

RU 2750675 C1



(19)

RU

(11)

2 750 675

(13) C1

(51) МПК
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

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 Микель (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.

RU 2750675 C1

(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, содержащему 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.

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU (11)

2 750 675⁽¹³⁾ C1

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(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.

5 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.

10 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 15 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, трансмембральную область и внутриклеточный хвост, содержащий два участка фосфорилирования. Известный как белок иммунной контрольной точки, PD-1 20 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 25 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 30 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.

35 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 40 заболеваний, возникающих 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. По сравнению с доступными в настоящее время методами лечения таких онкологических заболеваний, включающими лечение антителами, 45 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 вариабельный 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 25 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 вариабельный 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 45 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 аминокислотную последовательность константной области легкой цепи SEQ ID NO: 68.

³⁰ [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;
- 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.

⁴⁰ [0026] В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть согласно изобретению включают вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный 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, 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).

- ⁴⁵ [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:

- a) связываются с человеческим PD-1 с K_D 750 пМ или меньше;
- b) связываются с PD-1 яванского макака с K_D 7 нМ или меньше;
- c) связываются с мышиным PD-1 с K_D 1 нМ или меньше;
- d) не связываются с крысиным PD-1;
- e) повышают секрецию IL-2 в анализе цельной крови с SEB;
- f) повышают секрецию IFN- γ в анализе реакции односторонней 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;
- h) 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
- i) ингибируют рост опухоли *in vivo*.

Примеры такого антитела включают, без ограничения, антитело 12819 (обладающее свойствами a-i); антитела 12748, 12892 и 12777 (обладающие, по меньшей мере, свойствами a, b и e-h); антитела 12865 и 12796 (обладающие, по меньшей мере, свойствами a, b, e, f и h) и антитела 12760 и 13112 (обладающие, по меньшей мере, свойствами a, b, e и f). 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 a, b и e-h. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть обладают, по меньшей мере, свойствами a, b, e, f и h. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 или антигенсвязывающая часть обладают, по меньшей мере, свойствами a, b, e и f.

[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 5 антител, как ожидают, будет обладать одинаковыми или по существу одинаковыми биологическими свойствами.

[0035] В некоторых вариантах осуществления антитела против PD-1 или антигенсвязывающая часть согласно изобретению не конкурируют за связывание PD-1 с пембролизумабом или ниволумабом. В некоторых вариантах осуществления антитела 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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, 35 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 40 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 45 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, гемопоэтический 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 способа дополнительно включает введение химиотерапевтического средства, противоопухолевого средства, антиangiогенного 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 *Ascl* и *NheI* показаны между 5'-концами V_H и V_L . Точка начала репликации плазмида обозначена как pUC ori, и ген, придающий устойчивость к ампциллину, 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 *Ascl* 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 (A) клона антитела, которое специфично связывается с клетками, трансфицированными человеческим PD-1, (B) клона, который неспецифично связывается с клетками CHO-S, и (C) 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 B).

[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 односторонней 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). А) Трехмерное изображение внеклеточного домена (ECD) человеческого PD-1 (остатки 33-150). Показано положение GFCC' и ABED β-слоя и C'-D петли. В) Трехмерное изображение комплекса человеческого PD-1: человеческого PD-L1 под теми же углами наблюдения, как в (А). С) Молекулярная модель эпитопа пембролизумаба, показанного как карта плотности, на которой более темные зоны обозначают области, опосредующие более сильное связывание. Черные области представляют участки, обнаруженные с помощью аланинового сканирования. Д) Молекулярная модель эпитопа ниволумаба, представленная, как в (С). Е) Молекулярная модель эпитопа антитела 12819, представленная, как в (С). F) Молекулярная модель эпитопа антитела 12865, представленная, как в (С). G) Молекулярная модель эпитопов не блокирующего лиганда антитела 13112, представленная, как в (С).

[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. А) CT26 (рак толстой кишки). В) C38 (рак толстой кишки). С) ASB-XIV (рак легкого).

25 D) Sa1N (фиброзаркома). Серое поле обозначает период лечения. Данные представлены как средние±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 полукуманизированной 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±SEM. *P<0,001.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0056] В настоящем изобретении предложены новые антитела против человеческого

35 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.

40 [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 (C_H). Каждая легкая цепь 45 состоит из вариабельного домена легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). 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 C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

⁵ 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

¹⁰ (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.

¹⁵ [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 ²⁰ 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 ²⁵ 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 ³⁰ 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 ³⁵ 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) ⁴⁰ взаимодействия определенного антитела-антигена. Антитело, как говорят, специфично связывается с антигеном, когда K_D составляет ≤ 1 мМ, предпочтительно ≤ 100 нМ. Константа аффинности связывания K_D может быть измерена, например, с помощью ⁴⁵ поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™) или биослойной интерферометрии, например, при использовании системы ProteOn™ XPR36 SPR производства Bio-Rad или системы Octet™.

[0062] Термин "k_{off}" относится к константе скорости диссоциации взаимодействия определенного антитела-антигена. Константа скорости диссоциации k_{off} может быть измерена с помощью биослойной интерферометрии, например, при использовании 5 системы OctetTM.

[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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 способов, известных в уровне техники, включающих, без ограничения, конкурентные анализы, биниворование 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 35 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 40 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 45 близости от эпитопа, связываемого антителом против PD-1 согласно изобретению.

Данный эксперимент может быть выполнен при использовании ИФА, РИА, BIACORETM, 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 OctetTM.

⁵ [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,

¹⁰ 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 мышного антитела. Примером типичного химерного антитела является антитело, в котором последовательности вариабельных доменов ¹⁵ являются мышными, 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.

²⁰ [0066] Термин "гуманизировать" относится к тому, что в том случае, когда антитело имеет полностью или частично нечеловеческое происхождение (например, является мышним или куринным антителом, полученным при иммунизации мышей или куриц, соответственно, представляющим интерес антигеном, или является химерным антителом, основанным на таком мышном или курином антителе), можно заменить некоторые

²⁵ 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

³⁰ 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.

³⁵ 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 ⁴⁰ 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.

⁴⁵ 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

5 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.

10 [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

15 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

20 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,

25 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

30 CDR Кэбата, хотя в более поздней публикации (Magdalaine-Beuzelin et al., *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64:210-225 (2007)) было сделано предположение, что определение IMGT® (международная информационная система ImMunoGeneTics®, 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

40 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

45 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 5 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 10 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")

15 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, 20 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 25 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 области (CDR), способную к специальному связыванию с антигеном. Кроме того, хотя 30 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, 35 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, 40 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

45 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®.

20 Антитела против PD-1

[0077] В настоящем изобретении предложены антитела, направленные против PD-1, и их антигенсвязывающие части. Антитела могут быть химерными, содержать вариабельные 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) восьми 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 вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи гуманизированных антител против PD-1

45

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:

- а) антитела, H-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18-20, соответственно;
- б) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2;
- в) антитела, V_H которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;
- г) антитела, тяжелая цепь (HC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 67;
- д) антитела, L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 21-23, соответственно;
- е) антитела, вариабельный домен легкой цепи (V_L) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;
- ж) антитела, V_L которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;
- з) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 68;
- и) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18-23, соответственно;
- к) 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;
- л) антитела, V_H которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и V_L которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

1) антитела, НС 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 5 группы, состоящей из:

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

б) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID 10 NO: 4;

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

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

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

е) антитела, вариабельный домен легкой цепи (V_L) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID 20 NO: 5 или 66;

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

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

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

к) 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 30 ID NO: 5 или 66;

л) 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

м) антитела, НС 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:

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

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

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

г) антитела, тяжелая цепь (НС) 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;
- ⁵ г) антитела, V_L которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;
- х) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 68;
- ¹⁰ 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;
- ¹⁵ к) антитела, V_H которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и V_L которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и
- ²⁰ 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:

- ²⁵ 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;
- ³⁰ в) антитела, V_H которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;
- г) 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;
- ³⁵ 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;
- ⁴⁰ х) 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;
- ⁴⁵ 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;

k) антитела, V_H которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и V_L которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и
 5 l) 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:

- a) антитела, H-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 42-44, соответственно;
- 10 b) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10;
- c) антитела, V_H которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;
- 15 d) антитела, тяжелая цепь (HC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 67;
- e) антитела, L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, соответственно;
- 20 f) антитела, вариабельный домен легкой цепи (V_L) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11;
- g) антитела, V_L которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;
- 25 h) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 68;
- i) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 42-47, соответственно;
- j) 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;
- 30 k) антитела, V_H которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и V_L которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;
- и
- l) антитела, HC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 67, и LC которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 68.

40 [0086] 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: 48-50, соответственно;
- b) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12;
- c) 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, вариабельный домен легкой цепи (V_L) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;
- ¹⁰ g) антитела, V_L которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;
- 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;
- ²⁰ 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;
 - b) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;
 - ³⁰ c) антитела, V_H которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
 - 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;
 - f) антитела, вариабельный домен легкой цепи (V_L) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15;
 - ⁴⁰ g) антитела, V_L которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
 - 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;
 - ⁴⁵ 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;

⁵ к) антитела, V_H которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и V_L которого включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

¹⁰ и
I) антитела, НС 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:

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

¹⁵ b) антитела, вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16;

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

²⁰ d) антитела, тяжелая цепь (НС) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 67;

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

²⁵ f) антитела, вариабельный домен легкой цепи (V_L) которого по меньшей мере на 90% идентичен по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17;

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

³⁰ h) антитела, легкая цепь (LC) которого включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17 и 68;

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

³⁵ j) 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;

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

⁴⁰ l) антитела, НС 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

⁵ 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).

¹⁰ [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).

¹⁵ [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).

²⁰ [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.

²⁵ [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

³⁰ [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;
- ³⁵ 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;
- ⁴⁰ 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 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 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

5 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.

10 [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;

15 c) связывается с мышиным 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- γ в анализе реакции односторонней смешанной

20 культуры лимфоцитов;

g) ингибирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 по меньшей мере на 60% при концентрации 10 мкг/мл в проточном-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

30 800, 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

35 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

40 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

45 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 мышиным PD-1 (SEQ ID NO: 91) с K_D по меньшей мере 1000, по меньшей мере 950, по 5 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 10 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 15 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 25 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). 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 IgG₁ в IgG₂. Константная область к легкой цепи может быть

изменена на константную область λ 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,

5 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,

10 IgM, IgG, IgA или IgD, но, как правило, имеет изотип IgG, например, IgG субкласса IgG₁, IgG_{2a} или IgG_{2b}, IgG₃ или IgG₄. В одном варианте осуществления антитела является IgG₁. В другом варианте осуществления антитела является IgG₄.

[0116] В одном варианте осуществления антитело против PD-1 может включать по

15 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 устраниить эффекторную функцию, например, когда нежелательны взаимодействия лиганда/рецептора или в случае конъюгатов антитела-лекарственного средства.

20 [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

25 схеме нумерации IMGT®.

[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 IgG₁

антител. Дополнительно или альтернативно, аминокислотный остаток в положении 30 228 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.

35 Аминокислотные положения пронумерованы согласно схеме нумерации IMGT®.

[0119] В другом варианте осуществления, где антитело относится к субклассу IgG₄, оно может включать мутацию S228P, т.е. с присутствием пролина в положении 228, где аминокислотное положение пронумеровано согласно схеме нумерации IMGT®. Такая

40 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

45 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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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)3, 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., 30 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 35 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" (III et al., Protein Eng. 10:949-57 (1997)), "минитела" 40 (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 45 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 10 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 15 реакционноспособные группы, разделенные соответствующим спейсером (например, м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидоэфиром), или гомобифункциональными (например, дисукцинимидлсубератом). 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 "меченный" 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 avidином (например, стрептавидином, содержащим 30 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 35 полипептидов включают, без ограничения перечисленными, следующее: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, ФИТЦ, родамин, люминофоры на основе лантаноидов), ферментные метки (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные 40 группы, определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, пары последовательностей лейциновых молний, связывающие участки для вторичных антител, металло связывающие домены, эпитопные метки), магнитные вещества, такие как хелаты гадолиния, токсины, такие как токсин коклюша, таксол, цитохалазин B, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, 45 винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксанtron, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюокортикоиды, новокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, а также их аналоги или гомологи. В некоторых вариантах осуществления метки присоединены

через спайсерные 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.

20 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

10 FASTA, Gap или Bestfit, которые являются программами в пакете программ Wisconsin, версии 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, который включает, например, программы FASTA2 и FASTA3, позволяет проводить выравнивания и определять процент идентичности последовательностей для областей с наилучшим перекрыванием между запрашиваемой последовательностью и последовательностями, используемыми для поиска (см., например, публикации Pearson, Methods Enzymol. 183:

15 63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 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

20 идентичности последовательности для последовательностей нуклеиновых кислот может 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 эпизомные

40 векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления векторы (например, неэпизомные 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 сливные белки, 5 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 10 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 15 (ПЦР) или клонировании 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 20 V_H 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_L домен из антитела против PD-1 или 25 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 30 вариабельный домен тяжелой (V_H) и/или легкой (V_L) цепей, могут быть "превращены" в гены полноразмерного антитела. В одном варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие V_H или V_L домены, превращают в полноразмерные гены антитела путем вставки в вектор экспрессии, уже кодирующий константные 35 домены тяжелой цепи (CH) или константные домены легкой цепи (CL), соответственно, при этом V_H сегмент функционально связан с CH сегментом(ами) в векторе, и/или V_L сегмент функционально связан с CL сегментом в векторе. В другом варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие V_H и/или V_L домены, 40 превращают в полноразмерные гены антитела путем связывания, например лигирования, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей V_H и/или V_L домены, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CH и/или CL домен, при использовании стандартных методов молекулярной биологии. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие 45 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

5 амплификации областей ДНК, которые могут использоваться, среди прочего, для выделения дополнительных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих вариабельные 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 10 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 15 могут применяться для получения мутантных антител против PD-1. Антитела могут быть подвергнуты мутации в вариабельных 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 20 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 вариабельного домена, или в 25 константной области. В предпочтительном варианте осуществления мутации сделаны в вариабельном 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 вариабельного домена антитела или антигенсвязывающей части согласно настоящему изобретению.

[0144] В другом варианте осуществления мутации подвергают каркасную область 30 (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 полуыведения антитела против PD-1. См., например, публикацию PCT WO 00/09560. Мутация в каркасной области или в константном домене также может 35 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 вариабельного домена или в константной области.

[0145] В некоторых вариантах осуществления антитела против PD-1 согласно 40 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 45 трансляции. Векторы экспрессии включают плазмиды, ретровирусы, аденоандомиры, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики; космиды, YAC, эпизомы 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 5 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 10 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, 15 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 CL последовательность иммуноглобулина человека, 20 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 HC и LC гены в таких векторах могут содержать инtronные последовательности, которые обеспечивают повышенные общие выходы белка антитела благодаря стабилизации соответствующей мРНК. Инtronные последовательности 25 фланкированы между донорными и акцепторными сайтами сплайсинга, которые определяют, где будет происходить сплайсинг РНК. Положение инtronных последовательностей может находиться в вариабельных или константных областях цепей антитела, или в вариабельных и константных областях, в случае использования нескольких инtronов. Полиаденилирование и терминация транскрипции могут 30 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. 35 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 40 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 45 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 обезьяны 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,

5 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.

10 [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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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, 40 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 45 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 нукleinовых кислот, кодирующие антитела против PD-1, и векторы, включающие такие молекулы нукleinовых 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 полибреном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(ов) в липосомах и прямую микроинъекцию ДНК

30 в ядра. Кроме того, молекулы нукleinовых 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 иммортилизованные клеточные 40 линии, доступные в Американской коллекции типовых культур (ATCC). Они включают, среди прочих, клетки яичников китайского хомячка (CHO), клетки NS0, клетки SP2, клетки HEK-293T, клетки 293 Freestyle (Invitrogen), клетки NIH-3T3, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки африканской зеленой мартышки (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2), клетки A549 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-хозяев или, более предпочтительно, секреции антитела в среду культивирования, в которой выращивали такие клетки-

5 хозяева. Антитела могут быть выделены из среды культивирования с помощью стандартных способов очистки белка. Растительные клетки-хозяева включают, например, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, риску, 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*.

10 [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 глутаминсингтазы (система GS) является стандартным методом повышения экспрессии в некоторых условиях. Система GS полностью или частично обсуждается в патентах

15 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

20 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, 25 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 30 вариантах осуществления композиции предназначены для облегчения, профилактики и/или лечения PD-1-ассоциированного нарушения (например, нарушения, характеризуемого 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 35 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 40 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, 45 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 направленно 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, 19th 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, характеризуемый 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, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутригрудинную, 5 внутривенную, внутриартериальную, интракальную, 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.

