



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2018.08.31(22) Дата подачи заявки  
2016.07.28(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
C07K 16/00 (2006.01)

## (54) PD-1-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/198,867; 62/239,559; 62/255,140;  
62/322,974(32) 2015.07.30; 2015.10.09; 2015.11.13;  
2016.04.15

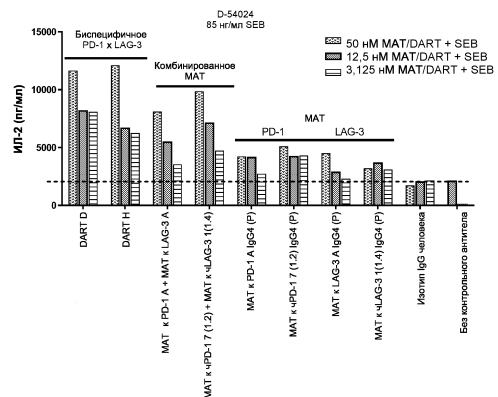
(33) US

(86) PCT/US2016/044430

(87) WO 2017/019846 2017.02.02

(71) Заявитель:  
МАКРОДЖЕНИКС, ИНК. (US)(72) Изобретатель:  
Шах Калпана, Смит Дуглас Х., Ла  
Мотте-Мос Росс, Джонсон Лесли С.,  
Мур Пол А., Бонвини Эцио, Кёниг  
Скотт (US)(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к отобраным анти-PD-1 антителам, способным связываться как с PD-1 яванских макаков, так и с PD-1 человека: MAT 1 к PD-1, MAT 2 к PD-1, MAT 3 к PD-1, MAT 4 к PD-1, MAT 5 к PD-1, MAT 6 к PD-1, MAT 7 к PD-1, MAT 8 к PD-1, MAT 9 к PD-1, MAT 10 к PD-1, MAT 11 к PD-1, MAT 12 к PD-1, MAT 13 к PD-1, MAT 14 к PD-1 или MAT 15 к PD-1, а также гуманизированным и химерным вариантам указанных антител. Также изобретение относится к PD-1-связывающим молекулам, которые содержат PD-1-связывающие фрагменты указанных анти-PD-1 антител, иммуноконъюгатам и биспецифическим молекулам, включая диатела, ViTE, биспецифические антитела и т.д., которые содержат (i) такие PD-1-связывающие фрагменты и (ii) домен, способный связываться с эпитопом молекулы, участвующей в регуляции контрольной точки иммунного ответа, присутствующей на поверхности иммунных клеток. Настоящее изобретение также относится к способам применения молекул, которые связываются с PD-1, для стимуляции иммунных ответов, а также к способам детектирования PD-1.



## **PD-1-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно заявке на патент США №62/198867 (поданной 30 июля 2015 г.; заявка в стадии рассмотрения), 62/239559 (поданной 9 октября 2015 г.; заявка в стадии рассмотрения), 62/255140 (поданной 13 ноября, 2015 г.; заявка в стадии рассмотрения) и 62/322974 (поданной 15 апреля 2016 г.; заявка в стадии рассмотрения), содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

### **Ссылка на перечень последовательностей**

[002] Настоящая заявка включает один или более перечней последовательностей в соответствии с параграфом 1.821 раздела 37 Свода федеральных правил США и далее, которые раскрыты на машиночитаемых носителях (файл озаглавлен: 1301\_0122PCT\_Sequence\_Listing\_ST25.txt, создан 1 июля 2016 года и имеет размер 282789 байт), указанный файл полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки.

### **Область техники**

[003] Настоящее изобретение относится к PD-1-связывающим молекулам, которые содержат PD-1-связывающий домен из отобранных антител к PD-1, способных связываться с PD-1 яванских макак и PD-1 человека: моноклонального антитела 1 (MAT 1) к PD-1, MAT 2 к PD-1, MAT 3 к PD-1, MAT 4 к PD-1, MAT 5 к PD-1, MAT 6 к PD-1, MAT 7 к PD-1, MAT 8 к PD-1, MAT 9 к PD-1, MAT 10 к PD-1, MAT 11 к PD-1, MAT 12 к PD-1, MAT 13 к PD-1, MAT 14 к PD-1 или MAT 15 к PD-1. В частности, согласно настоящему изобретению предложены PD-1-связывающие молекулы, которые представляют собой гуманизированные или химерные варианты указанных антител или содержат PD-1-связывающие фрагменты указанных антител к PD-1 (в частности, иммуноконъюгаты, диатела, ViTE, биспецифические антитела и т. д.). В частности согласно настоящему изобретению предложены PD-1-связывающие молекулы, которые дополнительно способны связываться с эпитопом молекулы, участвующей в регуляции контрольной точки иммунного ответа, которая присутствует на поверхности иммунной клетки. Согласно настоящему изобретению также предложены способы применения указанных PD-1-связывающих молекул для детектирования PD-1 или для стимуляции иммунного ответа. Согласно настоящему изобретению также предложены способы комбинированной терапии, в которых PD-1-связывающую молекулу, которая содержит

один или более PD-1-связывающих доменов указанных отобранных антител к PD-1, вводят в комбинации с одной или более дополнительными молекулами, которые эффективно стимулируют иммунный ответ, и/или в комбинации с одной или более дополнительными молекулами, которые специфично связываются с раковым антигеном.

## Уровень техники

### I Иммуные ответы, опосредуемые клетками

[004] Иммунная система человека и других млекопитающих обеспечивает защиту от инфекций и заболеваний. Такая защита обеспечивается как гуморальным иммунным ответом, так и иммунным ответом, опосредуемым клетками. Гуморальный ответ приводит к выработке антител и других биологических молекул, которые способны распознать и нейтрализовать чужеродные мишени (антигены). Напротив, опосредуемый клетками иммунный ответ включает активацию Т-клетками макрофагов, природных клеток-киллеров (NK) и антигенспецифичных цитотоксических Т-лимфоцитов, а также высвобождение различных цитокинов в ответ на распознавание антигена (Dong, C. *et al.* (2003) «*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*», *Immunolog. Res.* 28(1):39-48).

[005] Способность Т-клеток оптимально опосредовать иммунный ответ на антиген требует двух различных сигнальных взаимодействий (Viglietta, V. *et al.* (2007) «*Modulating Co-Stimulation*», *Neurotherapeutics* 4:666-675; Korman, A.J. *et al.* (2007) «*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*», *Adv. Immunol.* 90:297-339). Во-первых, антиген, который был расположен на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК), должен быть презентован антигенспецифичным наивным CD4<sup>+</sup> Т-клеткам. Процесс презентации включает передачу сигнала посредством Т-клеточного рецептора (TCR), управляющего Т-клеткой для инициирования иммунного ответа, который будет специфичным в отношении презентованного антигена. Во-вторых, ряд костимулирующих и ингибирующих сигналов, опосредуемых взаимодействиями между АПК и различными поверхностными молекулами Т-клеток, запускает сначала активацию и пролиферацию Т-клеток и, в конечном итоге, их ингибирование. Следовательно, первый сигнал придает специфичность иммунному ответу, тогда как второй сигнал служит для определения характера, величины и продолжительности ответа.

