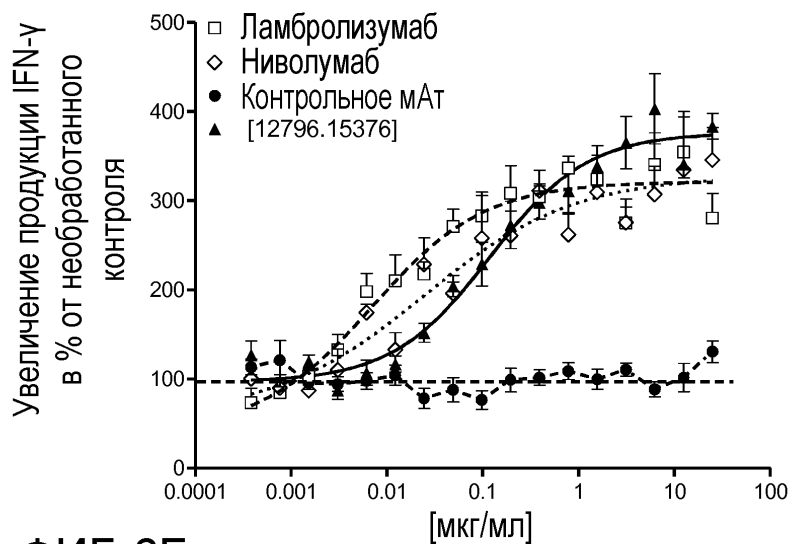


ФИГ. 6D

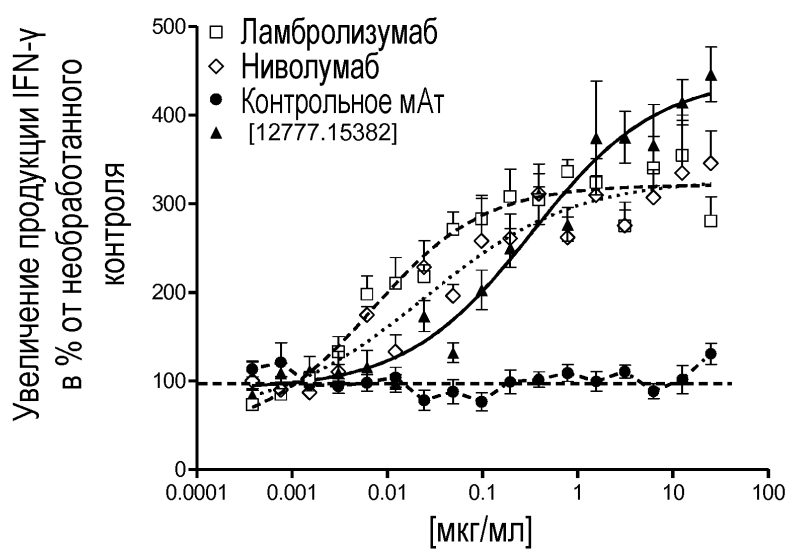


12/20

ФИГ. 6Е



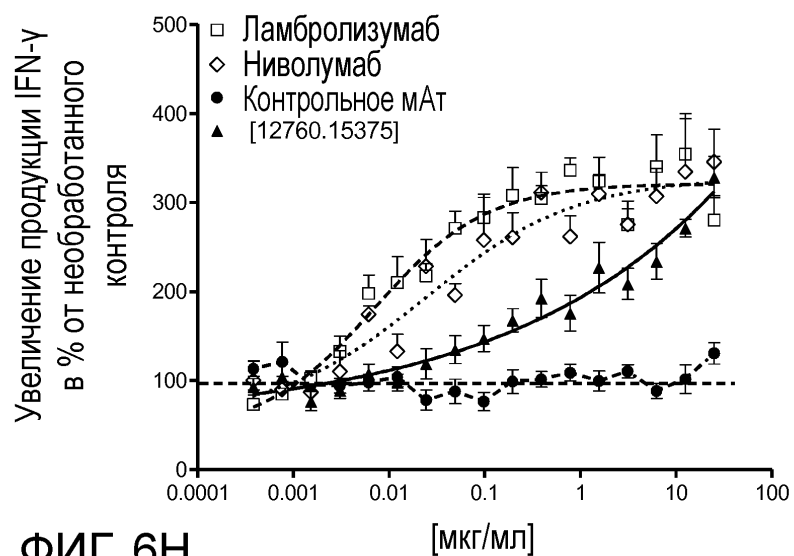