- 10 [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 15 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.
- 20 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 25 восстановления подходящим растворителем (например, стерильной апирогенной 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 pH от 3 до 9), однако в случае некоторых применений они могут 30 быть, более предпочтительно, изготовлены в форме стерильного неводного раствора или в сухой форме, применяемой вместе с подходящим растворителем, таким как стерильная апирогенная 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 35 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 40 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 45 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

- 5 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
- 10 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
- 15 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
 - 20 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, солюбилизирующее вещество или
- 25 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 микронов). Это может быть выполнено
- 30 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
- 35 ингаляторе или инсуффляторе, содержащие порошковую смесь соединения согласно изобретению, подходящую порошковую основу и модifikator технологических показателей.

- [0171] Подходящая форма раствора для применения в распылителе, в котором электрогидродинамическое устройство используется для получения тонкодисперсного
- 40 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
- 45 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

5 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.

10 [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.

15 [0176] Лекарственные формы, подходящие для перорального введения, включают твердые, полутвердые и жидкые 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

20 трансбуккальные/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, 25 этиanol, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, метилцеллюлозу или подходящее масло, и один или более эмульгирующих веществ и/или сусpendирующих веществ. Жидкие лекарственные формы также могут быть приготовлены при восстановлении твердой формы, например, из пакетика.

Терапевтические применения антител и композиций изобретения

30 [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

35 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,

40 предстательная железа, почка, мягкие ткани, гемопоэтическая система, голова и шея, печень, мочевой 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

45 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

- 5* 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, миелодистрофический синдром, рак носоглотки, хронический
- 10* 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, фиброзаркому, рак почки, рак молочной
- 15* железы, рак поджелудочной железы, рак эндометрия, базально-клеточный рак кожи, рак аппендицса, 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

- 25* 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
- 30* 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
- 35* средства может привести к уменьшению опухоли, увеличению выживаемости, устраниению 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
- 40* 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
- 45* "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:

[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

- 30 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,
35 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

- 40 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-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат, гексаметилен-бис-ацетамид, трансформирующий фактор роста бета, масляную кислоту, 45 циклический АМФ и веснаринон. В некоторых вариантах осуществления соединение 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 5 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 10 антибиотиков, например, доксорубицина (адриамицина), даунорубицина, эпирубицина, идарубицина, митоксандрона, дактиномицина, блеомицина, актиномицина, лутеомицина и/или митомицина; ингибиторов топоизомеразы, таких как топотекан; и/или антиметаболитов, например, фторурацила и/или других фторпиrimидинов.

[0187] Антитело против PD-1 или его антигенсвязывающая часть, или композиция

15 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 20 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 25 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 -

30 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, 35 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 40 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 45 (например, антителом против CTLA-4, таким как тремелимумаб или ипилимумаб). 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,

15 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 инфузии, 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 иммуногистологию. Изобретение 5 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 10 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,

15 культурирования 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 20 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 25 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,

30 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 общезвестных знаний в уровне техники.

[0203] Для лучшего понимания настоящего изобретения представлены следующие примеры. Эти примеры предназначены исключительно для иллюстрации и не должны 35 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

(ACK) выполняли с помощью технологии поиска антител SymplexTM. Коротко, ACK 40 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 ACK флуоресцентно-меченными антителами позволяло дифференцировать ACK от других клеток (например, Т-клеток, наивных В-клеток, моноцитов и т.д.) перед сортировкой в пробирках для 45 ПЦР. Одну сортировку ACK проводили с помощью проточной цитометрии. После этого процедуру SymplexTM проводили с целью получения ПЦР-продуктов, содержащих когнитивные пары V_H и V_L 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 SymplexTM 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 вариабельные домены куриного антитела, могли экспрессироваться в виде полноразмерного химерного антитела с одной конструкции экспрессионной плазмида 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 SymplexTM, 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 рестриктарами *ApaI* и *AigII*, 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. Плазмида pML392 была сконструирована для получения ПЦР-продуктов SymplexTM при расщеплении соответствующих сайтов рестрикции *ApaI* и *AigII*. Последующее лигирование пулов ПЦР-продуктов и pML392 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 *Ascl* и *NheI*. При вставке соответствующего расщепленного по *Ascl/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 вариабельные домены тяжелой и легкой цепей аналогов антител ниволумаба и пембролизумаба, были получены

из веб-сайта IMGT® 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 IgG₄ 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 СНО трансфицировали соответствующими экспрессионными плазмидами при использовании стандартной системы экспрессии белков. Соответствующие супернатанты, содержащие антитела, очищали при помощи стандартной колоночной хроматографии с белком A.

Таблица 3. Аналоги антител на основе синтезированных генов

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

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™ (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™ 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 1E6 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 3A-3C показаны репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии для: (A) клона антитела, который специфично связывается с клетками, трансфицированными человеческим PD-1, (B) клона, который неспецифично связывается с клетками CHO-S, и (C) 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 вариабельные домены тяжелой цепи (V_H) и вариабельные 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[®] 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 заменили другой аминокислотой (Тир), 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.

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_H и V_L последовательности гуманизированных антител против PD-1*

	Гуманизированное антитело	Аминокислотная последовательность V_H	Аминокислотная последовательность V_L
5	[12865.15377]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFD FSDHGMQWVRQAPGKGLEYV GVIDTTGRYTYYAPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKT TCVGGYLCTVGSIDAWGQGTLTVT SS (SEQ ID NO: 6)	SYELTDPAVSVALGQTVRITCSG GGSSSYYGWYQQKPGQAPVTVIY DDTNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLT ITGAQAEDEADYY CGGYEGSSHA GIFGSGTKVTVL (SEQ ID NO: 7)
10	[12892.15378]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFD FSSYT MQWVRQAPGKGLEWVG VIS STGGSTGYGPAVKGRATISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CVKS SGDAWSVDGLDAWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 8)	SYELTDPAVSVALGQTVRITCSG GGSAYGWYQQKPGQAPVTVIY YN NQRPSGIPDRFSGSSSGNTASLT ITGAQAEDEADYY CGSYDSSAVGIF GSGTKVTVL (SEQ ID NO: 9)
15	[12796.15376]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFD FSSYT MQWVRQAPGKGLEWVG VIS STGGSTGYGPAVKGRATISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CVKS SGDAWSVDGLDAWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 10)	SYELTDPAVSVALGQTVRITCSG GGSAYGWYQQKPGQAPVTVIY YN NQRPSDIPDRFSGSSSGNTASLT ITGAQAEDEADYY CGSYDSSAVGIF GSGTKVTVL (SEQ ID NO: 11)
20	[12777.15382]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFD FSSYT MQWVRQAPGKGLEWVG VIS GSGITTL YAPAVKGRATISRDNS KNTVYLQMNSLRAEDTAVYY CTRSP SITDGWTYGGAWIDAWGQGTLTVTS S (SEQ ID NO: 12)	SYELTDPAVSVALGQTVRITCSG GDGSY GWFFQQKPGQAPVTVIY DN DNRPSDIPDRFSGSSSGNTASLT ITGAQAEDEADYY CGNADLSGGIFG SGTKVTVL (SEQ ID NO: 13)
25	[12760.15375]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFT FSTFN MVWVRQAPGKGLEYVA EIS SDGSFT WYATAVKGRATISRDNS KNTVYLQMNSLRAEDTAVYY CAKS DCSSSYYGYSCIGI DAWGQGTLTVTS S (SEQ ID NO: 14)	SYELTDPAVSVALGQTVRITCSG GIS DDG SYYGWFFQQKPGQAPVT VIY IN DRPSN IPDRFSGSSSGNTA SLTITGAQAEDEADYY CGSYDSSA GVGIFGSGTKVTVL (SEQ ID NO: 15)
30	[13112.15380]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFT FSSY NMFWVRQAPGKGLEFVAE ISGSNTGSRT WYAPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKS IYGGYCAGGYSCGVGLIDA WGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 16)	SYELTDPAVSVALGQTVRITCSG GSSD YYGWFFQQKPGQAPVTVIY Y NN KRPSDIPDRFSGSSSGNTASLT ITGAQAEDEADYY CGNADSSVG GSGTKVTVL (SEQ ID NO: 17)
35			

*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	CASDIRSRNDSCYFLGGCSSGFIDWW	SSYS	ESN	CGNADSSSGIF
SEQ ID NO:	24	25	26	27	28	29
[12865.15377]	GFDFSDHG	IDTTGRYT	CAKTTCVGGYLCTVGSIDAW	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]	GFDFSSYT	ISSTGGST	CVKSVSGDAWSVDGLDAW	GSA	YNN	CGSYDSSAVGIF
SEQ ID NO:	42	43	44	45	46	47
[12777.15382]	GFDFSSYG	ISGSGITT	CTRSPSITDGWTYGGAWIDAW	DGS	DND	CGNADLSSGGIF
SEQ ID NO:	48	49	50	51	52	53
[12760.15375]	GFTFSTFN	ISSDGSFT	CAKSDCSSYYGYSCIGIIDAW	ISDDGSYY	IND	CGSYDSSAGVGIF
SEQ ID NO:	54	55	56	57	58	59
[13112.15380]	GFTFSSYN	ISGSNTGSRT	CAKSIYGGYCAGGYSCGVGLIDAW	SSDY	YNN	CGNADSSVGIF
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):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAL
QSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
GPSVFLFPPKPDKTLMSIRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVET
TKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

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 односторонней 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 суперантителом, который связывается с молекулами МНС II класса и специфическими V β 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- γ .

[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 донора совместно культивировали с CD4⁺ Т-клетками другого донора с получением аллоантителоспецифической 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 для данного специфического антитела. Одно из полученных в результате антител, 12748.16124, указано ниже. Данный вариант имеет другую V_L последовательность, но такую же V_H 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 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 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 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⁺ Т-клетки (в соотношении 1:10) двух разных доноров и через 5 дней измеряли 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 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 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: ПроточноСитометрический анализ антител против PD-1 на блокирующую

активность в отношении лиганда PD-L1

[0231] В данном примере проиллюстрировано, как панель антител против PD-1 тестируется на блокирующую активность в отношении лиганда PD-L1 с помощью проточного цитометрического конкурентного анализа при использовании 5 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 10 экспрессировали PD-1 человека и яванского макака, при этом связывание меченного R-PE (R-фикаэритрином), 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 15 Lightning-Link® R-Phycoerythrin Conjugation Kit (Innova Biosciences, UK). Клетки CHO-S, 20 транзиентно трансфицированные для экспрессии человеческого PD-1, смешивали с CFSE-окрашенными клетками CHO-S, транзиентно 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) 25 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 (аллофикацианином) антитела против легкой цепи человеческого IgG. Связывание PD-L1 и антитела против PD-1 количественно определяли 25 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 тестируются при конечной концентрации антитела 10 мкг/мл (см. выше). Три из протестированных 30 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 35 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-меченные 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 неспецифичное 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 MgCl₂ 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 наибольшей 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 ⁻¹ c ⁻¹)	Ошибка k_{on}	k_{off} (c ⁻¹)	Ошибка k_{off}	K_D (пМ)
[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	\pm	1,0E+10	6,9E-04	\pm	8,5E-01	2340
[12796.15376]	Человек	7,1E+05	\pm	3,9E+03	3,8E-04	\pm	1,1E-06	542
[12796.15376]	Макак	3,2E+05	\pm	3,5E+03	7,0E-04	\pm	2,5E-06	2220
[12777.15382]	Человек	2,4E+05	\pm	1,7E+03	8,0E-05	\pm	4,0E-06	337
[12777.15382]	Макак	2,5E+05	\pm	7,3E+03	1,7E-04	\pm	3,5E-06	681
[12760.15375]	Человек	1,2E+06	\pm	3,4E+03	1,4E-04	\pm	6,5E-07	112
[12760.15375]	Макак	1,0E+06	\pm	1,7E+04	7,2E-03	\pm	5,8E-05	6940
[13112.15380]	Человек	1,2E+06	\pm	4,8E+03	6,9E-05	\pm	7,4E-07	60
[13112.15380]	Макак	2,5E+06	\pm	1,5E+04	1,1E-03	\pm	3,9E-06	452
аналог ниволумаба	Человек	1,4E+06	\pm	9,2E+03	1,1E-03	\pm	4,1E-06	758
аналог ниволумаба	Макак	1,4E+06	\pm	8,5E+03	7,7E-04	\pm	2,9E-06	542
аналог пембролизумаба	Человек	2,4E+06	\pm	2,7E+04	2,1E-03	\pm	1,1E-05	852
аналог пембролизумаба	Макак	1,7E+06	\pm	1,0E+04	3,3E-04	\pm	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 микроспоттера 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 конъюгиравали в течение 15 минут при использовании микроспоттера с непрерывным потоком. После нанесения, SensEye® помещали в биосенсор IBIS MX96 и деактивировали 1 М этианоламином, 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 анализа, 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 значимо 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 1С) 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 1Е (12865, 12892 и 12777), была уникальна тем, что они не блокировали связывание 12866 или 12807.

[0242] Наконец, 12866 (Корзина 1А) и 12807 (Корзина 1В) связывали уникальные эпитопные корзины. Антитело 12866 блокировали 12819 и ниволумаб, но не блокировали другие антитела против PD-1, и 12807 блокировали 12819 и пембролизумаб, но не блокировали 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 мышевым PD-1, но не связывается с крысиным PD-1.

Материалы и методы

[0244] His-меченные 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 мышевый 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 мышевый или крысиный PD-1. Ни один из референсных аналогов ниволумаба и пембролизумаба не реагировал перекрестно с мышевым 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} ($M^{-1}c^{-1}$)	Ошибка k_{on}	k_{off} (c^{-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 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. Ингибиование 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 5 В-клеточных эпитопов являются прерывистыми по природе (Sivalingam and Shepherd, Mol Immunol. 51(3-4):304-92012 (2012), Kringleum et al., Mol Immunol. 53(1-2):24-34 (2013)), причем средняя протяженность эпитопа составляет 15-22 аминокислотных остатка, из 10 которых 2-5 аминокислот вносят большую часть энергии связывания (Sivalingam and Shepherd, выше).

15 [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

20 [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 β-сэндвича, сформированного взаимодействиями 8 антипараллельных β-цепей, 25 расположенных в двух β-слоях, причем GFCC' β-цепи находятся на одной стороне, а ABED β-цепи расположены на противоположной стороне. Два β-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 β-цепями не была установлена и отсутствует, как и часть C-концевой 30 последовательности после остатка 146 (PDB 4ZQK, Zak et al., Structure 23(12):2341-2348 (2015)). Недавно была опубликована кристаллическая структура комплекса человеческого PD-1:пембролизума (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 пембролизума, 35 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 40 или PD-L2 человека со стехиометрией 1:1, при этом связывание главным образом происходит при перекрывании связывающих участков, которое опосредовано GFCC' β-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 С β-цепи, и G124, I126, L128, A132, I134 и E136, 45 расположенные на F и G β-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. 5 (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-структурой APO PD-1 человека (PDB 2M2D). Структуру PDB 4ZQK использовали в 10 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 15 мутации с заменой на остатки крьсиного 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 20 последовательности ECD человеческого PD-1 последовательно заменяли куриной последовательностью по сегментам, которые перекрывались по 5 аминокислотам. 25 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 выравнять с PD-1 человека, и ее исключали.

[0255] Последовательность кДНК PD-1, кодирующую внеклеточный домен 30 человеческого PD-1, синтезировали и клонировали в вектор, содержащий промотор ЦМВ и последовательность Fc IgG₁ человека (остатки P101-K330), со слиянием Fc IgG₁ с C-концом клонированного ECD PD-1. Слитые конструкции Fc с мутантным человеческим PD-1 получали с помощью стандартной ПЦР и методик генной инженерии, 35 при этом белок экспрессировался транзиентно в 2 мл культуре при использовании системы экспрессии ExpiCHOTM. 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, иммунизировали на G-a-hu-IgG Fc SensEye® 40 (Ssens BV, The Netherlands) в течение 15 минут при использовании микроспоттера с непрерывным потоком (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, US). После нанесения, 45 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

тирования (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 5 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

10 [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 15 совместно экспрессировали на одной и той же плазмиде, а не на отдельных плазмидах, в клетках-хозяевах. Не блокирующие связывание лигандов PD-L1 и PD-L2 Fab 13112.15380 и Герцептин® были включены в качестве контроля.

20 [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 25 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 30 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).

35 [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.

40 [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 С) был расположен на C' β-цепи и на C'-D петле. Контактные остатки/линейные эпитопы также были обнаружены на C и F β-цепи, где также присутствуют контактные остатки для PD-L1. Внутренний эпитоп ниволумаба (Фигура 9, панель D) 45 присутствовал на конце F β-цепи и на всей G β-цепи, охватывая некоторые описанные контактные остатки PD-1, используемые человеческим PD-L1. Внутренние эпитопы 12819 и 12865 (Фигура 9, панели Е и F) были расположены на F и G β-цепях, с охватом большей области, чем ниволумаб, и перекрыванием 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 5 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).