[006] Иммунная система тщательно контролируется костимулирующими и коингибирующими лигандами и рецепторами. Упомянутые молекулы обеспечивают второй сигнал для активации Т-клеток и обеспечивают сбалансированный комплекс положительных и отрицательных сигналов, чтобы максимально увеличить иммунные ответы на инфекцию, при этом сводя к минимуму аутоиммунные ответы (Wang, L. *et al.*

(March 7, 2011) «*VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses*», J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. *et al.* (2008) «*The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections*», Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288). Особое значение имеет связывание лигандов В7.1 (CD80) и В7.2 (CD86) антигенпрезентирующей клетки, а также CD28 и рецепторов CTLA-4 CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцита (Sharpe, A.H. *et al.* (2002) «*The B7-CD28 Superfamily*», Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Dong, C. *et al.* (2003) «*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*», Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. *et al.* (2009) «*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*», Immunol. Rev. 229:307-321). Связывание В7.1 или В7.2 с CD28 стимулирует активацию Т-клеток; связывание В7.1 или В7.2 с CTLA-4 ингибирует такую активацию (Dong, C. *et al.* (2003) «*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*», Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. *et al.* (2009) «*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*», Immunol. Rev. 229:307-321; Greenwald, R.J. *et al.* (2005) «*The B7 Family Revisited*», Ann. Rev. Immunol. 23:515-548). CD28 конститутивно экспрессируется на поверхности Т-клеток (Gross, J., *et al.* (1992) «*Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse*», J. Immunol. 149:380–388), тогда как экспрессия CTLA-4 быстро усиливается после активации Т-клеток (Linsley, P. *et al.* (1996) «*Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement*», Immunity 4:535–543). Поскольку CTLA-4 является более высокоаффинным рецептором (Sharpe, A.H. *et al.* (2002) «*The B7-CD28 Superfamily*», Nature Rev. Immunol. 2:116-126), связывание сначала инициирует пролиферацию Т-клеток (посредством CD28) и затем ингибирует его (посредством развивающейся экспрессии CTLA-4), ослабляя тем самым эффект, если пролиферация больше не требуется.

[007] Дальнейшие исследования лигандов рецептора CD28 привели к идентификации и описанию набора родственных молекул В7 («суперсемейство В7») (Coyle, A.J. *et al.* (2001) «*The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T-Cell Function*», Nature Immunol. 2(3):203-209; Sharpe, A.H. *et al.* (2002) «*The B7-CD28 Superfamily*», Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Greenwald, R.J. *et al.* (2005) «*The B7 Family Revisited*», Ann. Rev. Immunol. 23:515-548; Collins, M. *et al.* (2005) «*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*», Genome Biol. 6:223.1-223.7; Loke, P. *et al.* (2004) «*Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells*». Arthritis Res. Ther. 6:208-214; Korman, A.J. *et al.* (2007) «*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*», Adv. Immunol. 90:297-339; Flies, D.B. *et al.* (2007) «*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity*», J. Immunother. 30(3):251-260; Agarwal, A. *et al.* (2008) «*The*



*Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance*», Curr. Opin. Organ Transplant. 13:366-372; Lenschow, D.J. *et al.* (1996) «*CD28/B7 System of T-Cell Costimulation*», Ann. Rev. Immunol. 14:233-258; Wang, S. *et al.* (2004) «*Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses*», Microbes Infect. 6:759-766). В настоящее время существует несколько известных членов семейства: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), индуцируемый костимулирующий лиганд (ICOS-L), лиганд программируемой смерти-1 (PD-L1; B7-H1), лиганд программируемой смерти-2 (PD-L2, B7-DC), B7-H3, B7-H4 и B7-H6 (Collins, M. *et al.* (2005) «*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*», Genome Biol. 6:223.1-223.7; Flajnik, M.F. *et al.* (2012) «*Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC*», Immunogenetics epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2).

## **II Белок программируемой смерти-1 («PD-1»)**

[008] Белок программируемой смерти-1 («PD-1», также известный как «CD279») представляет собой мембранный белок типа I массой 31 кДа, являющийся членом расширенного семейства регуляторов T-клеток CD28/CTLA-4, который в целом отрицательно регулирует иммунные ответы (Ishida, Y. *et al.* (1992) «*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*», EMBO J. 11:3887-3895; публикация заявки на патент США №2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667, патенты США №№6808710, 7101500, 7488802, 7635757, 7722868, РСТ публикация WO 01/14557).

[009] PD-1 экспрессируется на активированных T-клетках, B-клетках и моноцитах (Agata, Y. *et al.* (1996) «*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes*», Int. Immunol. 8(5):765-772; Yamazaki, T. *et al.* (2002) «*Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC*», J. Immunol. 169:5538-5545) и с низкими уровнями на природных киллерных T-клетках (NK-клетках) (Nishimura, H. *et al.* (2000) «*Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice*», J. Exp. Med. 191:891-898; Martin-Orozco, N. *et al.* (2007) «*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*», Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298).

[0010] Внеклеточная область PD-1 состоит из одного переменного домена (V) иммуноглобулина (Ig), который на 23% идентичен эквивалентному домену в CTLA-4 (Martin-Orozco, N. *et al.* (2007) «*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*», Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298). После внеклеточного переменного домена Ig расположена трансмембранная область и внутриклеточный хвост. Внутриклеточный хвост содержит два сайта фосфорилирования, расположенных в иммунорецепторном тирозинном

ингибирующем мотиве и иммунорецепторном тирозиновом переключающем мотиве, это свидетельствует о том, что PD-1 отрицательно регулирует сигналы TCR (Ishida, Y. *et al.* (1992) «*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*», *EMBO J.* 11:3887-3895; Blank, C. *et al.* (2006) «*Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer*», *Immunol. Immunother.* 56(5):739-745).

[0011] PD-1 ингибирует иммунную систему путем связывания с B7-H1 и B7-DC (Flies, D.B. *et al.* (2007) «*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity*», *J. Immunother.* 30(3):251-260; патенты США №№6803192, 7794710, публикации заявок на патент США №№2005/0059051, 2009/0055944, 2009/0274666, 2009/0313687, PCT публикация WO 01/39722, WO 02/086083).