ФИГ. 6F



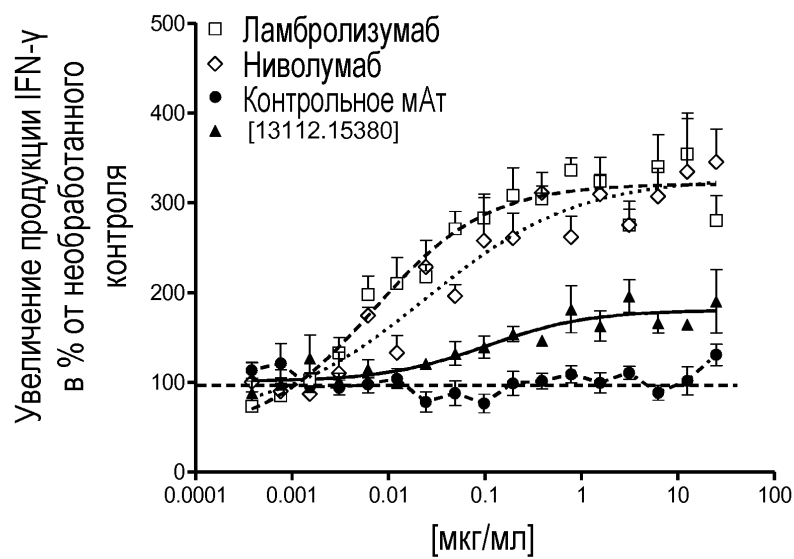


13/20

ФИГ. 6G

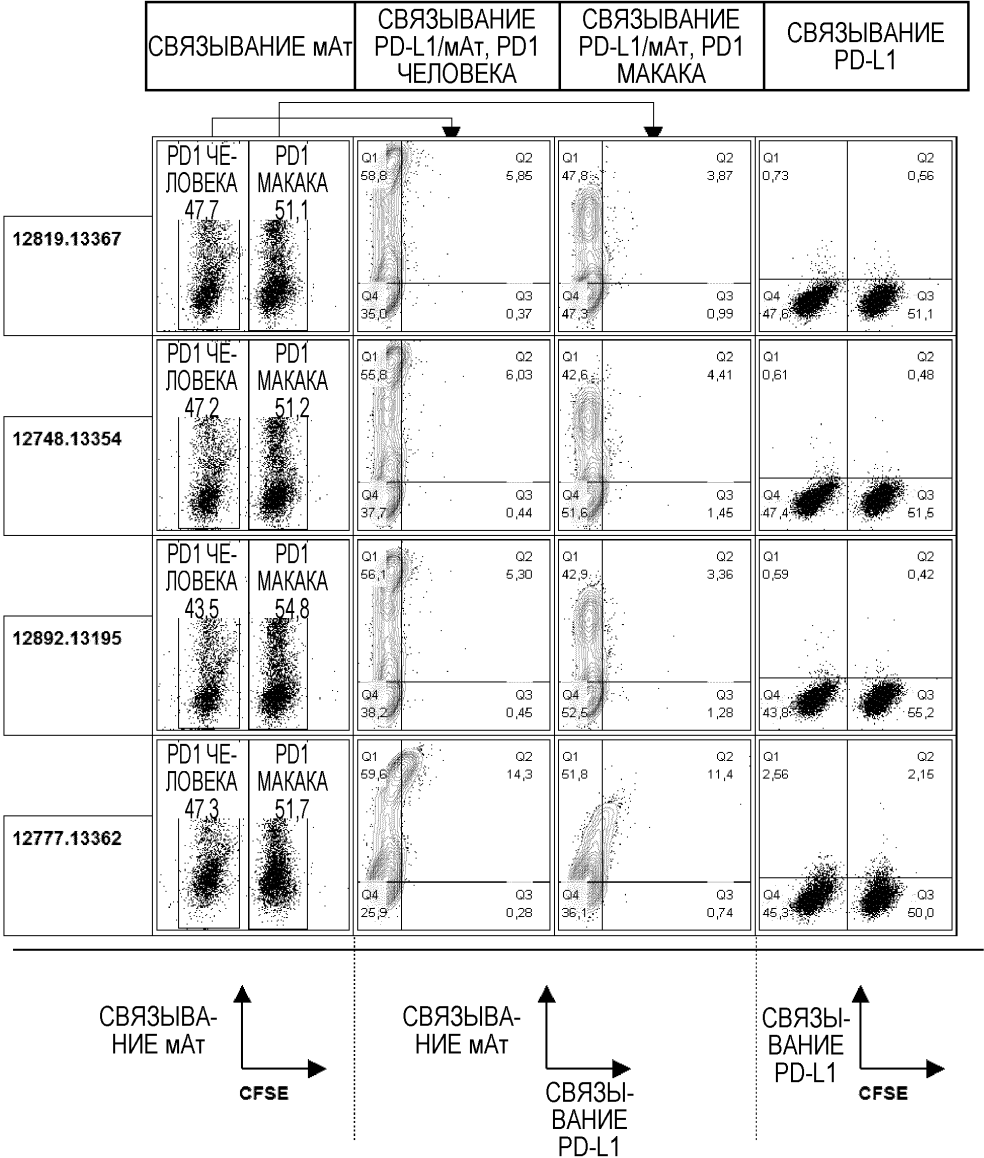


ФИГ. 6H