10 [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 15 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 20 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
25	1 31-40	АК 37-38	F37L;S38F	1,2	0,6	0,4	0,9	0,4
	2 36-45	АК 37-45	F37L;S38F;L41T;V43T;V44R;T45P	2,3	0,7	0,9	0,5	1,0
	3 41-50	АК 41-49	L41T;V43T;V44R;T45P;E46A;D48S;N49S	1,3	0,6	0,5	0,6	0,7
	4 46-55	АК 46-55	E46A;D48S;N49S;T53I;S55N	0,3	0,6	0,5	0,6	0,6
	5 51-60	АК 53-59	T53I;S55N;S56I;T59S	1,2	0,9	0,8	0,9	2,5
	6 56-65	АК 56-64	F56I;T59S;E61L;S62E;V64N	7,1	0,2	0,9	12,0	0,8
30	8 66-75	АК 69-75	R69Q;M70K;S71T;P72N;S73N;N74S;Q75N	6,4	N.B.	1,2	0,9	1,6
	10 76-85	АК 76-85	T76P;D77Q;L79I;A81G;F82I;P83I;E84R;D85N	33,7	13,8	0,8	N.B.	1,0
	11 81-90	АК 81-90	A81G;F82I;P83I;E84R;D85N;R86I;S87P;P89K;G90K	17,7	5,4	2,0	N.B.	0,8
	12 86-95	АК 86-95	R86I;S87P;P89K;G90K;Q91M;D92E;R94K;F95Y	2,2	0,6	0,5	N.B.	0,6
	15 101-110	АК 103-110	G103T;R104P;D105V;H107K;S109E;V110I	1,3	0,8	0,9	0,6	0,9
35	16 106-115	АК 107-115	H107K;S109E;V110I;V111L;R112N;A113L;R114H;R115Q	3,6	0,4	0,6	0,7	0,7
	17 111-120	АК 111-120	V111L;R112N;A113L;R114H;R115Q;T120F	0,2	0,5	0,4	0,7	0,7
	18 116-125	АК 120-125	T120F;L122Y;A125L	3,8	4,6	2,7	8,8	1,5
	19 121-130	АК 122-130	L122Y;A125L;S127T;L128F;A129S;P130R	175,0	N.B.	0,8	2,3	0,8
	20 126-135	АК 127-135	S127T;L128F;A129S;P130R;K131S;A132D;Q133K;I134VK135V	N.B.	N.B.	N.B.	3,7	0,6
40	21 131-140	АК 131-140	K131S;A132D;Q133K;I134VK135V;L138S;R139H;A140S	N.B.	N.B.	1,0	3,1	0,5
	22 136-145	АК 138-143	L138S;R139H;A140S;E141Q;R	1,9	1,0	0,5	0,8	1,0

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

5	<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

10 типа.

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

15

20

25

30

35

40

45

	Мутация	12819. 17149	12865. 17150	ниволумаб	пембролизумаб	13112. 15380
5	P21A	2,1	1,0	0,5	0,6	1,1
	G22A	1,0	0,9	0,6	0,8	1,0
	D26A	1,1	0,8	1,7	0,7	1,2
	S27A	0,8	0,8	2,7	0,8	1,1
10	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
	N33A	1,0	1,1	0,8	0,8	1,0
15	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
20	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
25	S57A	1,2	1,0	0,9	0,9	1,1
	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
30	N66A	2,2	2,1	0,8	201,3	1,0
	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
35	Q75A	1,0	0,5	1,0	0,8	0,9
	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
40	P83A	1,5	0,8	0,9	N.B.	0,9
	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
45	Q88A	1,4	1,4	0,8	0,2	0,9
	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
	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

	Мутация	12819. 17149	12865. 17150	ниволумаб	пембролизумаб	13112. 15380
5	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
10	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
15	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
20	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
25	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
30	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
35	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
40	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
45	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 мышиных опухолей

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

Методы

[0263] 2×10^5 Sa1N (фибросаркома), 1×10^6 CT26 (карцинома толстой кишки), 5×10^6 ASB-XIV (карцинома легкого) или 8×10^6 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 мм^3 согласно следующей формуле: (ширина)² \times длина \times 0,5. При среднем размере опухоли 30-50 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 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⁺/CD4⁺ 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⁺ и CD4⁺ Т-клетками.

Методы

[0266] 4,5×10⁵ CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток выделяли у человека донора МКПК и смешивали с 2,05×10⁶ раковых клеток A375 (меланома человека) перед подкожной инокуляцией в бок самкам мышей NOD scid с возрастом 6-8 недель. Лечение начинали в день инокуляции опухоли, при этом мыши три раза в неделю получали в общей сложности шесть внутрибрюшинных 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 мм³ согласно следующей формуле:

(ширина)²×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 _H [12819.15384]
3	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _L [12819.15384]
4	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _H [12748.15381]
5	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _L [12748.15381]
6	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _H [12865.15377]
7	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _L [12865.15377]
8	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _H [12892.15378]
9	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _L [12892.15378]
10	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _H [12796.15376]
11	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _L [12796.15376]
12	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _H [12777.15382]
13	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _L [12777.15382]
14	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _H [12760.15375]
15	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _L [12760.15375]
16	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _H [13112.15380]
17	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _L [13112.15380]

	18-65	CDR-последовательности; см. SEQ ID NO в Таблице 2 и последовательности в Таблице 5, а также Список последовательностей ниже
5	66	Гуманизированная аминокислотная последовательность V _L [12748.16124] (альтернативная зародышевая линия)
	67	Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 (вариант LALA)
	68	Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи
	69	Гуманизированная последовательность ДНК V _H [12819.15384]
	70	Гуманизированная последовательность ДНК V _L [12819.15384]
	71	Гуманизированная последовательность ДНК V _H [12748.15381]
	72	Гуманизированная последовательность ДНК V _L [12748.15381]
10	73	Гуманизированная последовательность ДНК V _H [12865.15377]
	74	Гуманизированная последовательность ДНК V _L [12865.15377]
	75	Гуманизированная последовательность ДНК V _H [12892.15378]
	76	Гуманизированная последовательность ДНК V _L [12892.15378]
	77	Гуманизированная последовательность ДНК V _H [12796.15376]
15	78	Гуманизированная последовательность ДНК V _L [12796.15376]
	79	Гуманизированная последовательность ДНК V _H [12777.15382]
	80	Гуманизированная последовательность ДНК V _L [12777.15382]
	81	Гуманизированная последовательность ДНК V _H [12760.15375]
20	82	Гуманизированная последовательность ДНК V _L [12760.15375]
	83	Гуманизированная последовательность ДНК V _H [13112.15380]
	84	Гуманизированная последовательность ДНК V _L [13112.15380]
	85	Гуманизированная последовательность ДНК V _L [12748.16124] (альтернативная зародышевая линия)
25	86	Последовательность геномной ДНК константной области тяжелой цепи с включенными инtronами
	87	Последовательность кДНК константной области тяжелой цепи
	88	Последовательность ДНК лямбда константной области легкой цепи
	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

- *Выделением курсивом в последовательностях ДНК обозначены сайты клонирования.
- SEQ ID NO: 1 (полипептид PD-1 человека, рег. номер Uniprot Q15116 (PDCD1_HUMAN))
- MQIPQAPWPVVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSF
SNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR
RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVV
- SEQ ID NO: 2 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_H [12819.15384])
- EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTRYDMVWVRQAPGKGLEWVAGIGDSN
- SEQ ID NO: 3 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_L [12819.15384])
- KMTRYAPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSCIACWDEAGRID
AWGQGTDTVSS
- SEQ ID NO: 4 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_H [12748.15381] и [12748.16124])
- SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGGSYDGSSYYGWYQQKPGQAPVTIVYNNNNRP
SDIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCGSYDRPETNSDYVGMFGSGTKVTVL

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMNWVRQAPGKGLEWVAGIGNDG
SYTNYGAAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDIRSRNDCSYFLGGC
SSGFIDVGQGTQTLTVSS

SEQ ID NO: 5 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_L

⁵ [12748.15381])

SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGSSYSGWFQQKPGQAPVTVIYESNNRPSDIPDR
FSGSSSGNTASLTITGAQAQEDEADYYCGNADSSSGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 6 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_H

¹⁰ [12865.15377])

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSDHGMQWVRQAPGKLEYVGVIDTTGR
YTYYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTTCVGGYLCNTVGSID
AWGQGTQTLTVSS

SEQ ID NO: 7 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_L

¹⁵ [12865.15377])

SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGSSYYGWYQQKPGQAPVTVIYDDTNRPSGIP
DRFSGSSSGNTASLTITGAQAQEDEADYYCGGYEGSSHAGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 8 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_H

[12892.15378])

²⁰ EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSYTMQWVRQAPGKGLEWVGVISSTGG
STGYGPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKSISGDAWSVDGLDAW
GQGTQTLTVSS

SEQ ID NO: 9 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_L

[12892.15378])

²⁵ SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGGSAYGWYQQKPGQAPVTVIYYNNRPSGIPDR
FSGSSSGNTASLTITGAQAQEDEADYYCGSYDSSAVGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 10 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_H

[12796.15376])

³⁰ EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSYTMQWVRQAPGKGLEWVGVISSTGG
STGYGPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKSISGDAWSVDGLDAW
GQGTQTLTVSS

SEQ ID NO: 11 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_L

[12796.15376])

³⁵ SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGGSAYGWYQQKPGQAPVTVIYYNNRPSDIPDR
FSGSSSGNTASLTITGAQAQEDEADYYCGSYDSSAVGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 12 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_H

[12777.15382])

⁴⁰ EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSYGMQWVRQAPGKGLEWVGVISGSI
TTLYAPAVKGRATISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSPSITDGWTYGGAWID
AWGQGTQTLTVSS

SEQ ID NO: 13 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_L

[12777.15382])

⁴⁵ SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGDGSGYGVFQQKPGQAPVTVIYDNDNRPSDIPDR
FSGSSSGNTASLTITGAQAQEDEADYYCGNADLSGGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 14 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_H

[12760.15375])

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFNVMWVRQAPGKLEYVAEISSDGSF

TWYATAVKGRATISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSDCSSSYGYSCIGIID
AWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 15 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_L
[12760.15375])

5 SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGISDDGSYYYGWFQQKPGQAPVTVIYINDRRPS
NIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCGSYDSSAGVGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 16 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_H
[13112.15380])

10 EVQLLESGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSSYNMFVWRQAPGKGLEFVAEISGSNTG
SRTWYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSIYGGYCAGGYSCG
VGLIDAWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 17 (Гуманизированная аминокислотная последовательность V_L
[13112.15380])

15 SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGSSDYYGWFQQKPGQAPVTVIYNNKRPSDIPD
RFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCGNADSSVGIFGSGTKVTVL

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

SEQ ID NO: 19 (аминокислотная последовательность HCDR2 12819)

20 IGDSNKMT

SEQ ID NO: 20 (аминокислотная последовательность HCDR3 12819)

CAKGSCIACWDEAGRIDA

SEQ ID NO: 21 (аминокислотная последовательность LCDR1 12819)

GSYDGSSY

25 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)

30 GFTFSDYA

SEQ ID NO: 25 (аминокислотная последовательность HCDR2 12748)

IGNDGSYT

SEQ ID NO: 26 (аминокислотная последовательность HCDR3 12748)

CASDIRSRNDCSYFLGGCSSGFIDVW

35 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)

40 CGNADSSSGIF

SEQ ID NO: 30 (аминокислотная последовательность HCDR1 12865)

GFDFSDHG

SEQ ID NO: 31 (аминокислотная последовательность HCDR2 12865)

IDTTGRYT

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

CAKTCVGGYLCNTVGSI

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

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

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

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

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

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_L
[12748.16124] (альтернативная зародышевая линия))
SYELTQPPSVSPGQTARITCSGGSSYSYGWFQQKPGQAPVTVIYESNNRPSDIPERF

20 20 SGSSSGTTVTLTISGVQAEDeadYYCGNADSSSGIFGSGTKVTVL
SEQ ID NO: 67 (Аминокислотная последовательность константной области тяжелой
цепи)
ASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAL
QSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
25 PEAEAG GPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

SEQ ID NO: 69 (Гуманизированная последовательность ДНК V_H [12819.15384])
35 GGC CGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAAATCTGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTG
GATCCCTGCGACTGAGCTGCGCCGCTCTGGATTCAACCTTACAAGATACGACATGG
TGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTGGCTGGTATCGGCGAT
AGTAACAAGATGACCCGCTACGCACCTGCCGTCAAAGGGAGGGACAACAATTAGTCG
GGACAACCTAAAGAATACTCTGTATCTGCAGATGAATTCCCTGCAGCTGAGGATA
CAGCAGTGTACTATTGTCCAAAGGTAGCTGCATGCCCTGGTGGACGAAGCTGGC
40 CGTATTGATGCATGGGACAGGGACTCTGGTGACCGTCTCGAG
SEQ ID NO: 70 (Гуманизированная последовательность ДНК V_L [12819.15384])
GCTAGCCTTACGAGCTGACTCAGGACCCCTGCAGTGAGTGTGCCCTGGCCAG
ACAGTGAGAACATCACTTGCTCCGGCGGAGGGAGCTACGATGGTCCAGCTACTATGG
45 CTGGTATCAGCAGAACGCCAGGACAGGCACCTGTGACCGTCATCTATAACAATAACA
ATAGGCCATCTGACATTCCCGATCGGTTAGTGGATCTAGTTCAGGGAACACAGCTT
CTCTGACCATTACAGGAGCCCAGGCTGAGGACGAAGCAGATTACTATTGTGGGTCA
TACGACAGGCCAGAAACAAATTCCGATTATGTGGGAATGTTGGTAGCGGGACTAA

AGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 71 (Гуманизированная последовательность ДНК V_H [12748.15381] и [12748.16124])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGAAAGCGGAGGAGACTGGTCCAGCCAGGTG

5 GATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTCACATTTCTGACTACGCCATGA
ACTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGCGAGGAATCGGGAA
CGATGGAAGTTACACTAATTATGGAGCAGCCGTGAAGGGGAGAGCTACTATTC
GCGACAAACAGAAAAAATACCCTGTACCTGCAGATGAACTCACTGAGAGCTGAAGAT
ACCGCAGTGTACTATTGTGCCTCTGACATCAGGAGTCGGAATGATTGCTCCTATT
10 CTGGGAGGGTGTCCAGCGGCTTATTGACGTGTGGGTAGGGCACCCCTGGTCAC
AGTCTCGAG

SEQ ID NO: 72 (Гуманизированная последовательность ДНК V_L [12748.15381])

GCTAGCCTCTACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTCGCCCTGGGCCAG
15 ACAGTGAGAACATCACTTGCTCCGGCGGATCCAGCTACAGCTATGGGTGGTCCAGCA
GAAGCCCGGTCAAGGCCCTGTGACCGTCATCTATGAAAGTAACAATAGGCCATCAG
ACATTCCCAGTCGGTTCTGGCTCTAGTCAGGAAACACAGCTAGTCTGACCATCA
CAGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGCAATGCAGATTCCAGC
TCTGGAATTCGGTCCGGTACTAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 73 (Гуманизированная последовательность ДНК V_H [12865.15377])

20 GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTG
GATCCCTGCGACTGAGCTGCGCCGCTCTGGATTGACTTACCGATCACGGGATGC
AGTGGGTGAGACAGGCACCAGGAAGGGACTGGAGTACGTGGGTGTCATGACAC
CACAGGCCGCTATACTACTATGCACCTGCCGTCAAGGGCAGGGCTACCATTAGTC
25 GGGACAACACTAAAAAATACACTGTACCTGCAGATGAACCTCTGAGGGCTGAAGAT
ACTGCAGTGTACTATTGCGCAAAACTACCTGCGTGGGAGGGTACCTGTGCAATAC
CGTCGGAAGTATCGATGCTGGGGACAGGGACACTGGTGAUTGTCTCGAG

SEQ ID NO: 74 (Гуманизированная последовательность ДНК V_L [12865.15377])

GCTAGCCTCTACGAGCTGACTCAGGACCCAGCAGTGTAGCGTCGCCCTGGCCA
30 GACAGTGAGAACATCACTTGCTCTGGCGGAGGGTCCAGCTTACTATGGTTGGTACCA
GCAGAACCCGCCAGGCTCTGTGACCGTCATCTATGACGATACAAACAGGCCAA
GTGGAATTCCCGATCGTTCTCAGGTAGTCATCCGGCAATACAGCTTCTGACCA
TCACAGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCAGATTACTATTGTGGTGGCTATGAAGGA
AGCTCTCACGCCGGATTGGAAAGTGGACTAAAGTCACCGTCCTAGG

35 SEQ ID NO: 75 (Гуманизированная последовательность ДНК V_H [12892.15378])
GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGAAAGTGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTG
GAAGCCTGAGACTGTCTGCGCCGCTAGTGGCTTCAGCTACACCATGC
AGTGGGTGAGGCAGGCACCAGGAAGGGACTGGAGTGGGTGGCGTCATCTCTAGT
ACTGGAGGGTCTACCGGATACGGCCTGCTGTGAAGGGAAGGGCAACAATTACAG

40 GGATAACTCCAAAATACTCTGTATCTGAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAACAGACA
CAGCCGTGTACTATTGCGTGAAATCAATCTCCGGAGATGCCTGGTCTGTGGACGGC
TGGATGCTTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACAGTCTCGAG

SEQ ID NO: 76 (Гуманизированная последовательность ДНК V_L [12892.15378])

GCTAGCCTCATACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTCGCCCTGGACA
45 GACAGTGAGAACATCACTTGCTCCGGAGGAGGATCCGCTACGGTTGGTATCAGCAGA
AGCCCGGCCAGGCACCTGTGACCGTCATCTACTATAACAATCAGAGGCCATCTGGC
ATTCCCGACCGGTTCACTGGATCCAGCTCTGGGAACACAGCAAGTCTGACCATCAC
AGGCGCCAGGCTGAGGACGAAGCCGATTACTATTGTGGAAGCTATGATAGTCAG

CTGTGGGGATTTGGTCTGGCACTAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 77 (Гуманизированная последовательность ДНК V_H [12796.15376])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGAGGACTGGTCCAGGCCAGGTG
 GAAGCCTGAGACTGTCTGCGCCGCTAGTGGCTTCAGCTACACCATGC
 5 AGTGGGTGAGGCAGGCACCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCGTCATCTCTAGT
 ACTGGAGGGTCTACCGGATACGGGCTGCTGAAGGAAAGGGCAACAATTACG
 GGATAACTCCAAAAAATACTCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAACAGA
 CAGCCGTGTACTATTGCGTGAAATCAGTCTCCGGAGATGCCTGGTCTGTGGACGGC
 TGGATGCTTGGGTCAGGGCACCTGGTCACAGTCTCGAG

10 SEQ ID NO: 78 (Гуманизированная последовательность ДНК V_L [12796.15376])

GCTAGCCTCATACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTGCCCTGGGCCAG
 ACAGTGAGAATCACTTGCTCCGGAGGAGGATCCGCCTACGGTTGGTATCAGCAGAA
 GCCCGGCCAGGCACCTGTGACCGTCATCTACTATAACAATCAGAGGCCATCTGACA
 15 TCCCCGATCGGTTAGTGGATCCAGCTCTGGGAACACAGCAAGTCTGACCATCACA
 GGCGCCCAGGCTGAGGACGAAGCCGATTACTATTGTGGAAGCTATGATAGTTCAGC
 TGTGGGGATTTGGTCTGGCACTAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 79 (Гуманизированная последовательность ДНК V_H [12777.15382])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGAGGAGGACTGGTCCAGGCCAGGTG
 20 GAAGCCTGCGACTGTCTGCGCCGCTAGTGGATTGACTTTCCAGCTACGGAATGC
 AGTGGGTGAGGCAGGCACCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCGTCATCTCTGG
 AAGTGGGATTACCACACTGTACGCACCTGCCGTCAAGGAAAGGGCTACTATCTCAC
 GGGACAACCTAAAAAATACAGTGTATCTGCAGATGAACCTCCCTGAGAGCTGAAGAT
 ACCGCAGTCTACTATTGTACACGCTACCCCTCCATCACAGACGGCTGGACTTATGGA
 25 GGGGCCTGGATTGATGCTTGGGTCAGGGCACTCTGGTGACCGTCTCGAG

SEQ ID NO: 80 (Гуманизированная последовательность ДНК V_L [12777.15382])

GCTAGCCAGCTACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTGCCCTGGCCA
 GACAGTGAGAATCACTTGCACTGGCGGAGATGGGTACGGTTGGTCCAGCAGA
 AGCCCAGGACAGGCCCTGTGACCGTCATCTATGACAACGATAATAGGCCATCTGAC
 30 ATTCCCGATCGGTTAGTGGCTCCAGCTCTGGAAACACAGCTTCTCTGACCATCACA
 GGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGAATGCAGACCTGTCCGG
 GGGTATTTCGGCAGCGGAACAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 81 (Гуманизированная последовательность ДНК V_H [12760.15375])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGAGGAGGACTGGTCCAGGCCAGGTG
 35 GATCCCTGAGACTGAGCTGCGCCCTCTGGATTACCTTAGTACATTCAACATGG
 TGTGGGTGAGGCAGGCACCTGGAAAGGGACTGGAGTACGTGGCTGAAATCTCCAGC
 GACGGCTCTTTACATGGTATGCAACTGCCGTCAAGGGCAGGGCCACCATTAGTCG
 GGATAACTAAAAAATACAGTGTACCTGCAGATGAATTCCCTGAGGGCTGAGGACA
 CCGCAGTCTACTATTGCGAAAATCCGATTGTTCTAGTCATACTATGGATATAGCT
 40 GTATCGGGATCATTGACCGCTTGGGTCAGGGCACTCTGGTGACCGTCTCGAG

SEQ ID NO: 82 (Гуманизированная последовательность ДНК V_L [12760.15375])

GCTAGCCTCATGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTACCGTCCGCCCTGGCCA
 GACAGTGAGAATCACTTGCTCCGGCGAATTAGCGACGATGGCTTACTATTACG
 GATGGTTCCAGCAGAAGCCGGACAGGCCCTGTGACCGTCATCTATATTACGAC
 45 AGGCAGGCCAAGTAATATCCCCGATAGGTTTCAGGGTCCAGCTCTGGTAACACAGC
 TTCTCTGACCATTACAGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTATTACTGTGGCTC
 TTACGATAGTCAGCAGGGTGGGTATCTCGGCAGTGGAACTAAAGTCACCGTCC
 TAGG

SEQ ID NO: 83 (Гуманизированная последовательность ДНК V_H [13112.15380])

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGAGCTGGTCCAGCCAGGTG
 GATCACTGAGACTGTCCCTCGGCCCTCCGGCTTCACCTTTCCAGCTACAACATGT
 TCTGGGTGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTTGCTGCTGAAATCTCTGGT
 5 AGTAATACTGGAAGCCGAACCTGGTACCGCACCTGCCGTGAAGGGCAGGGCTACAAT
 TTCTCGGGACAACAGTAAAAAATACTCTGTATCTGCAGATGAACCTCTGAGGGCTGA
 GGATACAGCAGTGTACTATTGTGCAAATCAATCTACGGAGGGTATTGCGCCGGTG
 GCTATT CCTGTGGTGTGGCCTGATTGACGCATGGGACAGGGACCCCTGGTCACA
 GTCTCGAG

10 SEQ ID NO: 84 (Гуманизированная последовательность ДНК V_L [13112.15380])

GCTAGCCTCATACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTGCCCTGGGCCAG
 ACAGTGAGAACATCACTTGAGTGGCGGATCCAGCGATTACTATGGGTGGTCCAGCA
 GAAGCCCGGTCAAGGCCCTGTGACCGTCATCTACTATAACAACAAGAGGCCATCTG
 15 ACATTCCCAGTCGGTTAGTGGCTCTAGTCAGGAAACACAGCCTCCGTGACCATTA
 CAGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGCAATGCAGACTCCAGC
 GTGGGAGTCTCGGGTCTGGTACTAAGGTGACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 85 (Гуманизированная последовательность ДНК V_L [12748.16124])

(альтернативная зародышевая линия))

20 GCTAGCCTCTTACGAGCTGACTCAGCCACCTTCCGTGTCCGTGTCCCCCAGGACAG
 ACCGCAAGAACATCACATGCAGTGGCGGATCCAGCTACTCATATGGGTGGTCCAGCA
 GAAGCCTGGTCAGGCCCGTGAAGTCAGTCATCTAGAGAGCAACAATAGGCCTTCTG
 ACATTCCAGAACGGTTAGTGGCTCTAGTCAGGAACCACAGTGAECTGACCATCA
 GCGGGGTCCAGGCCGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGCAACGCTGATTCCAGC
 25 TCTGGAATTTCGGGTCCGGTACAAAAGTGAETGTCTTAGG

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

CTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCCTCCAAG
 AGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
 30 ACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCCCTGACAGCAGCGCTGCACACCTTCC
 CGGCTGCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCT
 CCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
 ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTG
 CTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCTGCCTGGACGCATCCGGCTATGCAGTCCCAGTC
 35 CAGGGCAGCAAGGCAGGCCCTCTGCCTCTTCACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCC
 ACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTCCCCAGGCTCTGGCAGGCACAG
 GCTAGGTGCCCTAACCCAGGCCCTGACACAAAGGGCAGGTGCTGGCTCAGAC
 CTGCCAAGAGCCATATCGGGAGGACCCCTGCCCTGACCTAAGCCCACCCAAAGG
 CCAAACCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAACTC
 40 CCAATCTTCTCTGCAAGAGCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCAACCGT
 GCCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCCTGCCCTCCAGCTCAAGGCAGGGACAGGTGCCCT
 AGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCTGACACGTCCACCTCCA
 TCTCTCCTCAGCACCTGA^{Agccgc}GGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCAAAAA
 CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGAGG
 45 CGTGAGGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
 TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT
 GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
 GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC

AAAGGTGGGACCCGTGGGTGCGAGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTGGCCA
CCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGCCCTACAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCTCATCCCAGGAGATGACCAAGAACAGGT

5 CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCC
GACGGCTCCTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

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

10 CTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAG
AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCC
CGGCTGCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCT
CCAGCAGCTTGGCACCCAGACACTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
15 ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCC
ACCGTGCCAGCACCTGA^AggccGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCCCC^AAAAC
CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGAGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
20 GTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA
AAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCTGCCCATCCGGGAGGAGATG
ACCAAGAACCAAGGTCAAGCTCACCTGAGCTACAGCTGCCAGGTACCGCATG
CGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCT
25 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGAGAACAGCCTCTCCGTCCCCGGGTAAATGA

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

CCTAGGTCA^GCCCAAGGCCAACCCACTGTCACTCTGTTCCGCCCTCCTGTGAG
30 GAGCTCCAAGCCAACAAGGCCACACTAGTGTGATCAGTGACTTCTACCCGGG
AGCTGTGACAGTGGCTTGGAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAG
ACCACCAAACCCCTCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGTACCTGAG
CCTGACGCCCGAGCAGTGGAGCTACAGCTGCCAGGTACCGCATG
AAGGGAGCACCGTGGAGAACAGTGGCCCTACAGAATGTTATAA

35 SEQ ID NO: 89 (Полипептид PD-1 *Macaca fascicularis*, пер. номер NCBI B0LAJ3_MACFA)
MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLESPDR PWNA^NPTFSPA LLLVTEGDNA
TFTCSFSNAS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTRL
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERAE VPTAHPSPSP
RPAGQFQALV VGVVGGLGS LVLLVVVLAV ICSRAAQGTI EARRTGQPLK
40 EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPAP CVPEQTEYAT IVFPSGLGTS SPARRGSADG
PRSPRPLRPE DGHCSWPL

SEQ ID NO: 90 (Полипептид PD-1 *Gallus Gallus*, пер. номер NCBI XP_422723.3)

MGKEAPSGTG HRHRAQQGTR RPAMALGTSR TMWDSTEAA^VVLCVLLCC
NPPLAGCHQV TLFPATLTP AGSSATFICN ISMENSSLE^FNLNWYQKTNN SNPQKIAGII
45 RNIPQKKMEK YRLFNNTPVF KMEILNLHQ^NDSGFYYCGLI TFSRSDKVVE SSHSQLVVTE
APEKTNTIDE PSEE^ESSPPD HIKAVLLGTL LLAGVIVLLL FGYIIINNRR ADVQKPSSGN
TLAEVKPPVV PVPTVDYGVL EFQRDPHSQV PLETCPAEQT EYATIVFPEE KPITPERGKR
HKDERTWQLP

SQPC

SEQ ID NO: 91 (Полипептид PD-1 *Mus musculus*, рег. номер NCBI NP_032824.1)

MWVRQVPWSF TWAVLQLSWQ SGWLLEVPNG PWRSLTFYPA WLTSEGANA

TFTCSLSNWS EDMLNWNRL SPSNQTEKQA AFCNGLSQPV QDARFQIQL

5 PNRHDFHMNI LDTRRNDSGI YLCGAISLHP KAKIEESPGA ELVVTERILE TSTRYPSPSP

KPEGRFQGMV IGIMSAVG1 PVLLLLAWAL AVFCSTMSE ARGAGSKDDT

LKEEPAAPV PSVAYEELDF QGREKTPELP TACVHTEYAT IVFTEGLGAS AMGRRGSADG

LQGPRPPRHE DGHCSWPL

SEQ ID NO: 92 (Полипептид PD-1 *Rattus norvegicus*, пер. номер NCBI XP_006245633.1)

10 MWVRQVPWSF TWAVLQLSWQ SGWLLEVPNG PWRSLTFYPA WLTSEGANA

TFTCSLSNWS EDMLNWNRL SPSNQTEKQA AFCNGLSQPV QDARFQIQL

PNRHDFHMNI LDTRRNDSGI YLCGAISLHP KAKIEESPGA ELVVTERILE TSTRYPSPSP

KPEGRFQGMV IGIMSAVG1 PVLLLLAWAL AVFCSTMSE ARGAGSKDDT

LKEEPAAPV PSVAYEELDF QGREKTPELP TACVHTEYAT IVFTEGLGAS AMGRRGSADG

15 LQGPRPPRHE DGHCSWPL

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> SYMPHOGEN A/S

<120> АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1 И КОМПОЗИЦИИ

<130> 022675.WO052

20 <140>

<141>

<150> 62/236, 341

<151> 2015-10-02

<160> 92

25 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 288

<212> Белок

<213> Homo sapiens

30 <400> 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 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 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 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										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	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			40									45		
35	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									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

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 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
 Asn Asn Arg Pro Ser Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 15 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
 <210> 6
 <211> 126
 <212> Белок
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 30 <400> 6
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 40 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
 <210> 7
 <211> 107

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 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 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
 Asp Thr Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser
 15 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
 <210> 8
 <211> 123
 <212> Белок
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 30 <400> 8
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 Ser Thr Gly Tyr Gly Pro Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 40 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
 <210> 9
 <211> 104

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 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 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
 Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly
 15 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
 <210> 10
 <211> 123
 <212> Белок
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 30 <400> 10
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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 Ser Thr Gly Tyr Gly Pro Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 40 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
 <210> 11
 <211> 104

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 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 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
 Gln Arg Pro Ser Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly
 15 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
 <210> 12
 <211> 126
 <212> Белок
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 30 <400> 12
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 40 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
 <210> 13
 <211> 103

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 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
 Asn Arg Pro Ser Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly
 15 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
 <210> 14
 <211> 127
 <212> Белок
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 30 <400> 14
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser 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
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 40 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
 <210> 15
 <211> 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
 Ile Tyr Ile Asn Asp Arg Arg Pro Ser Asn Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 15 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 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
 Ala Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 40 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
 25 пептид"
 <400> 26
 Cys Ala Ser Asp Ile Arg Ser Arg Asn Asp Cys Ser Tyr Phe Leu Gly
 1 5 10
 Gly Cys Ser Ser Gly Phe Ile Asp Val Trp
 20 25
 30 <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
 25 пептид"
 <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
 25 пептид"
 <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"
<400> 65

35 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
45 полипептид"
<400> 66
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