[0012] B7-H1 и B7-DC широко экспрессируются на поверхностях тканей человека и мыши, таких как сердце, плацента, мышцы, фетальная печень, селезенка, лимфатические узлы и тимус, а также печень, легкие, почки, клетки островков поджелудочной железы и тонкого кишечника мыши (Martin-Orozco, N. *et al.* (2007) «*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*», *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). У человека экспрессия белка B7-H1 была обнаружена в клетках эндотелия человека (Chen, Y. *et al.* (2005) «*Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells*», *Nephron. Exp. Nephrol.* 102:e81-e92; de Haij, S. *et al.* (2005) «*Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1*» *Kidney Int.* 68:2091-2102; Mazanet, M.M. *et al.* (2002) «*B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis*», *J. Immunol.* 169:3581-3588), миокарде (Brown, J.A. *et al.* (2003) «*Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production*», *J. Immunol.* 170:1257-1266), синцитиотрофобластах (Petroff, M.G. *et al.* (2002) «*B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface*», *Placenta* 23:S95-S101). Молекулы также экспрессируются резидентными макрофагами некоторых тканей, макрофагами, которые были активированы интерфероном (ИФН)- $\gamma$  или фактором некроза опухоли (ФНО)- $\alpha$  (Latchman, Y. *et al.* (2001) «*PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation*», *Nat. Immunol* 2:261-268), и в опухолях (Dong, H. (2003) «*B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity*», *J. Mol. Med.* 81:281-287).

[0013] Было обнаружено, что взаимодействие B7-H1 и PD-1 посылает существенный отрицательный костимулирующий сигнал Т- и В-клеткам (Martin-Orozco, N. *et al.* (2007) «*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*», *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298) и выполняет функцию индуктора гибели клеток (Ishida, Y. *et al.* (1992) «*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell*

*Death*», EMBO J. 11:3887-3895; Subudhi, S.K. *et al.* (2005) «*The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition*», J. Molec. Med. 83:193-202). Более конкретно, было обнаружено, что взаимодействие рецептора PD-1 в низких концентрациях и лиганда B7-H1 приводит к передаче ингибирующего сигнала, который сильно ингибирует пролиферацию антигенспецифичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток; при более высоких концентрациях взаимодействия с PD-1 не ингибируют пролиферацию Т-клеток, а значительно снижают выработку многих цитокинов (Sharpe, A.H. *et al.* (2002) «*The B7-CD28 Superfamily*», Nature Rev. Immunol. 2:116-126). Было обнаружено, что пролиферация Т-клеток и выработка цитокинов под действием покоящихся и ранее активированных CD4 и CD8 Т-клеток, и даже наивных Т-клеток из пуповинной крови, ингибируется растворимыми гибридными белками B7-H1-Fc (Freeman, G.J. *et al.* (2000) «*Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation*», J. Exp. Med. 192:1-9; Latchman, Y. *et al.* (2001) «*PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation*», Nature Immunol. 2:261-268; Carter, L. *et al.* (2002) «*PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2*», Eur. J. Immunol. 32(3):634-643; Sharpe, A.H. *et al.* (2002) «*The B7-CD28 Superfamily*», Nature Rev. Immunol. 2:116-126).

[0014] Роль B7-H1 и PD-1 в ингибировании активации и пролиферации Т-клеток позволяет предположить, что указанные биологические молекулы могут служить терапевтическими мишенями для лечения воспаления и рака. В этой связи было предложено применение антител к PD-1 для лечения инфекций и опухолей, а также активирующей модуляции адаптивного иммунного ответа (см. публикации заявок на патент США №№2010/0040614; 2010/0028330; 2004/0241745; 2008/0311117; 2009/0217401, патенты США №№7521051, 7563869, 7595048, РСТ публикации WO 2004/056875, WO 2008/083174). Антитела, способные специфично связываться с PD-1, были описаны Agata, T. *et al.* (1996) «*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes*», Int. Immunol. 8(5):765-772; и Berger, R. *et al.* (2008) «*Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies*», Clin. Cancer Res. 14(10):3044-3051 (см. также патенты США №№8008449 и 8552154, публикации патентов США №№2007/0166281; 2012/0114648; 2012/0114649; 2013/0017199; 2013/0230514 и 2014/0044738; и РСТ публикации патентов WO 2003/099196 WO 2004/004771, WO 2004/056875, WO 2004/072286, WO 2006/121168, WO 2007/005874, WO 2008/083174, WO 2009/014708, WO 2009/073533; WO 2012/135408, WO 2012/145549 и WO 2013/014668).

[0015] Однако, несмотря на все предшествующие достижения, остается потребность в улучшенных композициях, способных более активно направлять иммунную систему организма на поражение раковых клеток или инфицированных патогенами клеток, особенно в более низких терапевтических концентрациях. Несмотря на то, что адаптивная иммунная система может быть мощным защитным механизмом против рака и заболевания, зачастую ей препятствуют механизмы подавления иммунитета в микроокружении опухоли, такие как экспрессия PD-1. Кроме того, коингибирующие молекулы, экспрессируемые опухолевыми клетками, иммунными клетками и стромальными клетками в опухолевой среде, могут преимущественно ослаблять ответы Т-клеток на раковые клетки. Следовательно, остается потребность в эффективных PD-1-связывающих молекулах. В частности, существует потребность в эффективных PD-1-связывающих молекулах, имеющих желательный профиль кинетики связывания и способных выступать антагонистами оси PD-1/PD-L1, блокируя взаимодействие PD-1/PD-L1, что может обеспечить улучшенное терапевтическое действие у пациентов, страдающих раком или другими заболеваниями и состояниями. Настоящее изобретение направлено на указанные и другие цели.

### **Краткое описание изобретения**

[0016] Настоящее изобретение относится к PD-1-связывающим молекулам, содержащим PD-1-связывающий домен из отобранных антител к PD-1, способных связываться с PD-1 яванских макаков и PD-1 человека: МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1. Согласно настоящему изобретению в частности предложены PD-1-связывающие молекулы, которые являются гуманизированными или химерными вариантами указанных антител или которые содержат PD-1-связывающие фрагменты указанных антител к PD-1 (в частности, иммуноконъюгаты, диатела, ViTE, биспецифические антитела и т. д.). В частности согласно настоящему изобретению предложены PD-1-связывающие молекулы, которые дополнительно способны связываться с эпитопом молекулы, участвующей в регуляции контрольной точки иммунного ответа, которая присутствует на поверхности иммунной клетки. Согласно настоящему изобретению также предложены способы применения указанных PD-1-связывающих молекул для детектирования PD-1 или для стимуляции иммунного ответа. Согласно настоящему изобретению также предложены способы комбинированной терапии, в которых PD-1-связывающую молекулу, которая содержит один или более PD-1-связывающих доменов указанных отобранных антител к

PD-1, вводят в комбинации с одной или более дополнительными молекулами, которые эффективно стимулируют иммунный ответ, и/или в комбинации с одной или более дополнительными молекулами, которые специфично связываются с раковым антигеном.