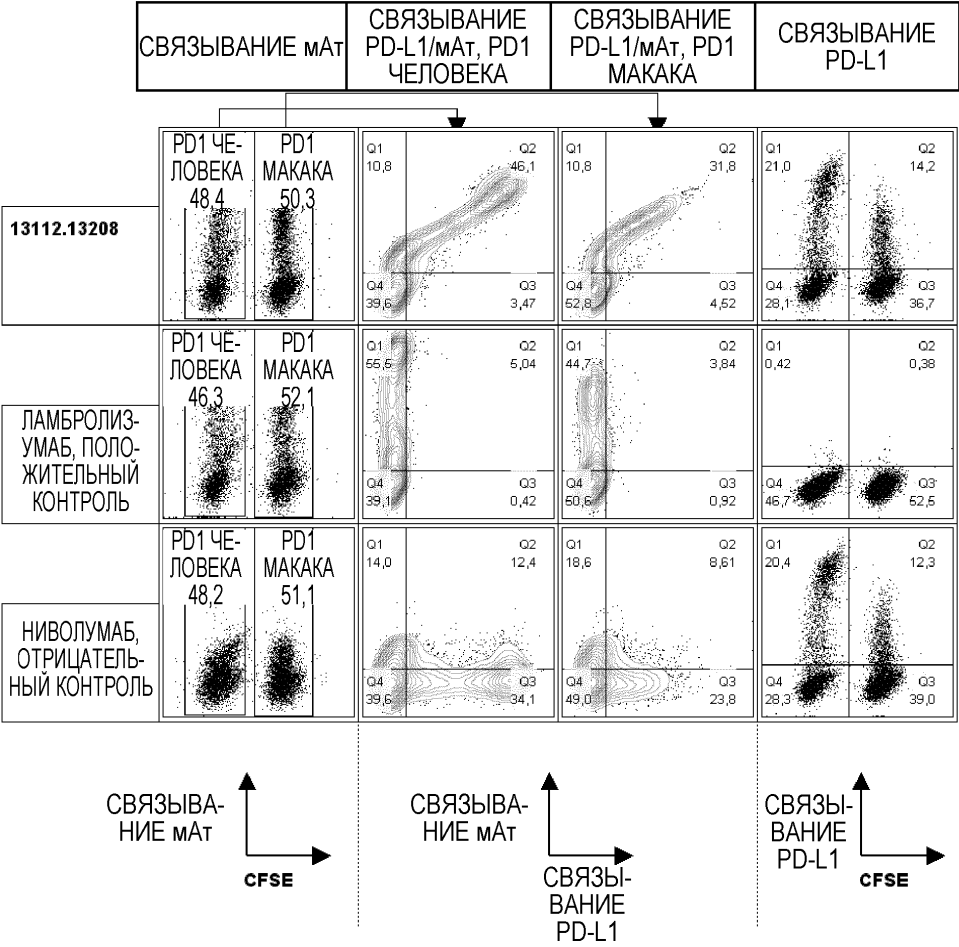


14/20

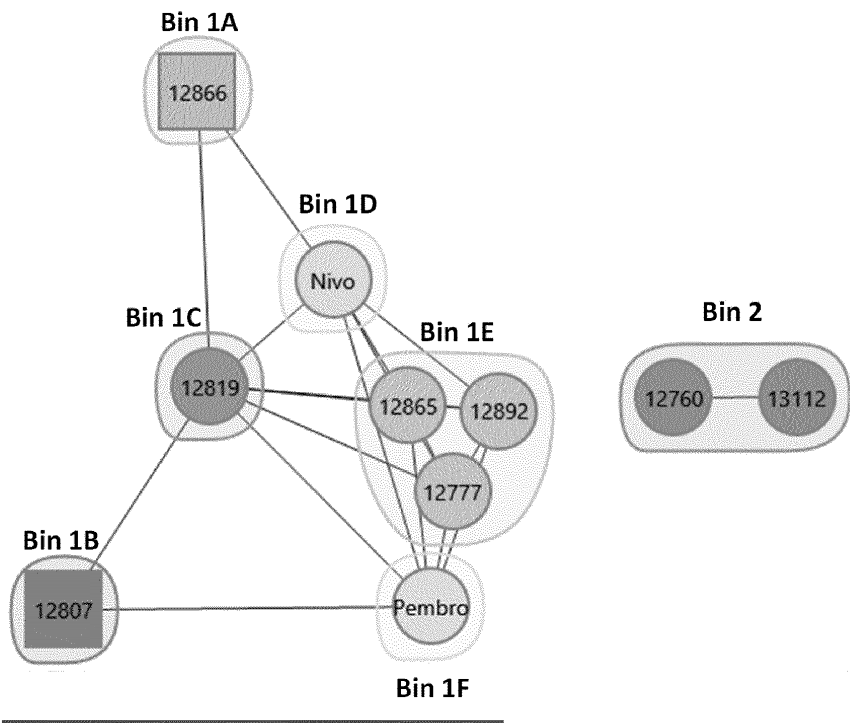
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