	210	215	220
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
	225	230	235
	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		240
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
	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		320
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		
	ggcgccgcccga ggtgcagctg ctggaatctg gagggaggact ggtccagcca ggtggatccc		60

	tgcgactgag ctgcgccgct tctggattca ccttacaag atacgacatg gtgtgggtcc	120
	gccaggcacc aggaaaggga ctggagtggg tggctggtat cgccgatagt aacaagatga	180
	cccgcctacgc acctgccgtc aaaggagggg caacaattag tcgggacaac tcaaagaata	240
5	ctctgtatct gcagatgaat tccctgcgag ctgaggatac agcagtgtac tattgtgcca	300
	aaggtagctg catcgccctgt tgggacgaag ctggccgtat tgatgcatgg ggacagggga	360
	ctctggtgac cgtctcgag	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 ctcaaggaccc tgcagtgagt gtcgccctgg gccagacagt	60
	gagaatcaact tgctccggcg gagggagcta cgtgggtcc agctactatg gctggtatca	120
	gcagaagccs ggacaggcac ctgtgaccgt catctataac aataacaata ggccatctga	180
	cattcccgat cggttcagtg gatctagttc agggAACACA gcttctctga ccattacagg	240
20	agcccaggct gaggacgaag cagattacta ttgtgggtca tacgacaggc cagaaacaaa	300
	ttccgattat gtggaatgt 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 ggtccagccs ggtggatctc	60
	tgcgactgag ttgcgccgct tcaggctca cattttctga ctacgccatg aactgggtga	120
	ggcaggctcc tggcaaggga ctggagtggg tcgcaggaat cgggaacgat ggaagttaca	180
	ctaattatgg agcagccgtg aaggggagag ctactattc ccgcgacaac agcaaaaata	240
35	ccctgtacct gcagatgaac tcactgagag ctgaagatac cgcagtgtac tattgtgcct	300
	ctgacatcg gagtcggaat gattgctcct atttcctggg agggtgttcc agcggcttta	360
	ttgacgttg gggtcaggc accctggta cagtctcgag	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
	gagaatcaact tgctccggcg gatccagcta cagctatggg tggccagc agaagccccgg	120

	tcaggcccct gtgaccgtca tctatgaaag taacaatagg ccatcagaca ttcccgatcg	180
	gttttctggc tctagttcag gaaacacagc tagtctgacc atcacagggg cccaggctga	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	
	ggcgcgcccga ggtgcagctg ctggaatccg gaggaggact ggtccagcca ggtggatccc	60
15	tgcgactgag ctgcgcgcgt tctggattcg actttagcga tcacggatg cagtgggtga	120
	gacaggcacc aggcaaggga ctggagtacg tgggtgtcat cgacaccasaca ggccgctata	180
	catactatgc acctgccgtc aagggcaggg ctaccattag tcgggacaac tcaaaaata	240
	cactgtacct gcagatgaac tctctgaggg ctgaagatac tgcaagtgtac tattgcgc当地	300
20	aaactacctg cgtgggaggg tacctgtgca ataccgtcgg aagtatcgat gcttggggac	360
	aggggacact ggtgactgtc tcgag	385
	<210> 74	
	<211> 330	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
25	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 74	
30	gcttagcctcc tacgagctga ctcaaggaccc agcagtgagc gtcgcctgg gccagacagt	60
	gagaatcaact tgctctggcg gagggtccag ctcttactat ggttgttacc agcagaagcc	120
	cggccaggct cctgtgaccg tcatctatga cgatacaaac aggccaagtg gaattccccga	180
	tcgggttctca ggtagttcat cccgaataac agcttctctg accatcacag gggcccgaggc	240
	tgaggacgaa gcagattact attgttgttgg ctatgaagga agctctcaccg cccggatttt	300
35	tggaagtggg actaaagtca ccgtcctagg	330
	<210> 75	
	<211> 376	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
40	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 75	
45	ggcgcgcccga ggtgcagctg ctggaaagtg gaggaggact ggtccagcca ggtggaaagcc	60
	tgagactgtc ttgcgcgcgt agtggcttcg actttccag ctacaccatg cagtgggtga	120
	ggcaggcacc aggcaaggga ctggagtggg tgggcgtcat ctctagtaact ggagggtcta	180
	ccggataacgg gcctgtgtg aagggaggg caacaattc acggataac tccaaaaata	240

	ctctgttatct gcagatgaac agcctgaggg cagaagacac agccgtgtac tattgcgtga	300
	aatcaatctc cggagatgcc tggctgtgg acgggctgga tgcttgggt cagggcaccc	360
	tggtcacagt ctgcag	376
	<210> 76	
5	<211> 321	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
10	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 76	
	gctaggccta tacgagctga cccaggaccc agcagtgtcc gtcgcctgg gacagacagt	60
	gagaatcaact tgctccggag gaggatccgc ctacggttgg tatcagcaga agcccggcca	120
15	ggcacctgtg accgtcatct actataacaa tcagaggcca tctggcattc ccgaccgggt	180
	cagtggatcc agctctggga acacagcaag tctgaccatc acaggcgccc aggctgagga	240
	cgaagccat tactattgtg gaagctatga tagttcagct gtggggattt ttggttctgg	300
	cactaaagtc 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 ctggaaagtg gaggaggact ggtccagcca ggtggaagcc	60
	tgagactgtc ttgcgcgcgt agtggcttcg actttccag ctacaccatg cagtgggtga	120
30	ggcaggcacc aggcaaggga ctggagtggg tggcgtcat ctctagtaact ggagggtctca	180
	ccggatacgg gcctgctgtg aagggaaaggga caacaatttc acggataaac tccaaaaata	240
	ctctgttatct gcagatgaac agcctgaggg cagaagacac agccgtgtac tattgcgtga	300
	aatcagtctc cggagatgcc tggctgtgg acgggctgga tgcttgggt cagggcaccc	360
	tggtcacagt ctgcag	376
35	<210> 78	
	<211> 321	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
40	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 78	
	gctaggccta tacgagctga cccaggaccc agcagtgtcc gtcgcctgg gccagacagt	60
45	gagaatcaact tgctccggag gaggatccgc ctacggttgg tatcagcaga agcccggcca	120
	ggcacctgtg accgtcatct actataacaa tcagaggcca tctgacattc ccgatcggtt	180
	cagtggatcc agctctggga acacagcaag tctgaccatc acaggcgccc aggctgagga	240
	cgaagccat tactattgtg gaagctatga tagttcagct gtggggattt ttggttctgg	300

сactaaagtс accgtcctag g	321
<210> 79	
<211> 385	
<212> ДНК	
5 <213> Искусственная последовательность	
<220>	
<221> источник	
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
10 <400> 79	
ggcgcccgga ggtgcagctg ctggaatccg gaggaggact ggtccagcca ggtggaagcc	60
tgcgactgtc ttgcgccgct agtggattcg actttccag ctacggaatg cagtgggtga	120
ggcaggcacc aggcaaggga ctggagtggg tggcgctcat ctctggaagt gggattacca	180
cactgtacgc actgtccgtc aagggaaggg ctactatctc acgggacaac tctaaaaata	240
15 cagtgtatct gcagatgaac tccctgagag ctgaagatac cgcagtctac tattgtacac	300
gctcaccctc catcacagac ggctggactt atggaggggc ctggatttat gcttgggtc	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
gagaatcaact tgcagtggcg gagatgggtc atacgggttg ttccagcaga agcccggaca	120
ggccctgtg accgtcatct atgacaacga taataggcca tctgacattc ccgatcggtt	180
30 tagtggctcc agctctggaa acacagcttc tctgaccatc acaggggccc aggctgagga	240
cgaagctgat tactattgtg gcaatgcaga cctgtccggg ggtatatttcg gcagcggAAC	300
taaagtccacc gtccttagg	318
<210> 81	
<211> 388	
35 <212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<221> источник	
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
40 <400> 81	
ggcgcccgga ggtgcagctg ctggaatctg gaggaggact ggtccagcca ggtggatccc	60
tgagactgag ctgcgccgct tctggattca ccttttagtac attcaacatg gtgtgggtca	120
ggcaggcacc tggaaaggga ctggagtacg tggctgaaat ctccagcgcac ggctttta	180
45 catggatgtc aactgtccgtc aagggcaggg ccaccattag tcgggataac taaaaata	240
cagtgtacct gcagatgaat tccctgaggg ctgaggacac cgcagtctac tattgcgcaa	300
aatccgattt ttcttagttca tactatggat atagctgtat cgggatcatt gacgcttggg	360
gtcaggcacc 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 gtcgcctgg gccagacagt 60
 gagaatcaact tgctccggcg gaatttagcga cgtggctct tactattacg gatggttcca 120
 gcagaagccc ggacaggccc ctgtgaccgt catctatatt aacgacagggc ggccaagtaa 180
 tatccccat aggttttcag ggtccagctc tggtaacaca gcttctctga ccattacagg 240
 ggcccaggct gaggacgaag ctgattatta ctgtggctct tacgatagtt cagcaggggt 300
 15 gggtatcttc ggcagtggaa staaagtac 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 ggcsgccsga ggtgcagctg ctggaaagtg gaggaggact ggtccagcc ggtggatcac 60
 tgagactgtc ctgcgccgccc tccggcttca cctttccag ctacaacatg ttctgggtgc 120
 gccaggcacc aggaaaggga ctggagtttgc tcgctgaaat ctctggtagt aatactggaa 180
 gccgaacctg gtacgcaccc gccgtgaagg gcagggtac aatttctcg gacaacagta 240
 aaaatactct gtatctgcag atgaactctc tgagggtcga ggatacagca gtgtactatt 300
 30 gtgc当地 aatctacggg gggatttgcg ccgggtggcta ttccctgtgggt gtgggcctga 360
 ttgacgcattt gggacagggg accctggta cagtctcgag 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 gtcgcctgg gccagacagt 60
 gagaatcaact tgcagtggcg gatccagcga ttactatggg tggttccagc agaagcccg 120
 tcaggcccct gtgaccgtca tctactataa caacaagagg ccatctgaca ttccctgatcg 180
 gttttagtggc tctagttcag gaaacacagc ctccctgacc attacagggg cccaggctga 240
 45 ggacgaagct gattactatt gtggcaatgc agactccagc gtgggagtct tcgggtctgg 300
 tactaaaggta accgtccttag g 321
 <210> 85
 <211> 321

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полинуклеотид"
 <400> 85

gcttagcctct tacgagctga ctcagccacc ttccgtgtcc gtgtccccag gacagaccgc	60
aagaatcaca tgcagtggcg gatccagcta ctcatatggg tggttccagc agaagcctgg	120
10 tcaggcccccc gtgacagtca tctatgagag caacaatagg ccttctgaca ttccagaacg	180
gtttagtggc tctagttcag gaaccacagt gactctgacc atcagcgggg tccaggccga	240
ggacgaagct gattactatt gtggcaacgc tgattccagc tctggaattt tcgggtccgg	300
tacaaaagtg 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 gcccacatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac	60
ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac	120
25 ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca	180
gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac	240
ccagacctac atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaagggtgg acaagagagt	300
tggtgagagg ccagcacagg gagggagggt gtctgctgga agccaggctc agcgctcctg	360
cctggacgca tcccggctat gcagtcccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc	420
30 tcttcaccccg gaggcctctg cccgccccac tcatgctcag ggagagggtc ttctggctt	480
ttccccaggc tctgggcagg cacaggctag gtgcccctaa cccaggccct gcacacaaaag	540
gggcaggtgc tgggctcaga cctgccaaga gccatatccg ggaggaccct gcccctgacc	600
taagcccacc ccaaaggcca aactctccac tccctcagct cggacacacctt ctctcctccc	660
agattccagt aactccaat cttctctctg cagagccaa atcttgtacaaaactcaca	720
35 catgcccacc gtgcccaggt aagccagccc aggctcgcc ctccagctca aggcccggaca	780
ggtgccctag agtagcctgc atccaggac aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc	840
tccatctctt cctcagcacc tgaagccgcc gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca	900
aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgcgt ggtggggac	960
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aacttgtacg tggacggcgt ggaggtgcat	1020
40 aatgccaaga caaagccgcg ggaggaggcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc	1080
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcac ggtctccaac	1140
aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtgg gaccctgtgg	1200
gtgcgaggc cacatggaca gaggccggct cggcccaccc tctgcccgtga gagtgaccgc	1260
tgtaccaacc tctgtcccta cagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc	1320
45 atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggta aaggcttcta	1380
tcccagcgc acatcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac	1440
cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttttccctc tatagcaagc tcaccgtgga	1500
caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcacatgcgtcatc gtgtatgcgtagg	1560

caaccactac 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 gcccattcggt ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac 60
 ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac 120
 ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca 180
 gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggcac 240
 15 ccagacctac atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt 300
 tgagccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccc tgcccagcac ctgaagccgc 360
 cgggggaccg tcaagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg 420
 gaccctgtag gtcacatgca tggtgggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt 480
 caactggtagtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca 540
 20 gtacaacacgc acgttaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa 600
 tggcaaggag tacaagtgc aaggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaaac 660
 catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg 720
 ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccg 780
 cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgccc 840
 25 tcccgtgctg gactccgacg gtccttctt cctctatacg aagctcaccg tggacaagag 900
 caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca 960
 ctacacgcag aagagcctct ccctgtcccc gggtaaatga 1000
 <210> 88
 <211> 325
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полинуклеотид"
 35 <400> 88
 cctaggtag cccaaaggcca accccactgt cactctgttc ccgcctcct ctgaggagct 60
 ccaagccaaac aaggccacac tagtgtgtct gatcagtgc ttctacccgg gagctgtgac 120
 agtggcctgg aaggcagatg gcagccccgt caaggcggga gtggagacca ccaaaccctc 180
 40 caaacagac aacaacaagt acgcggccag cagctacccgt agcctgacgc ccgagcgtg 240
 gaagtccccac agaagctaca gctgccaggt cacgcataa gggagcaccg tggagaagac 300
 agtggccct acagaatgtt cataa 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 2750675 C1

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

- а) антитела, V_H которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;
- б) антитела, тяжелая цепь (HC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2 и 67;
- в) антитела, V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3;
- г) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:3 и 68;

30 е) антитела, H-CDR 1-3 и L-CDR 1-3 которого содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO:18-23, соответственно;

- ф) антитела, V_H которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и
- г) 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 в) антитела, V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 или 66;
- г) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:5 или 66 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68;
- ¹⁰ д) антитела, $H\text{-}CDR1\text{-}3$ и $L\text{-}CDR1\text{-}3$ которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:24-29, соответственно;
- е) 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 ж) 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;
- в) антитела, V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID ²⁵ NO:7;
- г) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:7 и 68;
- д) антитела, $H\text{-}CDR1\text{-}3$ и $L\text{-}CDR1\text{-}3$ которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:30-35, соответственно;
- ³⁰ е) антитела, V_H которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; и
- ж) 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;
- в) антитела, V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9;
- г) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:9 и 68;
- ⁴⁵ д) антитела, $H\text{-}CDR1\text{-}3$ и $L\text{-}CDR1\text{-}3$ которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:36-41, соответственно;
- е) антитела, V_H которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID

NO:8, и V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9; и

g) антитела, НС 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_H которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10;

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

в) антитела, V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11;

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

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

е) антитела, V_H которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11;

²⁰ и

ж) антитела, НС 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_H которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12;

б) антитела, тяжелая цепь (НС) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:12 и 67;

³⁰ в) антитела, V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13;

г) антитела, легкая цепь (LC) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:13 и 68;

³⁵ д) антитела, Н-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:48-53, соответственно;

е) антитела, V_H которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, и V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13;

и

⁴⁰ ж) антитела, НС 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_H которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14;

б) антитела, тяжелая цепь (НС) которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:14 и 67;

с) антитела, V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15;
 д) 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;
 ф) антитела, V_H которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, и V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15;

¹⁰ и
 г) 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;

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

²⁰ в) антитела, V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17;

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

²⁵ д) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого включают аминокислотные последовательности SEQ ID NO:60-65, соответственно;

е) антитела, V_H которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, и V_L которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17;

³⁰ и
 ж) 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 вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи со следующими аминокислотными последовательностями:

а) SEQ ID NO:2 и 3, соответственно;

б) SEQ ID NO:4 и 5, соответственно;

в) SEQ ID NO:4 и 66, соответственно;

⁴⁰ г) SEQ ID NO:6 и 7, соответственно;

д) SEQ ID NO:8 и 9, соответственно;

е) SEQ ID NO:10 и 11, соответственно;

ж) SEQ ID NO:12 и 13, соответственно;

з) SEQ ID NO:14 и 15, соответственно; или

и) SEQ ID NO:16 и 17, соответственно.

⁴⁵ 11. Антитело, которое специфически связывается с PD-1, где указанное антитело содержит:

а) 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;

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,

5 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;

10 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,

15 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.

12. Антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело содержит H-CDR1-3 и L-CDR1-3, содержащий 20 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 25 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.

30 15. Антитело по любому из пп.1-10, 12 и 13, где антитело является IgG.

16. Антитело по п.15, где антитело является IgG₁.

17. Антитело по п.15 или 16, где антитело содержит по меньшей мере одну мутацию в F_c-области.

35 18. Антитело по п.17, где:

a) антитело представляет собой IgG₁, и один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 мутированы в Ala, или

b) антитело представляет собой IgG₄, и аминокислотный остаток в положении 228 мутирован в Pro,

40 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:

a) связываются с PD-1 человека с K_D 750 пМ или меньше;

45 b) связываются с PD-1 яванского макака с K_D 7 нМ или меньше;

c) связываются с PD-1 мыши с K_D 1 нМ или меньше;

d) не связываются с PD-1 крысы;

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

f) повышают секрецию IFN-γ в анализе реакции односторонней смешанной культуры лимфоцитов;

g) ингибируют взаимодействие PD-1 с PD-L1 по меньшей мере на 60% при концентрации 10 мкг/мл в проточном-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*.

20. Фармацевтическая композиция для усиления иммунитета у пациента, содержащая

10 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.

25 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.

30 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.

35 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.

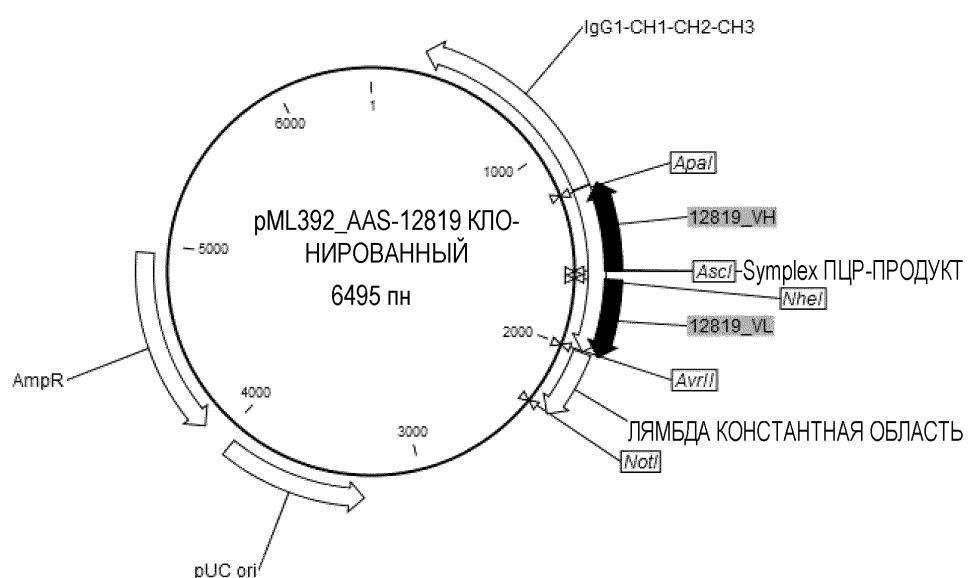
27. Способ лечения рака у пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-19 или фармацевтической композиции по п.20 или 21.