[0017] В частности, согласно настоящему изобретению предложена молекула, связывающая PD-1 человека, которая содержит три домена гипервариабельных участков (CDR) тяжелой цепи (H) CDR<sub>H1</sub>, CDR<sub>H2</sub> и CDR<sub>H3</sub> и три домена CDR легкой цепи (L) CDR<sub>L1</sub>, CDR<sub>L2</sub> и CDR<sub>L3</sub>, причем:

(A) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи МАТ к PD-1 1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи МАТ к PD-1 1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78;

или

(B) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи МАТ 2 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи МАТ 2 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92;

или

(C) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи МАТ 3 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 101; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи МАТ 3 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105 и SEQ ID NO: 106;

или

(D) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи МАТ 4 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110 и SEQ ID NO: 111; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи МАТ 4 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115 и SEQ ID NO: 116;

или

(E) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 5 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 121; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 5 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125 и SEQ ID NO: 126;

или

(F) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 6 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: 131; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 6 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135 и SEQ ID NO: 136;

или

(G) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 7 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 141; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 7 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145 и SEQ ID NO: 146;

или

(H) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 8 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: 163; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 8 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167 и SEQ ID NO: 168;

или

(I) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 9 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172 и SEQ ID NO: 173; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 9 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177 и SEQ ID NO: 178;

или

(J) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 10 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193 и SEQ ID NO: 194; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 10 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198 и SEQ ID NO: 199;

или

(K) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 11 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 204; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 11 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209;

или

(L) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 12 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213 и SEQ ID NO: 214; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 12 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219

или

(M) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 13 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 224; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 13 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228 и SEQ ID NO: 229;

или

(N) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 14 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233 и SEQ ID NO: 234; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 14 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238 и SEQ ID NO: 239;

или

(O) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 15 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 и SEQ ID NO: 244; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 15 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248 и SEQ ID NO: 249;

или

(P) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT к PD-1 человека (чPD-1) 7 (1.2) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 141; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT к чPD-1 7 (1.2) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 145 и SEQ ID NO: ID NO: 146;

или

(Q) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT к чPD-1 7 (1.3) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: 141; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT к чPD-1 7 (1.3) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: ID NO: 145;

или

(R) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT к чPD-1 9 (2.2) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 172 и SEQ ID NO: 173; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT к чPD-1 9 (2.2) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189 и SEQ ID NO: 178.

[0018] Согласно настоящему изобретению также предложены варианты реализации всех указанных молекул, связывающих PD-1 человека, причем указанная молекула представляет собой антитело, и в частности указанная молекула представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело.

[0019] Согласно настоящему изобретению также предложены варианты реализации указанных молекул, связывающих PD-1 человека, причем варибельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 79, SEQ



ID NO: 93, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 181 или SEQ ID NO: 250.

[0020] Согласно настоящему изобретению также предложены варианты реализации указанных молекул, связывающих PD-1 человека, причем вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 186 или SEQ ID NO: 251.

[0021] Согласно настоящему изобретению также предложен вариант реализации, в котором молекула, связывающая PD-1 человека, представляет собой биспецифическую связывающую молекулу, способную одновременно связываться с PD-1 человека и со вторым эпитопом, и в частности предложен вариант реализации, в котором второй эпитоп является эпитопом молекулы, участвующей в регуляции контрольной точки иммунного ответа, присутствующей на поверхности иммунной клетки (в частности, если второй эпитоп представляет собой эпитоп B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, галектина-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, ГКГС класса I или II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 или VISTA, и наиболее конкретно, если второй эпитоп представляет собой эпитоп CD137, CTLA-4, LAG-3, OX40, TIGIT или TIM-3).

[0022] Согласно настоящему изобретению также предложены варианты реализации, в которых молекула, связывающая PD-1 человека, представляет собой биспецифическую молекулу, содержащую сайт связывания эпитопа LAG-3, в частности, в которой сайт связывания эпитопа LAG-3 содержит:

(A) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> вариабельной области тяжелой цепи МАТ к LAG-3 1, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, соответственно; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> вариабельной области легкой цепи МАТ к LAG-3 1, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно;

или

(B) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> вариабельной области тяжелой цепи VH1 МАТ к LAG-3 человека (чLAG-3) 1, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, соответственно; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> переменной области легкой цепи VL4 МАТ к чLAG-3 1, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно;

или

(C) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> переменной области тяжелой цепи МАТ к LAG-3 6, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> переменной области легкой цепи МАТ к LAG-3 6, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63, соответственно;

или

(D) (1) Домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> переменной области тяжелой цепи VH1 МАТ к чLAG-3 6, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно; и

(2) Домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> переменной области легкой цепи МАТ к LAG-3 6, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63, соответственно.

[0023] Согласно настоящему изобретению также предложены варианты реализации указанных молекул, связывающих PD-1 человека, причем указанная молекула представляет собой диатело, и в частности указанное диатело представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит две или три, или четыре, или пять полипептидных цепей. Согласно настоящему изобретению также предложены варианты реализации указанных молекул, связывающих PD-1 человека, причем указанная молекула представляет собой трехвалентную связывающую молекулу и в частности указанная трехвалентная связывающая молекула представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит три, четыре, пять или более пяти полипептидных цепей. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены варианты реализации указанных молекул, связывающих PD-1 человека, причем указанная молекула содержит область Fc. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены варианты реализации указанных молекул, связывающих PD-1 человека, причем указанная молекула содержит домен, связывающий альбумин, и в частности деиммунизированный домен, связывающий альбумин.

[0024] Согласно настоящему изобретению также предложены варианты реализации всех указанных молекул, связывающих PD-1 человека, причем указанная молекула содержит область Fc, и при этом область Fc представляет собой вариант области Fc, который

содержит одну или более модификаций аминокислот, которые снижают аффинность варианта области Fc в отношении FcγR и/или увеличивают период полувыведения из сыворотки крови, и более конкретно, в которой указанные модификации содержат по меньшей мере одну замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из:

- (1) L234A; L235A;
- (2) L234A и L235A;
- (3) M252Y; M252Y и S254T;
- (4) M252Y и T256E;
- (5) M252Y, S254T и T256E; или
- (6) K288D и H435K;

где нумерация представляет собой индекс по системе нумерации ЕС, описанной в Кабат.

[0025] Согласно настоящему изобретению также предложены варианты реализации, в которых любую из вышеописанных PD-1-связывающих молекул применяют для стимуляции иммунного ответа, опосредуемого Т-клетками. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены варианты реализации, в которых любую из вышеописанных PD-1-связывающих молекул применяют для лечения заболевания или состояния, связанного с подавленной иммунной системой, в частности, рака или инфекции.

[0026] Согласно настоящему изобретению в частности предложен вариант применения в лечении или диагностике, или прогнозировании рака, причем рак характеризуется присутствием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки: опухоли надпочечников, ассоциированного со СПИДом рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака мочевого пузыря, рака костей, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, рака молочной железы, опухоли сонной артерии, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной саркомы клеток почек, светлоклеточной саркомы, рака толстой кишки, колоректального рака, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, экстраклеточной миксоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или желчного протока, рака желудка, гестационного трофобластного заболевания, герминогенной опухоли, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли островковых клеток, саркомы Капоши, рака почек, лейкоза, липомы/доброкачественной липоматозной опухоли, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легких, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, множественной эндокринной

неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринной опухоли, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной тиреокарциномы, опухоли паращитовидной железы, педиатрического рака, опухоли оболочек периферических нервов, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, постериальной увеальной меланомы, редкого гематологического расстройства, метастатического рака почек, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточной саркомы, рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, карциномы тимуса, тимомы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки.