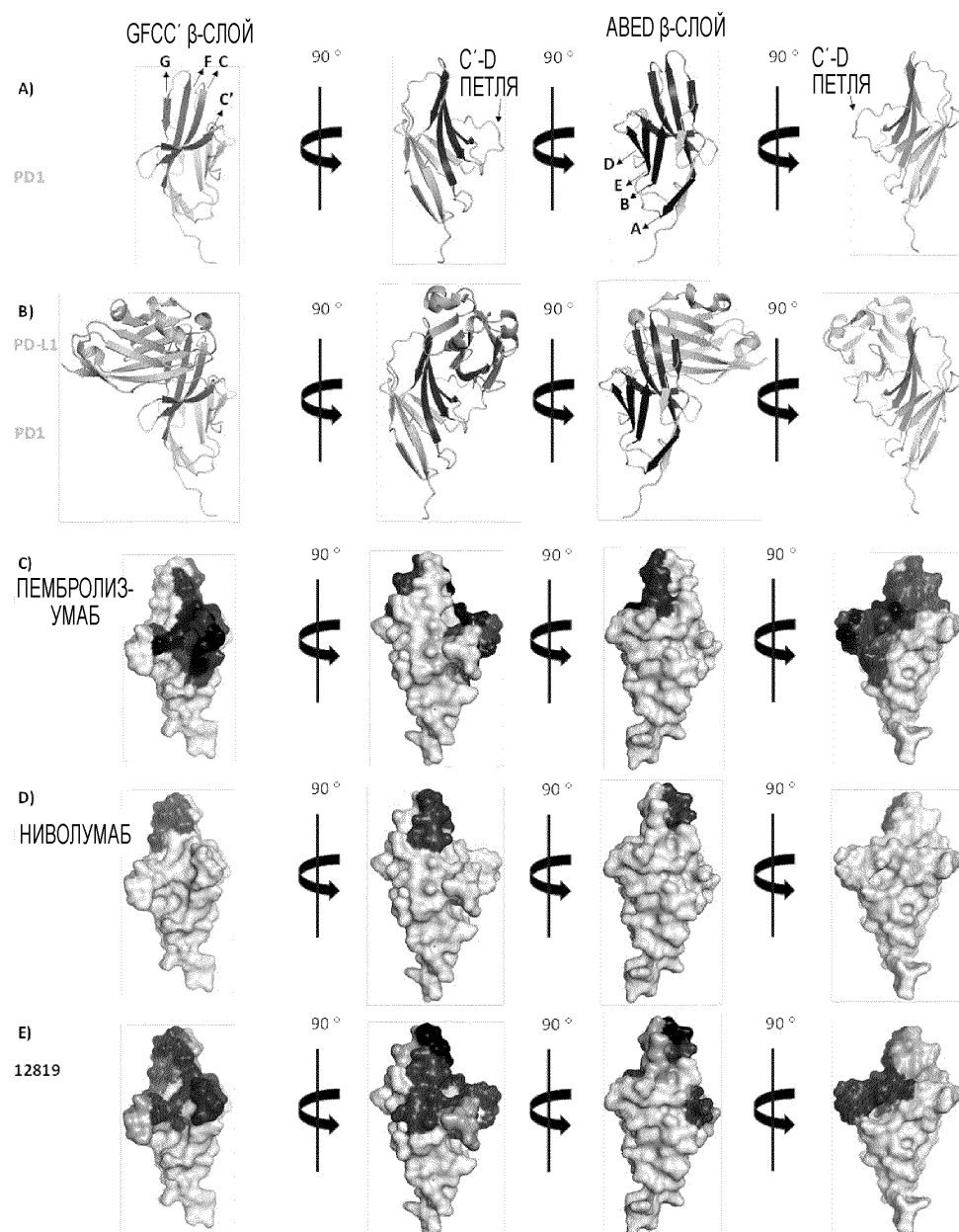


ФИГ. 8



17/20

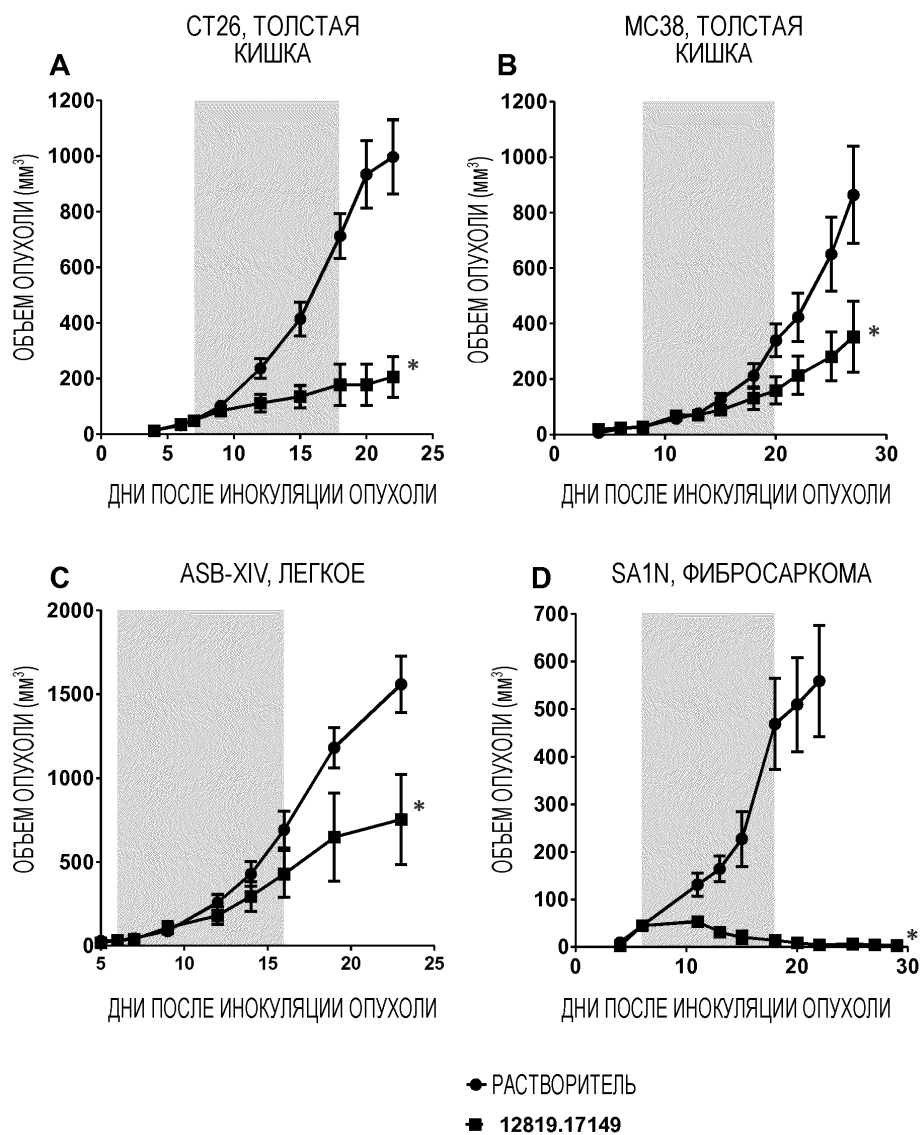
ФИГ. 9





19/20

ФИГ. 10



20/20

ФИГ. 11

Котрансплантат A375 (меланома человека) с  
CD4+/CD8+ Т-клетками