40 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.

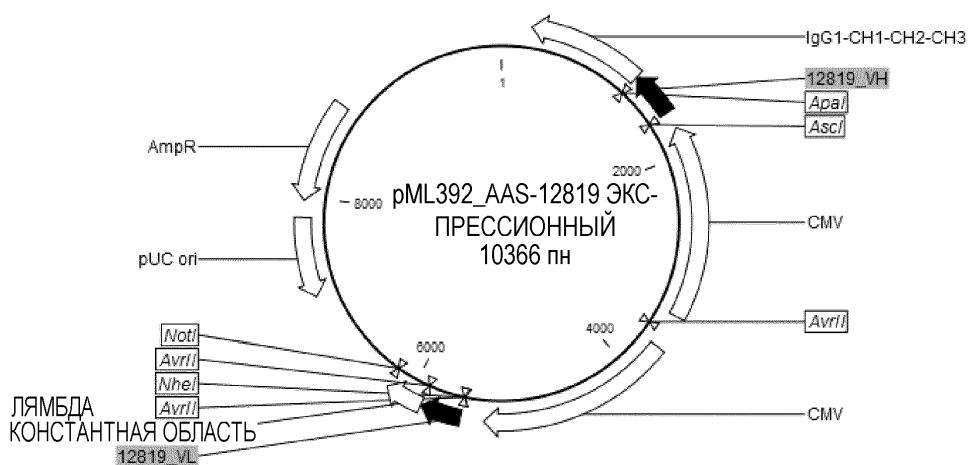
29. Способ по п.27, где рак выбран из группы, состоящей из прогрессирующей или метастатической меланомы, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака головы и шеи, почечно-клеточной карциномы или лимфомы Ходжкина.

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.