[0027] Согласно настоящему изобретению предложен способ применения в лечении или диагностике, или прогнозировании рака, причем рак представляет собой колоректальный рак, гепатоцеллюлярную карциному, глиому, рак почек, рак молочной железы, множественную миелому, рак мочевого пузыря, нейробластому, саркому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, ректальный рак, острый миелоидный лейкоз (AML), хронический миелолейкоз (CML), острый В-линейный лимфобластный лейкоз (B-ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лейкоз ворсистых клеток (HCL), бластную опухоль из плазмоцитоидных дендритных клеток (BPDCN), неходжкинские лимфомы (NHL), включая лейкоз мантийных клеток (MCL) и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), лимфому Ходжкина, системный мастоцитоз или лимфому Беркитта.

[0028] Согласно настоящему изобретению также предложены варианты реализации, в которых любая из вышеописанных PD-1-связывающих молекул содержит детектируемую метку и применяется для детектирования PD-1.

### **Краткое описание чертежей**

[0029] На Фигуре 1 представлено схематическое изображение типичного ковалентно связанного диатела, содержащего два эпитопсвязывающих сайта, состоящих из двух полипептидных цепей, каждая из которых содержит домен, способствующий образованию гетеродимера, с E-спиралью или K-спиралью. Остаток цистеина может присутствовать в линкере и/или в домене, стимулирующем образование гетеродимера, как показано на Фигуре 3В. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового затенения или заливки.

[0030] На Фигуре 2 представлено схематическое изображение типичной ковалентно связанной молекулы диатела, содержащей два эпитопсвязывающих сайта, состоящих из двух полипептидных цепей, каждая из которых содержит домен CH2 и CH3, так, что

соответствующие цепи образуют полную область Fc или ее часть. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового затенения или заливки.

[0031] На Фигурах 3А-3С представлены схемы, иллюстрирующие типичное четырехвалентное диатело, содержащее четыре эпитопсвязывающих сайта, состоящих из двух пар полипептидных цепей (т.е., в целом из четырех полипептидных цепей). Один полипептид каждой пары содержит домены CH2 и CH3, так, что соответствующие цепи образуют полную область Fc или ее часть. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового затенения или заливки. Две пары полипептидных цепей могут быть одинаковыми. В вариантах реализации настоящего изобретения, в которых домены VL и VH распознают различные эпитопы (как показано на Фигурах 3А-3С), полученная молекула обладает четырьмя сайтами связывания эпитопов и является биспецифической и двухвалентной по отношению к каждому связанному эпитопу. В вариантах реализации настоящего изобретения, в которых домены VL и VH распознают один и тот же эпитоп (например, в обеих цепях использованы аналогичные CDR домена VL и аналогичные CDR домена VH), полученная молекула обладает четырьмя сайтами связывания эпитопов и является моноспецифической и четырехвалентной в отношении одного эпитопа. В другом варианте две пары полипептидов могут быть разными. В вариантах реализации настоящего изобретения, в которых домены VL и VH каждой пары полипептидов распознают различные эпитопы (как показано на Фигурах 3А-3С), полученная молекула содержит четыре эпитопсвязывающих сайта и является тетраспецифической и моновалентной по отношению к каждому связанному эпитопу. На Фигуре 3А представлено диатело, содержащее область Fc, которое содержит пептид домена, стимулирующего образование гетеродимера, содержащего остаток цистеина. На Фигуре 3В представлено диатело, содержащее область Fc, которое содержит домены, способствующие образованию гетеродимера, с E-спиралью и K-спиралью, содержащие остаток цистеина и линкер (необязательно содержащий остаток цистеина). На Фигуре 3С представлено диатело, содержащее область Fc, которое содержит домены CH1 и CL.

[0032] На Фигурах 4А и 4В представлены схемы типичной ковалентно связанной молекулы диатела, содержащей два эпитопсвязывающих сайта, состоящих из трех полипептидных цепей. Две полипептидные цепи содержат домены CH2 и CH3, так, что соответствующие цепи образуют полную область Fc или ее часть. Полипептидные цепи, содержащие домены VL и VH, дополнительно содержат домен, способствующий образованию гетеродимера. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового затенения или заливки.

[0033] На Фигуре 5 представлена схема типичной ковалентно связанной молекулы диатела, содержащей четыре эпитопсвязывающих сайта, состоящих из пяти полипептидных цепей. Две полипептидные цепи содержат домен CH2 и CH3, так, что соответствующие цепи образуют область Fc, которая включает полную область Fc или ее часть. Полипептидные цепи, содержащие соединенные домены VL и VH, дополнительно содержат домен, способствующий образованию гетеродимера. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового затенения или заливки.

[0034] На Фигурах 6A-6F представлены схемы типичных трехвалентных связывающих молекул, содержащих область Fc, содержащих три эпитопсвязывающих сайта. На Фигурах 6A и 6B, соответственно, схематично представлены домены трехвалентных связывающих молекул, содержащих два домена связывания, характерных для диатела, и связывающий домен типа Fab, имеющих различные ориентации доменов, в которых связывающие домены, характерные для диатела, являются N-концевыми или C-концевыми по отношению к области Fc. Молекулы на Фигурах 6A и 6B содержат четыре цепи. На Фигурах 6C и 6D, соответственно, схематически представлены домены трехвалентных связывающих молекул, содержащих два связывающих домена, характерных для диатела, N-концевых по отношению к области Fc, и связывающий домен типа Fab, в которых легкая цепь и тяжелая цепь соединены посредством полипептидного спейсера или связывающего домена типа scFv. Трехвалентные связывающие молекулы на Фигурах 6E и 6F, соответственно, схематически иллюстрируют домены трехвалентных связывающих молекул, содержащих два связывающих домена, характерных для диатела, C-концевых по отношению к области Fc, и связывающий домен типа Fab, или связывающий домен типа scFv, в котором находятся связывающие домены, характерные для диатела. Трехвалентные связывающие молекулы на Фигурах 6C-6F содержат три цепи. Домены VL и VH, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового затенения или заливки.

[0035] На Фигурах 7A-7D показано, что МАТ к PD-1 1-15 связываются с PD-1 человека. Кривые связывания для связывания с shPD-1-His представлены на Фигуре 7A (МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 4 к PD-1 и МАТ 9 к PD-1), Фигуре 7B (МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1 и МАТ 7 к PD-1) и Фигуре 7C (МАТ 3 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1). Кривые связывания для связывания с shPD-1-Fc человека представлены на Фигуре 7D (МАТ 3 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1).

[0036] На Фигурах 8А-8С показано, что МАТ к PD-1 1-15 связываются с PD-1 яванских макак. Кривые связывания для связывания с scynoPD-1-hFc представлены на Фигуре 8А (МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1), Фигуре 8В (МАТ 9 к PD-1) и Фигуре 8С (МАТ 3 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1).

[0037] На Фигурах 9А-9D представлены результаты оценки способности МАТ к PD-1 1-15 блокировать связывание PD-L1 человека с PD-1 человека. Кривые ингибирования представлены на Фигуре 9А (МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 15 к PD-1 и МАТ к PD-1 А), Фигуре 9В (МАТ 4 к PD-1), Фигуре 9С (МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1 и МАТ к PD-1 А) и Фигуре 9D (МАТ 3 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1, МАТ 15 к PD-1 и МАТ к PD-1 А).

[0038] На Фигурах 10А-10В представлены результаты оценки тканевой специфичности МАТ к чPD-1 7. На Фигуре 10А представлены результаты гистологического окрашивания ткани нормальной толстой кишки (панели i и vii), печени (панели ii и viii), легких (панели iii и ix), поджелудочной железы (панели iv и x), почек (панели v и xi) и сердца (панели vi и xii). На Фигуре 10А, панели i-vi, представлены результаты исследования ткани, которую инкубировали с меченым МАТ 7 к PD-1 (0,313 мкг/мл). На Фигуре 10А, панели vii-xii, представлены результаты исследования ткани, которую инкубировали с меченым МАТ для контроля изотипа (0,314 мкг/мл). На Фигуре 10В представлены результаты гистологического окрашивания кожи (панели i и iv), миндалин (панели ii и v) и клеток линии NSO, экспрессирующих PD-1 (панели iii и vi). На Фигуре 10В, панели i-iii, представлены результаты исследования ткани, которую инкубировали с меченым МАТ 7 к PD-1 (0,313 мкг/мл).

[0039] На Фигуре 11 представлены профили связывания гуманизированных антител к PD-1 человека, МАТ к чPD-1 2, МАТ к чPD-1 7 (1.1), МАТ к чPD-1 7 (1.2), МАТ к чPD-1 9 (1.1), и контрольных антител к PD-1, МАТ к PD-1 А и МАТ к PD-1 В, содержащих IgG1 (АА) или IgG4 (Р), для связывания с PD-1 на поверхности клеток.

[0040] На Фигуре 12А-12В представлены результаты оценки способности гуманизированных антител к PD, МАТ к чPD-1 2, МАТ к чPD-1 7 (1.1), МАТ к чPD-1 7(1.2), МАТ к чPD-1 9 (1.1), эталонных антител к PD-1, МАТ к PD-1 А и МАТ к PD-1 В, содержащих IgG1 (АА) или IgG4 (Р), блокировать связывание растворимого PD-L1 человека (Фигура 12А) и растворимого PD-L2 человека (Фигура 12В) с PD-1 человека на поверхности клеток.

[0041] На Фигуре 13 представлены результаты оценки способности гуманизированных антител к PD, МАТ к чPD-1 2, МАТ к чPD-1 7(1.1), МАТ к чPD-1 7(1.2), МАТ к чPD-1 9(1.1), и эталонных антител к PD-1, МАТ к PD-1 А и МАТ к PD-1 В, содержащих IgG1 (AA) или IgG4 (P), выступать антагонистами оси PD-1/PD-L1, блокируя взаимодействие PD-1/PD-L1 и предотвращая подавление ответов Т-клеток в количественном исследовании с использованием репортера люциферазы Jurkat-luc-NFAT/CHO-PD-L1.

[0042] На Фигуре 14 представлены результаты, свидетельствующие о том, что МАТ 2 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1 способны стимулировать выработку цитокинов до уровней, сопоставимых или выше тех, которые характерны для эталонных антител к PD-1 (МАТ к PD-1 А и МАТ к PD-1 В), и что обработка с использованием МАТ 2 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1 в комбинации с МАТ к LAG-3 1 обеспечила наибольшее увеличение высвобождения цитокинов. Представлены профили секреции ИФН- $\gamma$  из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), стимулированных энтеротоксином В стафилококка (SEB), обработанных антителами к PD-1 и антителами к LAG-3 по отдельности и в комбинации.

[0043] На Фигурах 15А-15В представлены результаты оценки способности гуманизированных антител к PD, МАТ к чPD-1 2, МАТ к чPD-1 7(1.2), МАТ к чPD-1 9(1.1), и эталонных антител к PD-1, МАТ к PD-1 А и МАТ к PD-1 В, содержащих IgG1 (AA) или IgG4 (P), стимулировать выработку цитокинов. Представлены профили секреции ИФН- $\gamma$  (Фигура 15А) и ФНО- $\alpha$  (Фигура 15В) из SEB-стимулированных МКПК, обработанных антителами к PD-1.

[0044] На Фигурах 16А-16В представлены результаты, свидетельствующие о том, что конструкции биспецифических диател PD-1 $\times$ LAG-3, DART А, DART D, DART Е, DART F, DART G и DART H, способны стимулировать выработку цитокинов до уровней, сопоставимых или превышающих уровни, наблюдаемые при введении комбинации МАТ к PD-1 + МАТ к LAG-3 (МАТ к PD-1 А + МАТ к LAG-3 А), а также о том, что конструкции биспецифических диател PD-1 $\times$ LAG-3, DART А, DART D, DART Е, DART F и DART G, обеспечили наибольшее усиление высвобождения цитокинов. Профили секреции ИФН- $\gamma$  из МКПК, стимулированных низкой концентрацией SEB (0,2 нг/мл), обработанных биспецифическими диателами PD-1 $\times$ LAG-3 или антителами к PD-1 и LAG-3 по отдельности и в комбинации, представлены в графической форме. Результаты, полученные с использованием МКПК от двух типичных доноров, представлены на Фигуре 16А и Фигуре 16В.

[0045] На Фигурах 17А-17В представлены результаты, свидетельствующие о том, что конструкции биспецифических диател PD-1 $\times$ LAG-3, DART А, DART В и DART С,



способны стимулировать выработку цитокинов до уровней, превышающих уровни, наблюдаемые при введении комбинации МАТ к PD-1 + МАТ к LAG-3 (МАТ к PD-1 А + МАТ к LAG-3 А). Профили секреции ИФН- $\gamma$  из МКПК от двух типичных доноров, стимулированных высокой концентрацией SEB (85 нг/мл), которые обрабатывали биспецифическими диателами PD-1 $\times$ LAG-3 или антителами к PD-1 и антителами к LAG-3 по отдельности и в комбинации, представлены в графической форме. Результаты, полученные с использованием МКПК от двух типичных доноров, представлены на Фигуре 17А и Фигуре 17В.

[0046] На Фигурах 18А-18В представлены результаты, свидетельствующие о том, что конструкции биспецифических диател PD-1 $\times$ LAG-3, DART А, DART В и DART С, способны стимулировать выработку цитокинов до уровней, превышающих уровни, наблюдаемые при введении комбинации МАТ к PD-1 + МАТ к LAG-3 (МАТ к PD-1 А + МАТ к LAG-3 А). Профили секреции ИФН- $\gamma$  из МКПК от двух типичных доноров, стимулированных средней концентрацией SEB (0,5 нг/мл), которые обрабатывали биспецифическими диателами PD-1 $\times$ LAG-3 или антителами к PD-1 и антителами к LAG-3 по отдельности или в комбинации, представлены в графической форме. Результаты, полученные с использованием МКПК от двух типичных доноров, представлены на Фигуре 18А и Фигуре 18В.