1/20

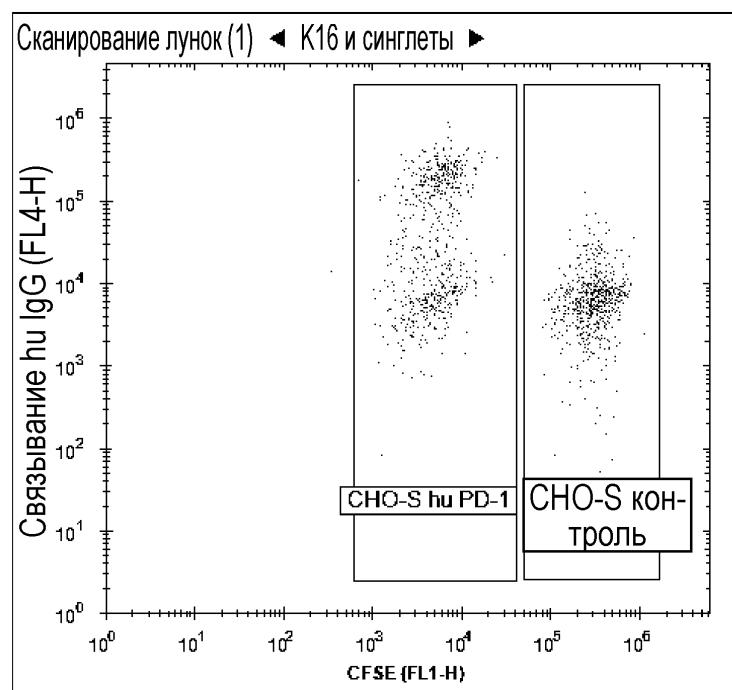


ФИГ. 1

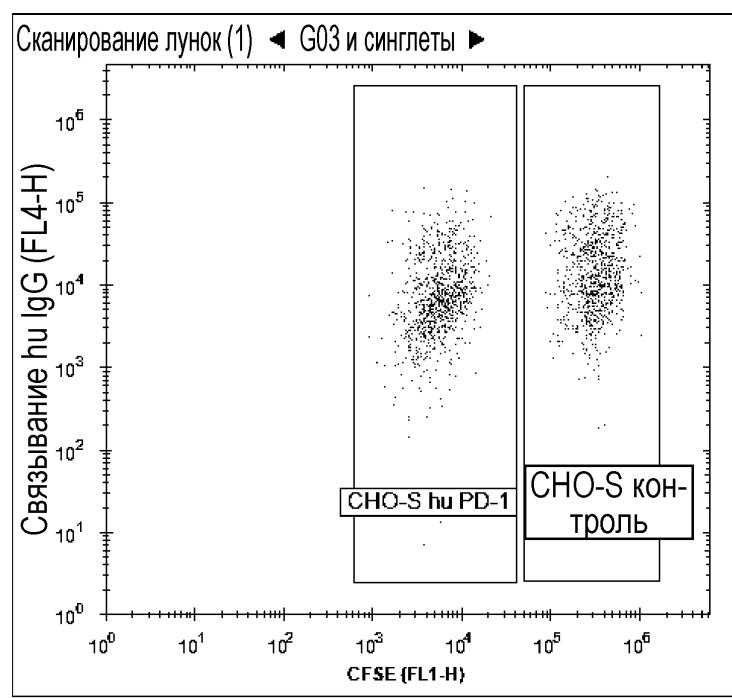


ФИГ. 2

2/20

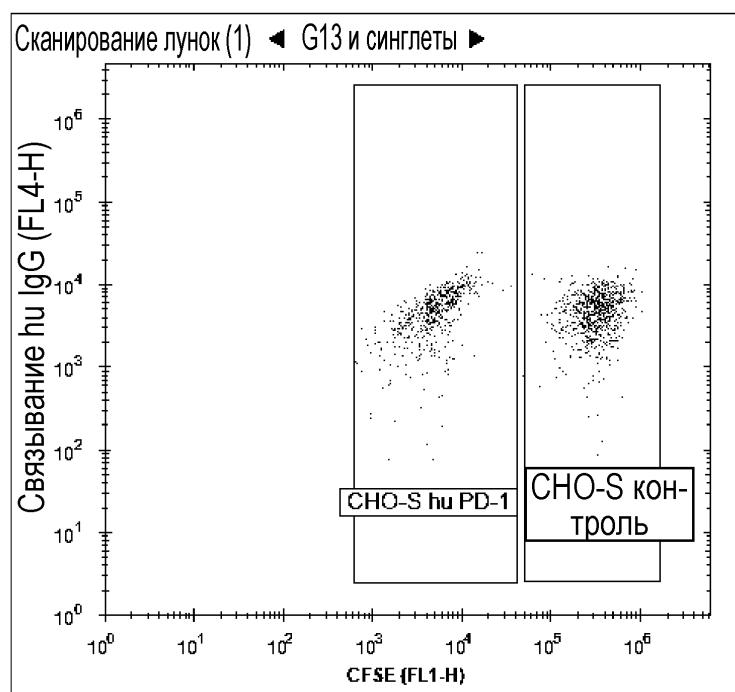


ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

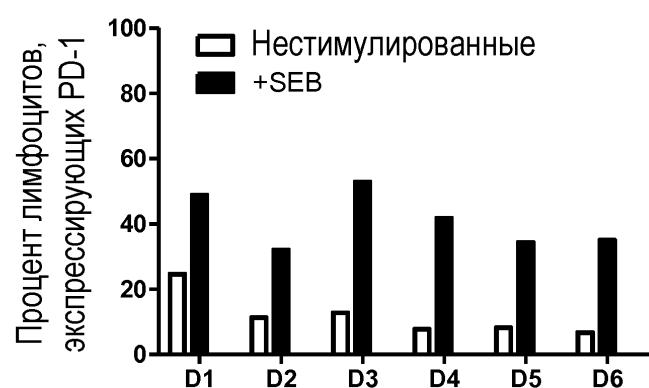
3/20



ФИГ. 3С

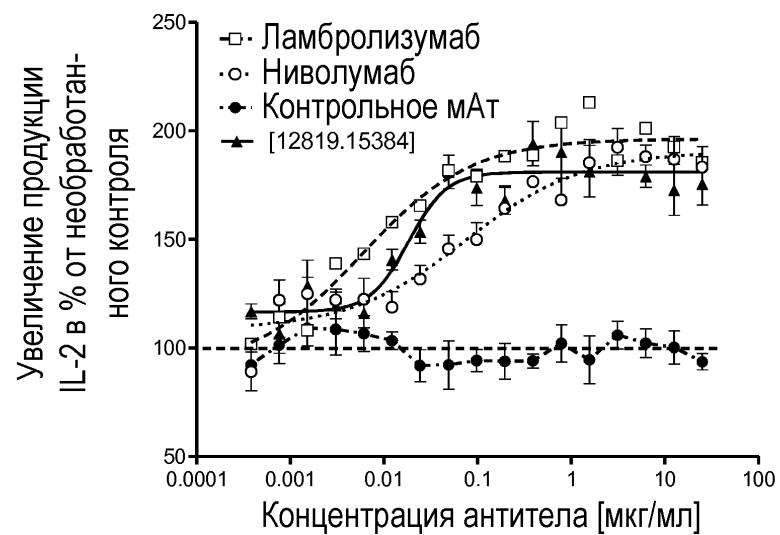
4/20

ФИГ. 4

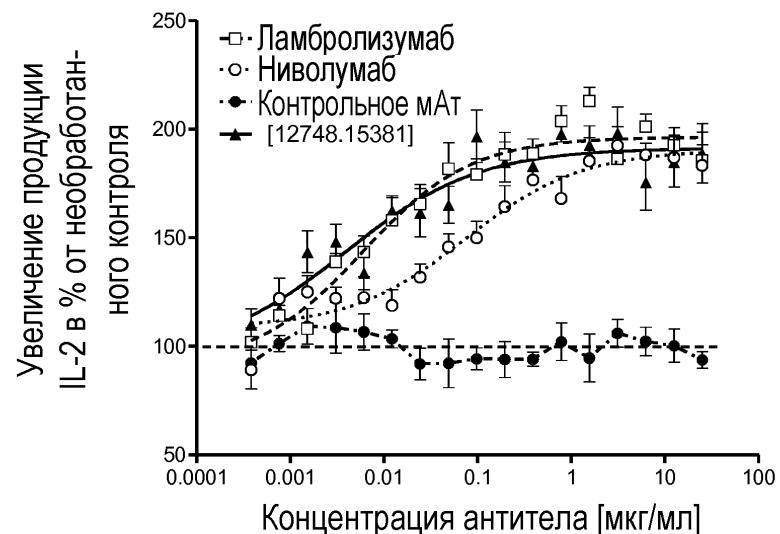


5/20

ФИГ. 5А

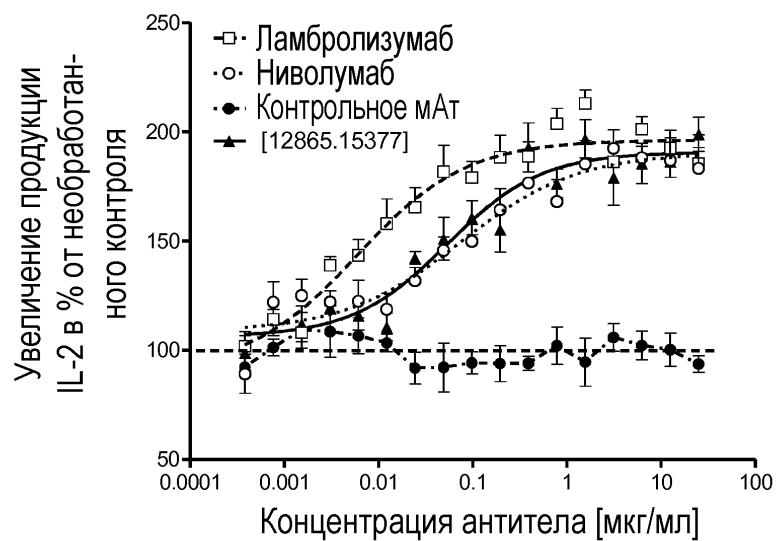


ФИГ. 5В

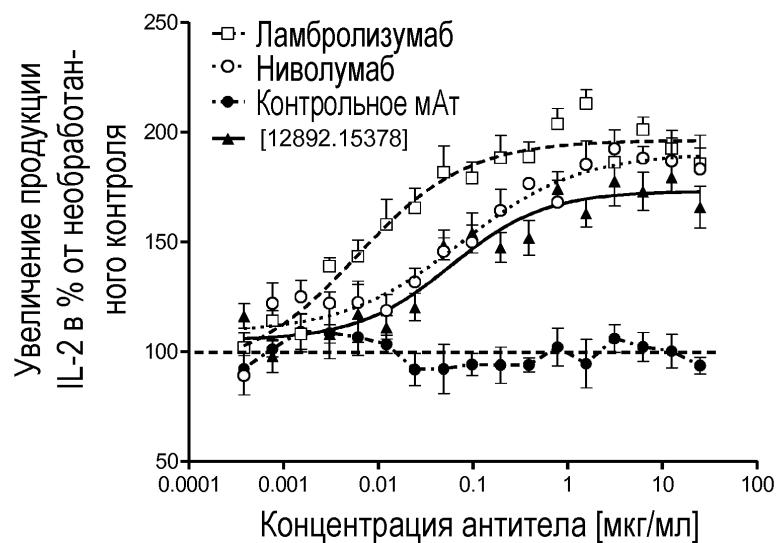


6/20

ФИГ. 5С

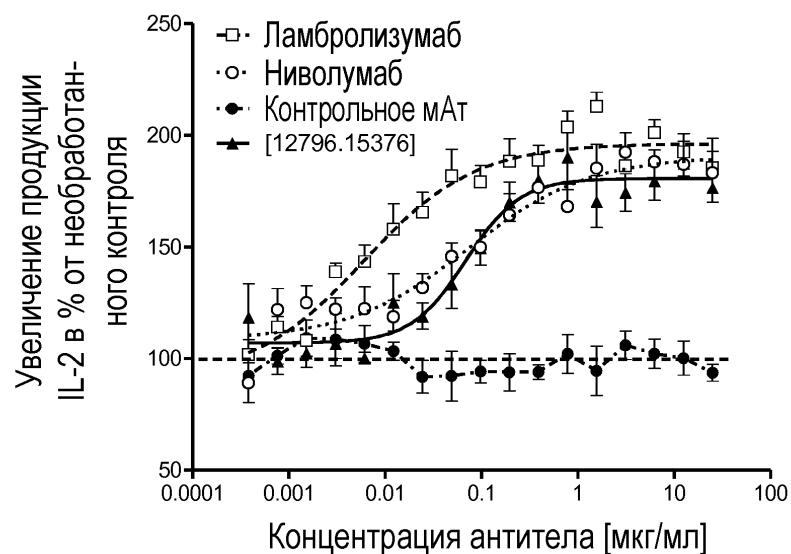


ФИГ. 5Д

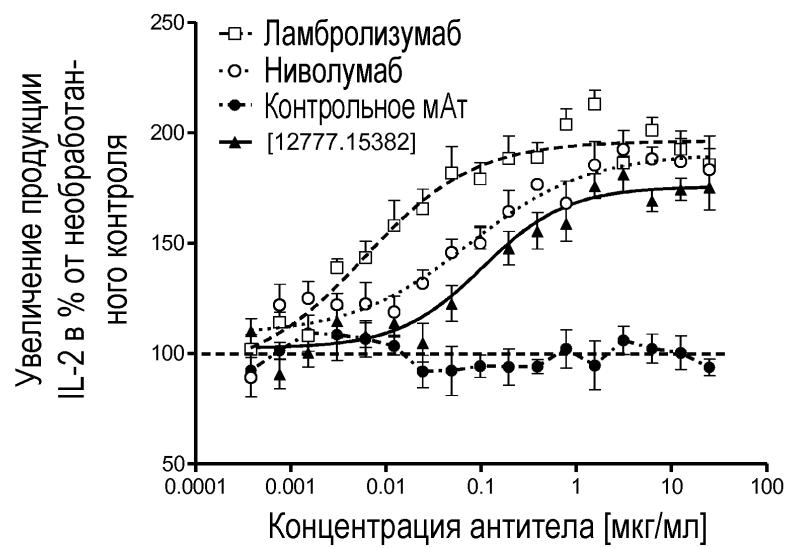


7/20

ФИГ. 5Е

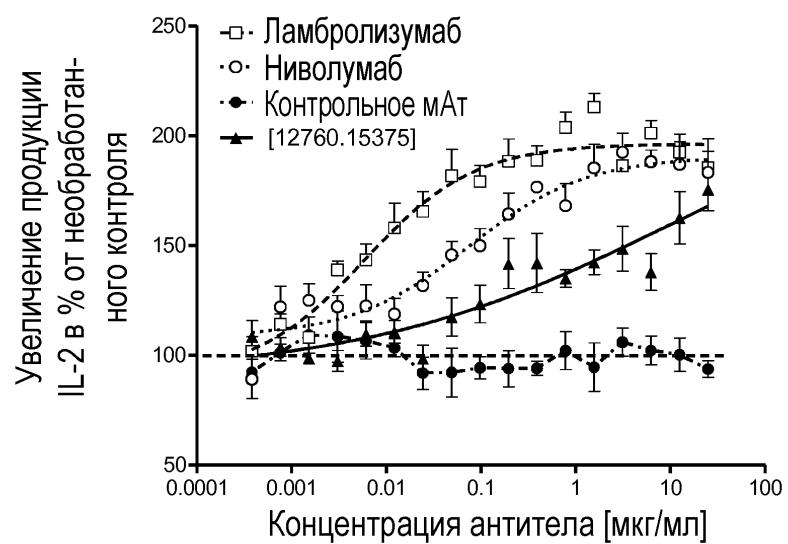


ФИГ. 5F

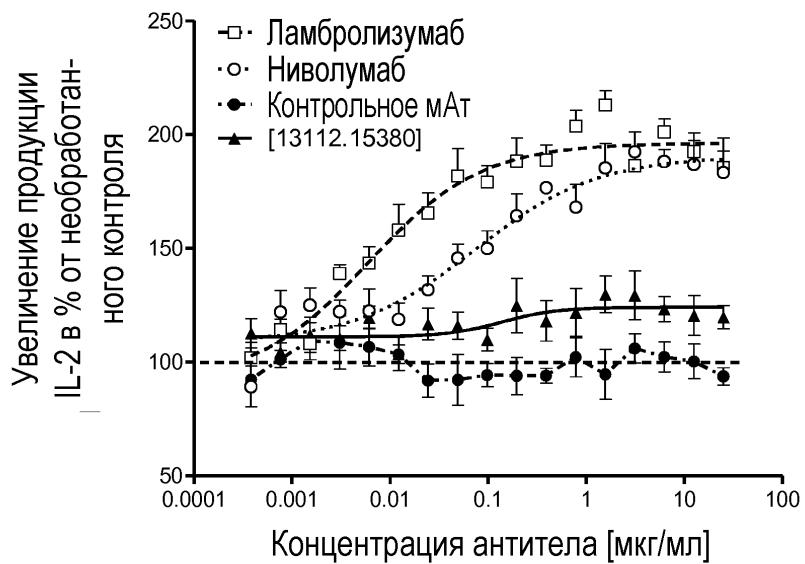


8/20

ФИГ. 5Г

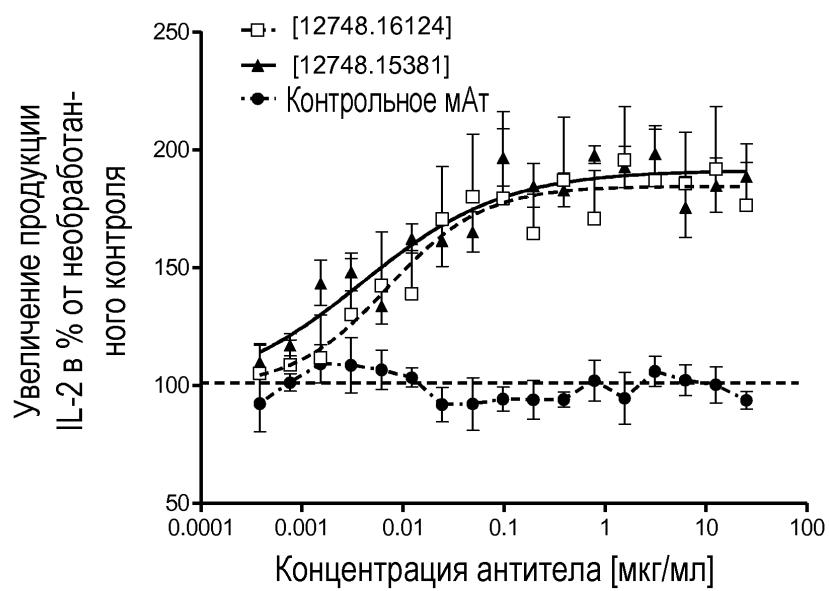


ФИГ. 5Н



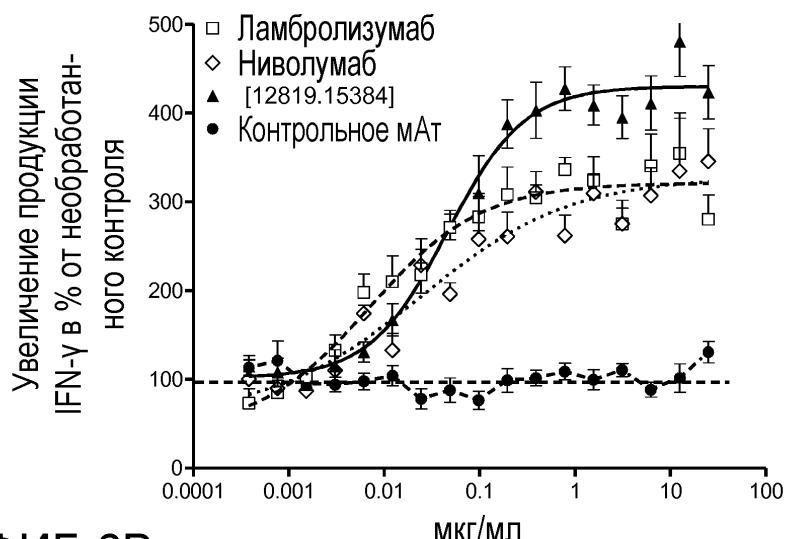
9/20

ФИГ. 5I