[0047] На Фигуре 19 представлены результаты, свидетельствующие о том, что конструкции биспецифических диател PD-1 $\times$ LAG-3, DART D и DART H, способны стимулировать выработку цитокинов до уровней, сопоставимых или превышающих уровни, которые наблюдают при введении комбинации МАТ к PD-1 + МАТ к LAG-3 (МАТ к PD-1 А + МАТ к LAG-3 А), а также о том, что DART D обеспечило наибольшее увеличение высвобождения цитокинов. Профили секреции ИЛ-2 из МНПК от типичного донора, стимулированных высокой концентрацией SEB (85 нг/мл), которые обрабатывали биспецифическими диателами PD-1 $\times$ LAG-3 или антителами к PD-1 и антителами к LAG-3, по отдельности и в комбинации, представлены в графической форме.

[0048] На Фигуре 20 представлены результаты, свидетельствующие о том, что конструкции биспецифических диател PD-1 $\times$ LAG-3, DART В и DART I, способны стимулировать выработку цитокинов до уровней, превышающих те, которые наблюдали при введении комбинации МАТ к PD-1 + МАТ к LAG-3 (МАТ к PD-1 А + МАТ к LAG-3 А, МАТ к чPD-1 7(1.2) + МАТ к чLAG-3 1(1.4), МАТ к чPD-1 7(1.2) + МАТ к чLAG-3 6(1.1)). Профили секреции ИФН- $\gamma$  из МКПК от типичного донора, стимулированных средней концентрацией SEB (0,5 нг/мл), которые обрабатывали биспецифическими

диателами PD-1×LAG-3 или антителами к PD-1 и антителами к LAG-3, по отдельности и в комбинации, представлены в графической форме.

[0049] На Фигурах 21А-21D представлены результаты, свидетельствующие о том, что биспецифическое диатело PD-1×LAG-3, DART I, способно стимулировать выработку цитокинов до уровней, превышающих те, которые наблюдали при введении комбинации МАТ к PD-1 + МАТ к LAG-3 (МАТ к PD-1 А + МАТ к LAG-3 А). Профили секреции ИФН-γ (Фигуры 21А и 21С) и ИЛ-2 (Фигуры 21В и 21D) из CD4 Т-клеток памяти от двух типичных доноров, стимулированных столбнячным анатоксином (5 мкг/мл), которые обрабатывали биспецифическим диателом PD-1×LAG-3, DART-I, антителами к PD-1 и антителами к LAG-3 в комбинации или антителом для контроля изотипа, представлены в графической форме. Результаты, полученные на 7 день с использованием CD4 Т-клеток памяти от двух типичных доноров, представлены на Фигурах 21А-В и Фигурах 21С-D.

[0050] На Фигуре 22 представлены результаты, свидетельствующие о том, что параметры фармакокинетики биспецифической молекулы PD-1×LAG-3, DART I, сопоставимы с таковыми для антитела к PD-1, МАТ к PD-1 А IgG4 (Р), у яванских макаков. Линии указывают среднюю концентрацию в сыворотке крови DART I (сплошная линия) и МАТ к PD-1 А (пунктирная линия). Отдельные значения для самцов (заполненные символы) и самок (открытые символы) обезьян представлены в графической форме для DART I (треугольники) и МАТ к PD-1 А (круги).

[0051] На Фигурах 23А-23С представлены концентрации антител в сыворотке крови и процент связанного PD-1 на поверхности CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток в зависимости от времени у животных после лечения с использованием различных антител к PD-1. Процент связанного PD-1 на поверхности CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток после лечения с использованием МАТ к PD-1 представлен в графической форме на правых осях ОУ; символы представляют собой процент (%) связанного PD-1 на Т-клетках для каждого отдельного животного, и пунктирные линии представляют собой средние значения. Концентрации МАТ в сыворотке крови представлены в графической форме на левых осях ОУ; символы представляют собой уровни в сыворотке крови для каждого отдельного животного, и сплошные линии представляют собой кривые нелинейной аппроксимации данных. На каждой панели представлены данные для животных (n = 1/пол/группа), которым вводили 10 мг/кг МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (Р) (Фигура 23А), МАТ к PD-1 А IgG4 (Р) (Фигура 23В) или МАТ к PD-1 В IgG4 (Р) (Фигура 23В) путем внутривенной (в/в) инфузии на 1 день.

## **Подробное описание изобретения**

[0052] Согласно настоящему изобретению предложены PD-1-связывающие молекулы, которые содержат PD-1-связывающий домен отобранных антител к PD-1, способных связываться с PD-1 яванских макаков и PD-1 человека: МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1. В частности, согласно настоящему изобретению предложены PD-1-связывающие молекулы, которые являются гуманизированными или химерными вариантами указанных антител, или которые содержат PD-1-связывающие фрагменты указанных антител к PD-1 (в частности, иммуноконъюгаты, диатела (включая, но не ограничиваясь ими, DART-A, DART-B, DART-C, DART-D, DART-E, DART-F, DART-G, DART-H, DART-I и DART-J), BiTE, биспецифические антитела и т. д.). Согласно настоящему изобретению предложены PD-1-связывающие молекулы, которые дополнительно способны связываться с эпитопом молекулы, участвующей в регуляции контрольной точки иммунного ответа, которая присутствует на поверхности иммунной клетки. Согласно настоящему изобретению также предложены способы применения указанных PD-1-связывающих молекул для детектирования PD-1 или для стимуляции иммунного ответа. Согласно настоящему изобретению также предложены способы комбинированной терапии, в которых PD-1-связывающую молекулу, которая содержит один или более PD-1-связывающих доменов указанных отобранных антител к PD-1, вводят в комбинации с одной или более дополнительными молекулами, которые эффективно стимулируют иммунный ответ, и/или в комбинации с одной или более дополнительными молекулами, которые специфично связываются с раковым антигеном.

## **I Антитела и их связывающие домены**

[0053] Антитела согласно настоящему изобретению представляют собой молекулы иммуноглобулинов, способные специфично связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т. д., посредством по меньшей мере одного сайта распознавания антигена, расположенного в переменном домене молекулы иммуноглобулина. В настоящей заявке термины «антитело» и «антитела» относятся к моноклональным антителам, мультиспецифичным антителам, антителам человека, гуманизированным антителам, синтетическим антителам, химерным антителам, поликлональным антителам, антителам верблюдовых, одноцепочечным Fvs (scFv), одноцепочечным антителам, фрагментам Fab, фрагментам F(ab'), соединенным дисульфидными связями биспецифическим Fvs (sdFv), внутриклеточным антителам и эпитопсвязывающим фрагментам любого из вышеуказанных. В частности, антитела включают молекулы иммуноглобулинов и иммунологически активные фрагменты

молекул иммуноглобулинов, т.е. молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт. Молекулы иммуноглобулинов могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>) или подкласса. Было показано, что, помимо известных способов применения антител в диагностике, антитела можно применять в качестве терапевтических агентов. Антитела способны иммунологически специфично связываться с полипептидом или белком или небелковой молекулой вследствие присутствия на такой молекуле определенного домена или фрагмента или конформации («эпитопа»). Содержащая эпитоп молекула может обладать иммуногенной активностью так, что она вызывает выработку антител у животного, такие молекулы называются «антигенами». В последние несколько десятилетий наблюдается возрождение интереса к терапевтическому потенциалу антител, и антитела стали одним из ведущих классов биотехнологических препаратов (Chan, C.E. *et al.* (2009) «*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*», Singapore Med. J. 50(7):663-666). Более 200 лекарственных препаратов на основе антител были одобрены для применения или находятся на стадии разработки.