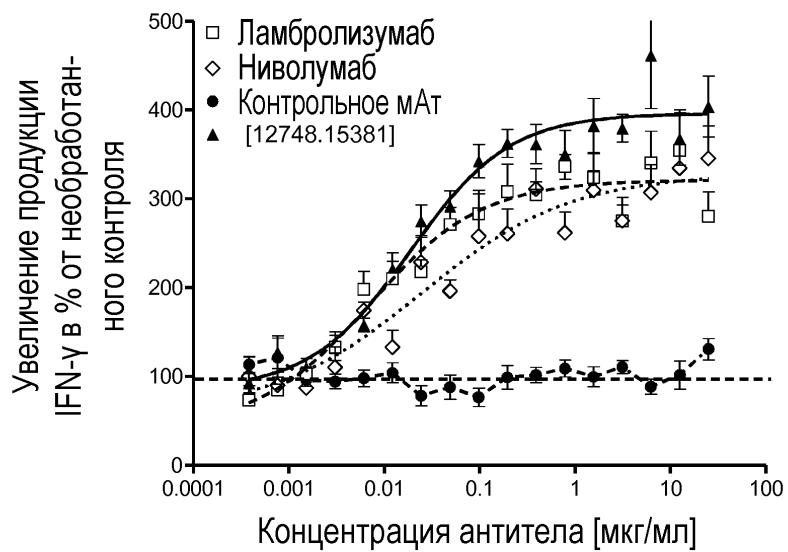


10/20

ФИГ. 6А

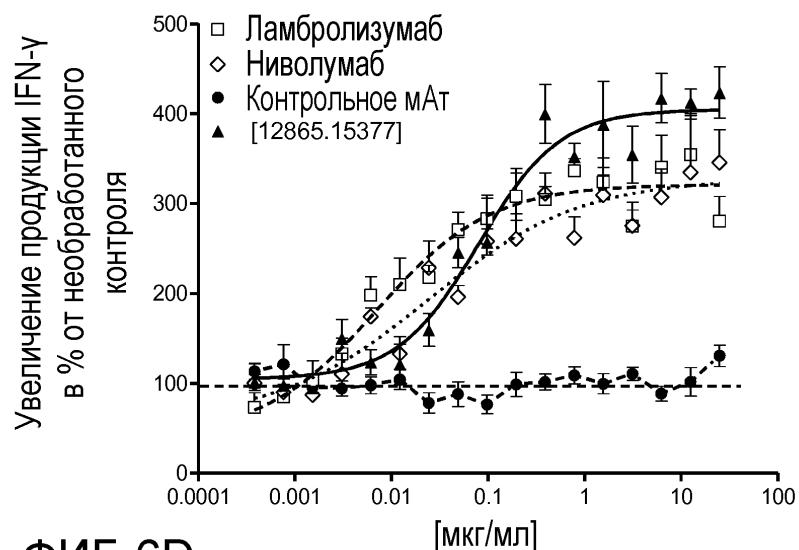


ФИГ. 6В

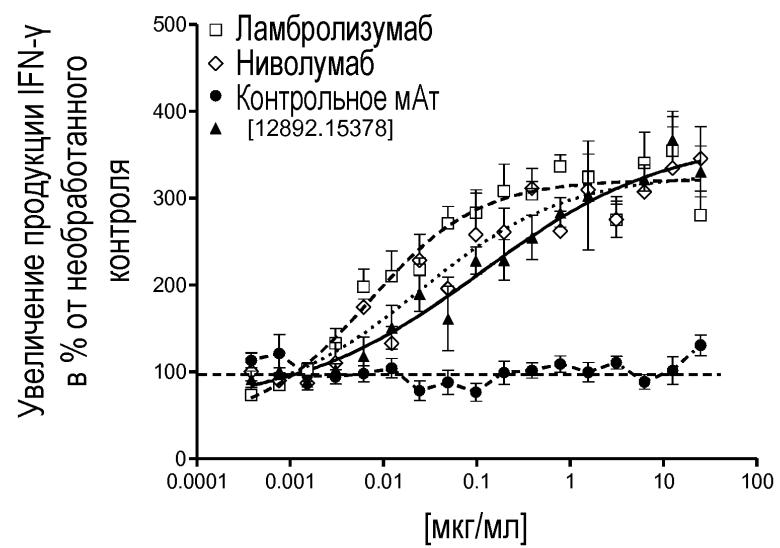


11/20

ФИГ. 6С

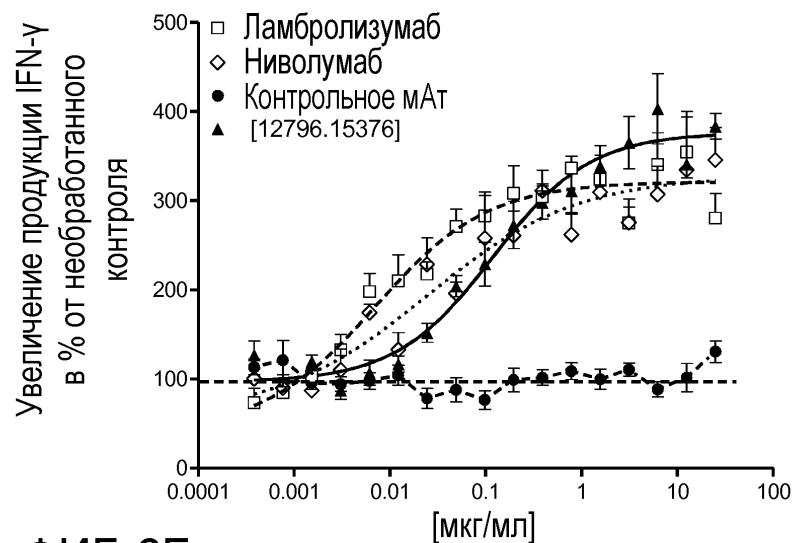


ФИГ. 6Д

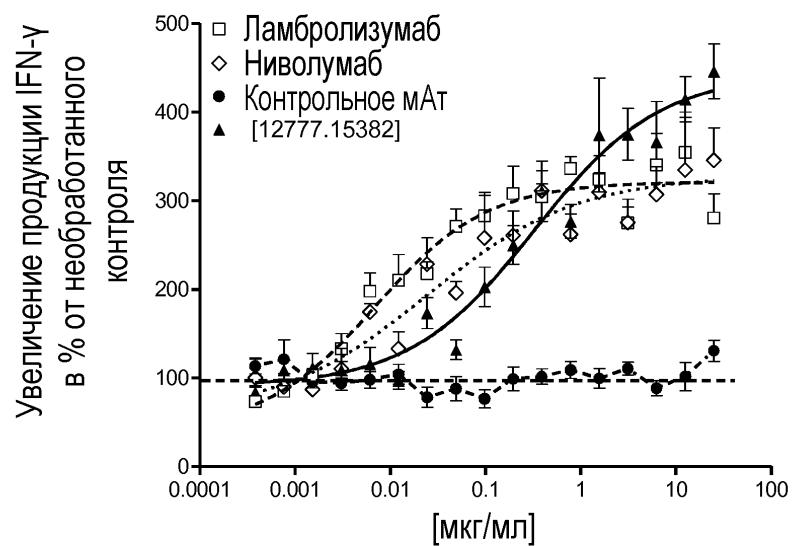


12/20

ФИГ. 6Е

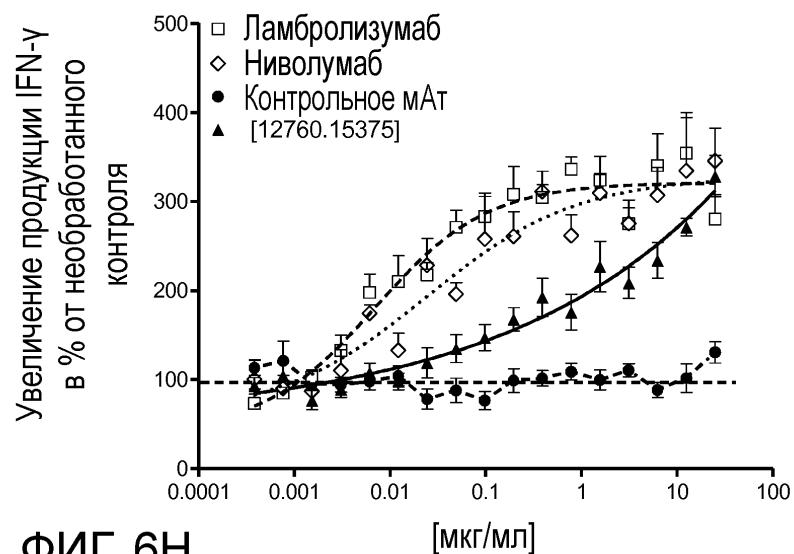


ФИГ. 6F

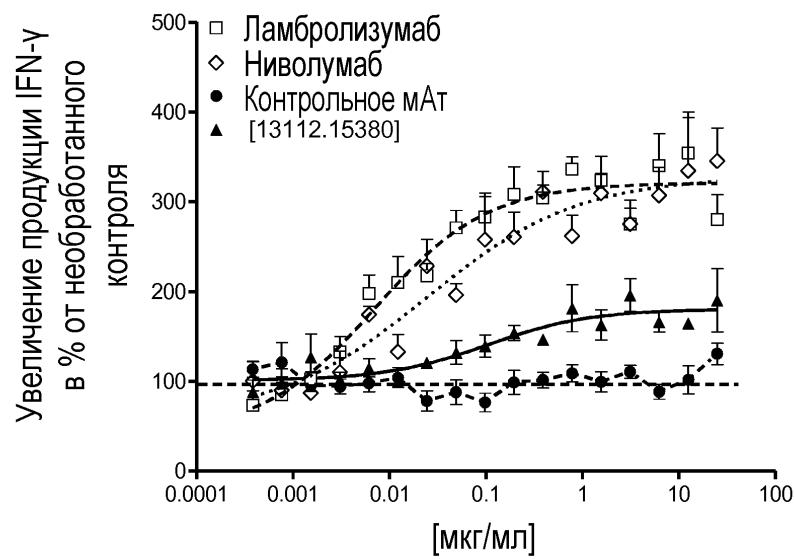


13/20

ФИГ. 6Г

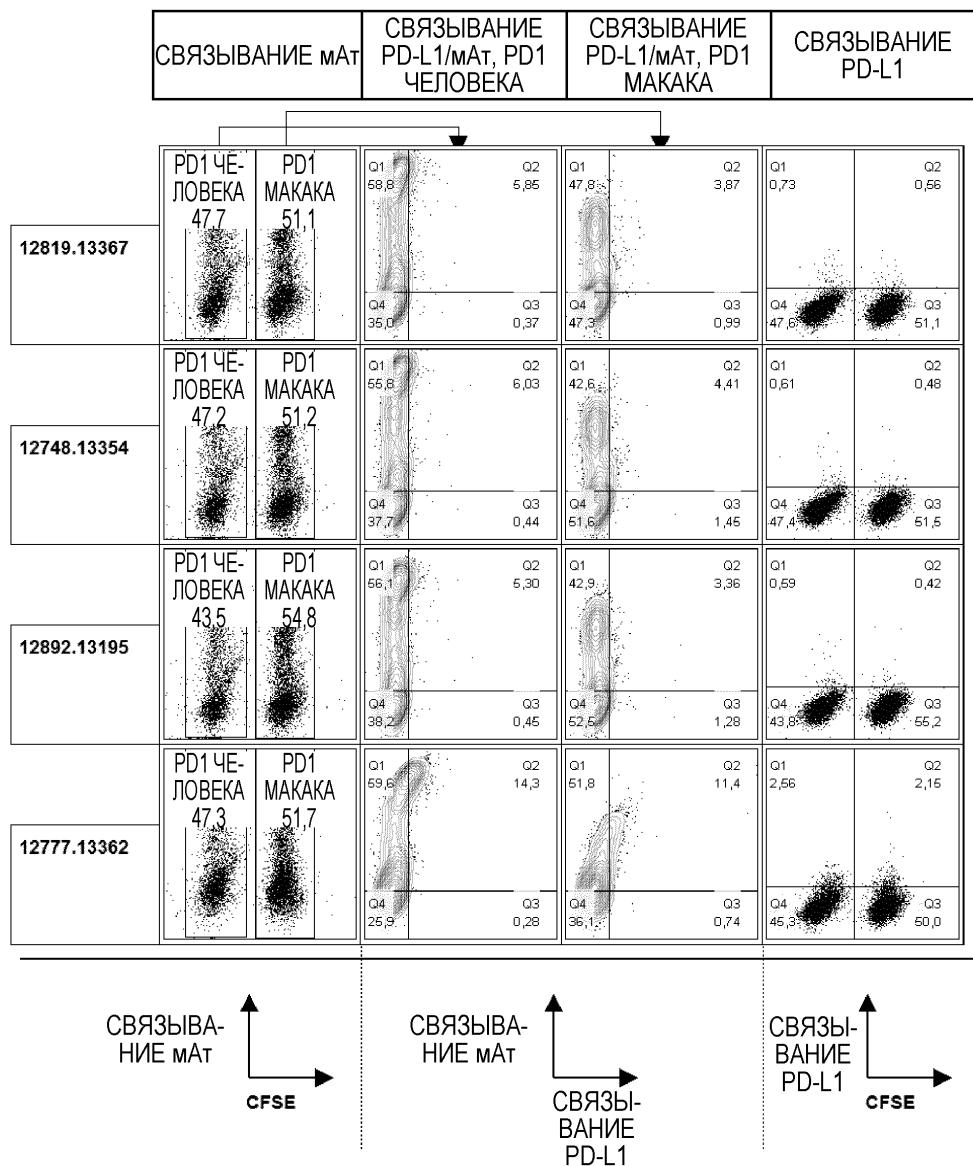


ФИГ. 6Н



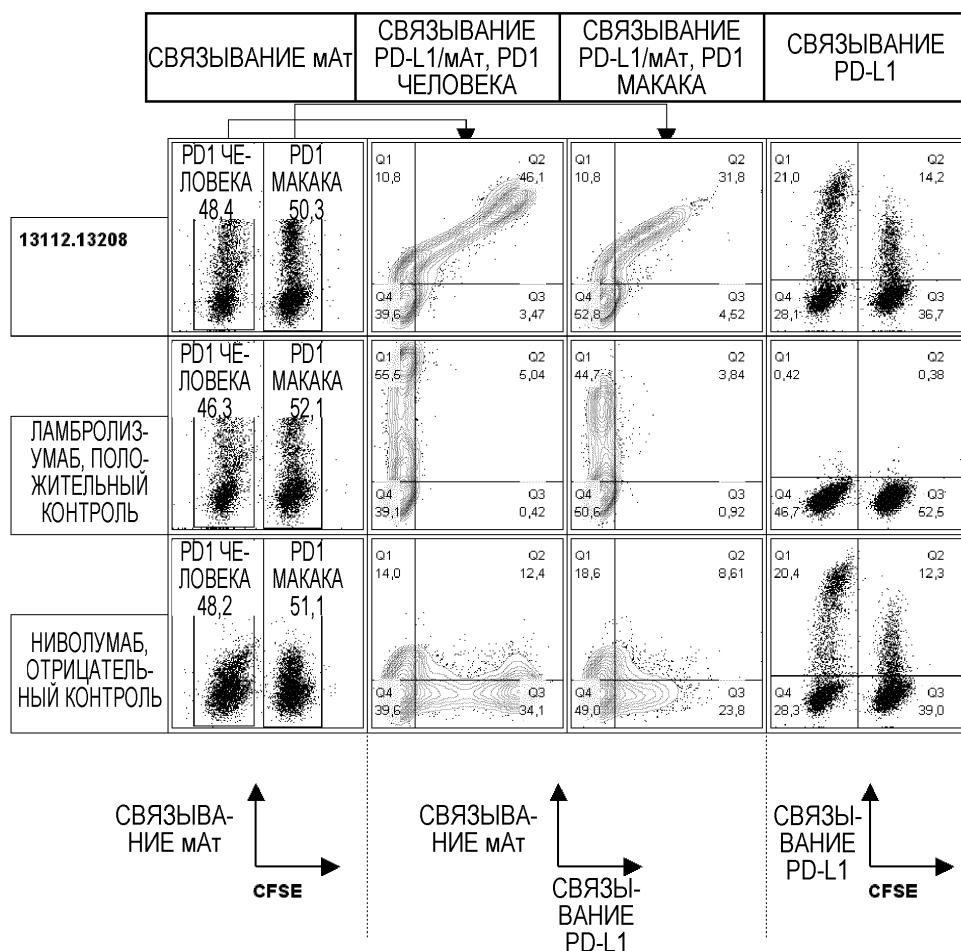
14/20

ФИГ. 7А



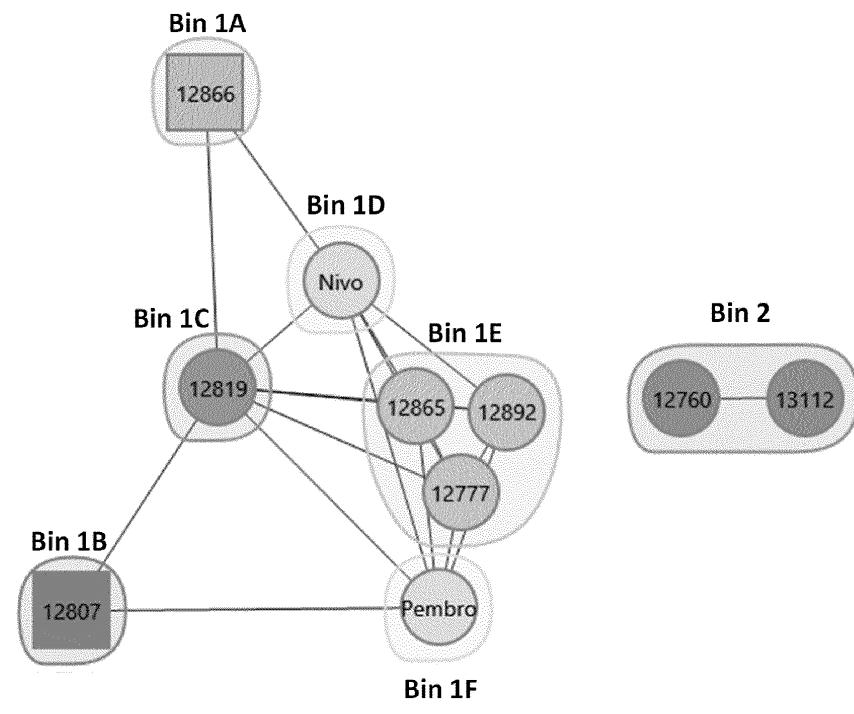
15/20

ФИГ. 7В



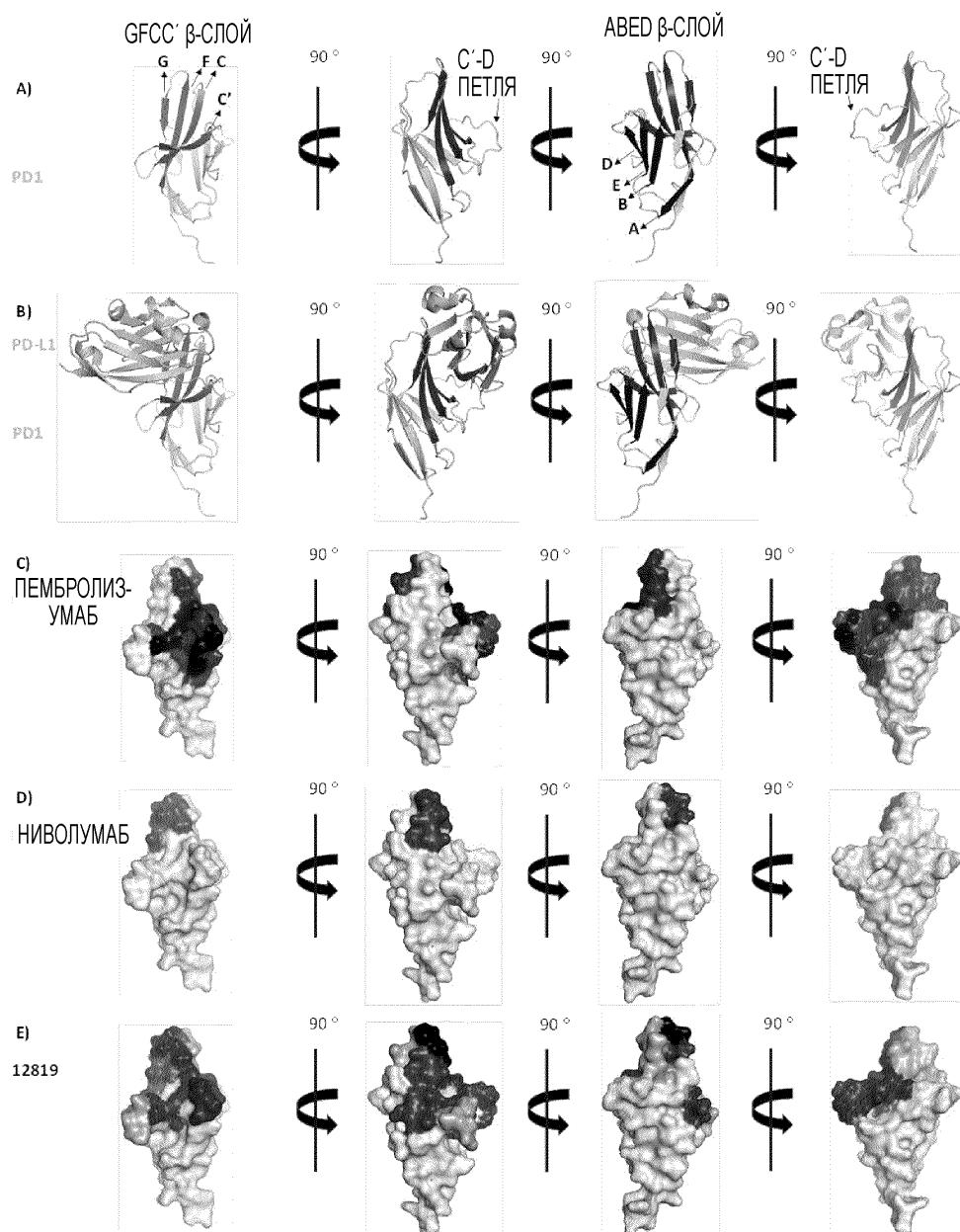
16/20

ФИГ. 8



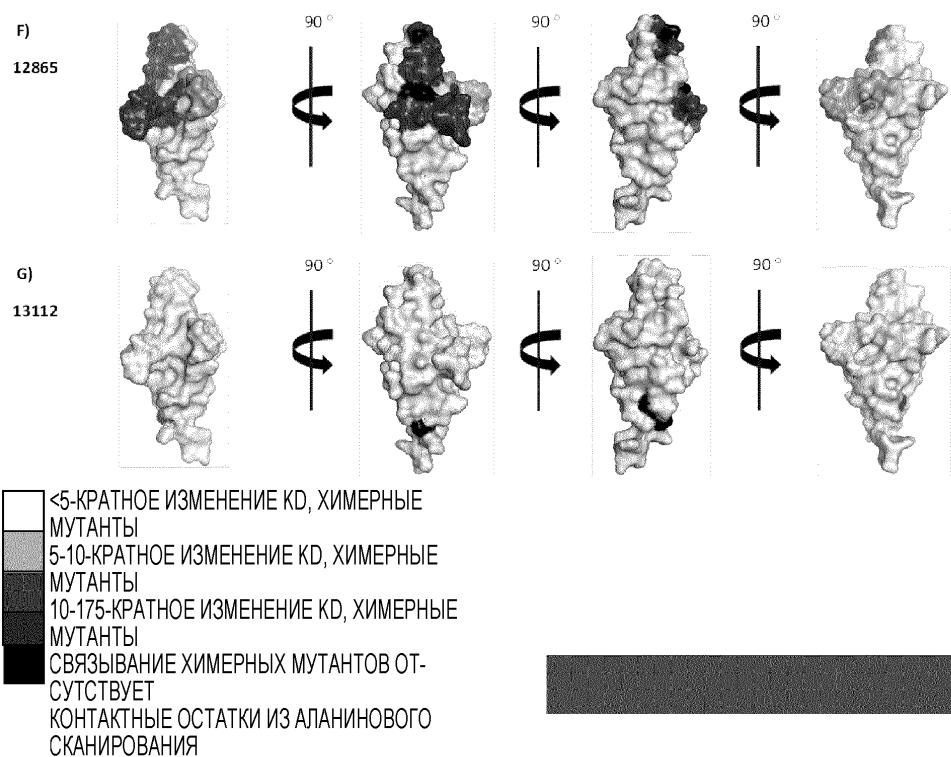
17/20

ФИГ. 9



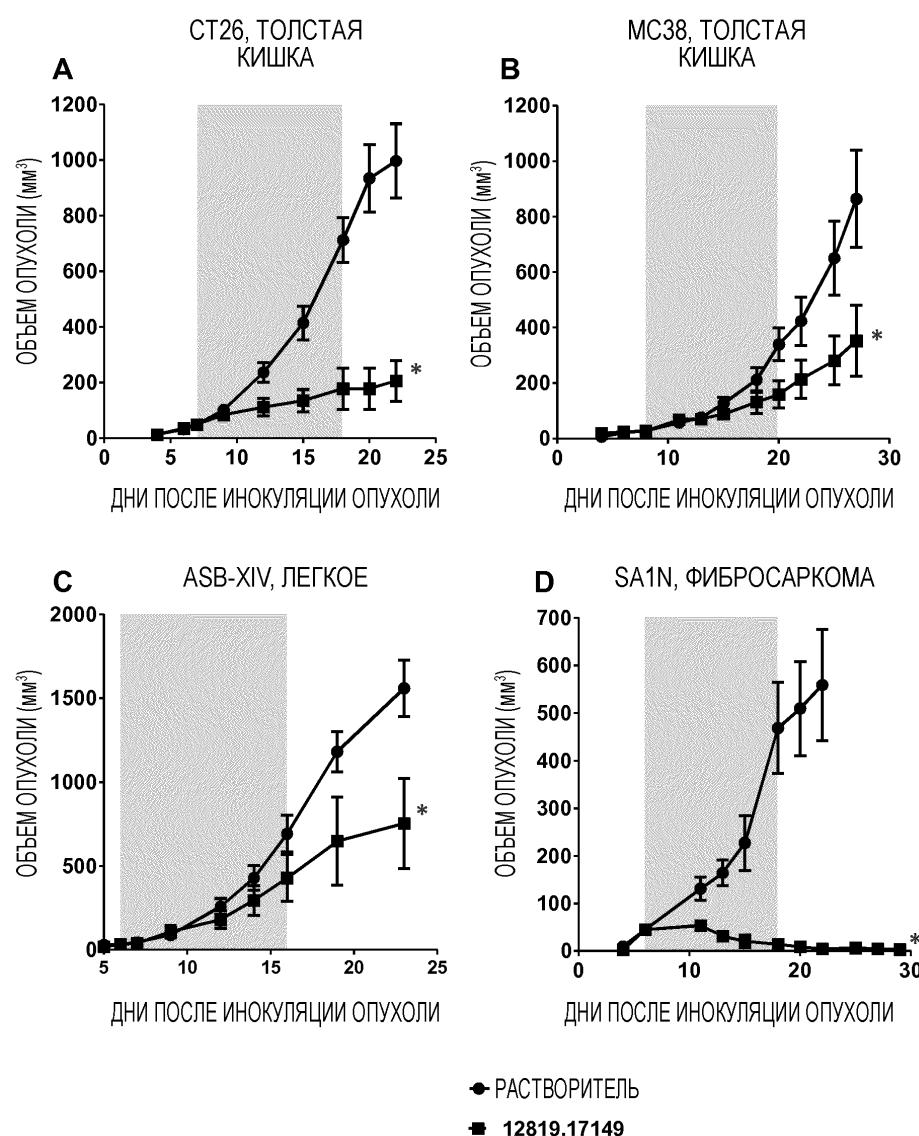
18/20

ФИГ. 9 (продол.)



19/20

ФИГ. 10



20/20

ФИГ. 11

Котрансплантат A375 (меланома человека) с
CD4+/CD8+ Т-клетками