[0054] Термин «моноклональное антитело» относится к гомогенной популяции антител, причем моноклональное антитело состоит из аминокислот (природных и неприродных), которые участвуют в селективном связывании антигена. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены к одному эпитопу (или антигенному сайту). Термин «моноклональное антитело» включает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, а также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv), одноцепочечные фрагменты (scFv), их мутированные варианты, гибридные белки, содержащие часть антитела, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена, обладающий требуемой специфичностью и способностью связываться с антигеном. Термин не является ограничивающим в отношении источника антитела или способа его получения (например, с помощью гибридомы, отбора фага, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.д.). Термин включает полноразмерные иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные выше под определением «антитело». Способы получения моноклональных антител известны в данной области техники. Одним из способов, которые могут быть использованы, является способ, описанный Kohler, G. *et al.* (1975) «*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*», Nature 256:495-497, или его модификация. Как правило, моноклональные антитела вырабатываются у мышей, крыс или кроликов. Антитела

получают путем иммунизации животного иммуногенным количеством клеток, клеточных экстрактов или белковых препаратов, которые содержат желательный эпитоп. Иммуноген может представлять собой, но не ограничивается ими, первичные клетки, культивируемые линии клеток, раковые клетки, белки, пептиды, нуклеиновые кислоты или ткань. Клетки, используемые для иммунизации, можно культивировать в течение определенного периода времени (например, по меньшей мере 24 часов) до их использования в качестве иммуногена. Клетки могут быть использованы в качестве иммуногенов сами по себе или в комбинации с неденатурирующим адъювантом, таким как Ribi (см., например, Jennings, V.M. (1995) «*Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production*», ILAR J. 37(3):119-125). В целом клетки должны поддерживаться в интактном состоянии и предпочтительно жизнеспособном состоянии при использовании в качестве иммуногенов. Интактные клетки могут обеспечить более эффективное детектирование антигенов, чем поврежденные клетки, иммунизированным животным. Использование денатурации или жестких адъювантов, например, адъюванта Фрейда, может привести к повреждению клеток и, следовательно, не рекомендуется. Иммуноген можно вводить несколько раз с периодическими интервалами, такими как один раз в две недели или еженедельно, или можно вводить так, чтобы поддерживать жизнеспособность животного (например, в тканевом рекомбинанте). В другом варианте, существующие моноклональные антитела и любые другие эквивалентные антитела, которые являются иммуноспецифичными для желательного патогенного эпитопа, могут быть секвенированы и получены с использованием любых рекомбинантных способов, известных в данной области техники. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения подходящее антитело секвенируют, и полинуклеотидную последовательность затем клонируют в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующая представляющее интерес антитело, можно поддерживать в векторе в клетке-хозяине, и затем клетка-хозяин может быть размножена и заморожена для последующего использования. Полинуклеотидную последовательность подходящих антител можно использовать для генетической манипуляции, чтобы получить моноспецифичные или полиспецифичные (например, биспецифические, триспецифичные и тетраспецифичные) молекулы согласно настоящему изобретению, а также антитело с оптимизированной аффинностью, химерное антитело, гуманизированное антитело и/или антитело, содержащее фрагменты антител собачьих, чтобы улучшить аффинность или другие характеристики антитела. Общий принцип гуманизации антитела включает сохранение основной последовательности антигенсвязывающей части антитела и замену оставшейся части антитела из вида, отличного от человека, последовательностями антител человека.

[0055] Природные антитела (такие как антитела IgG) состоят из двух легких цепей, связанных с двумя тяжелыми цепями. Каждая легкая цепь содержит переменный домен (VL) и константный домен (CL). Каждая тяжелая цепь содержит переменный домен (VH), три константных домена (CH1, CH2 и CH3) и шарнирный домен, расположенный между доменами CH1 и CH2. Основная структурная единица природных иммуноглобулинов (например, IgG), таким образом, представляет собой тетрамер, содержащий две легкие цепи и две тяжелые цепи, обычно экспрессируемые в виде гликопротеина массой приблизительно 150000 Да. Амино-концевая («N-концевая») часть каждой цепи содержит переменный домен, содержащий от 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Карбокси-концевая («C-концевая») часть каждой цепи определяет константную область, при этом легкие цепи содержат один константный домен, и тяжелые цепи обычно содержат три константных домена и шарнирный домен. Следовательно, структура легких цепей молекулы IgG представляет собой n-VL-CL-с, и структура тяжелых цепей IgG представляет собой n-VH-CH1-H-CH2-CH3-с (где H представляет собой шарнирный домен, и n и с представляют, соответственно, N-конец и C-конец полипептида). Переменные домены молекулы IgG состоят из гиперпеременных участков (CDR), которые содержат остатки, вступающие в контакт с эпитопом, и сегменты, отличные от CDR, называемые каркасными сегментами (FR), которые в целом поддерживают структуру и определяют расположение петель CDR, чтобы обеспечить такой контакт (хотя некоторые остатки каркасных участков также могут связываться с антигеном). Соответственно, домены VL и VH имеют структуру n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-с. Полипептиды, которые представляют собой (или могут выполнять их функции) первый, второй и третий CDR легкой цепи антитела, обозначены, соответственно, как домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub>. Аналогичным образом, полипептиды, которые представляют собой (или могут выполнять их функции) первый, второй и третий CDR тяжелой цепи антитела, обозначены, соответственно, как домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub>. Соответственно, термины домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub>, домен CDR<sub>L3</sub>, домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> относятся к полипептидам, которые, когда они входят в состав белка, придают указанному белку способность связываться с определенным эпитопом независимо от того, является ли указанный белок антителом, содержащим легкие и тяжелые цепи, или диателом или одноцепочечной связывающей молекулой (например, scFv, BiTe и т. д.), или представляет собой другой тип белка. Соответственно, в настоящей заявке термин «эпитопсвязывающий фрагмент» означает фрагмент антитела, способный иммуноспецифично связываться с эпитопом, и термин «эпитопсвязывающий сайт»

относится к той части молекулы, которая содержит эпитопсвязывающий фрагмент, который отвечает за связывание эпитопа. Эпитопсвязывающий сайт может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 доменов CDR указанного антитела и, несмотря на то, что он способен иммуноспецифично связываться с указанным эпитопом, может проявлять иммуноспецифичность, аффинность или селективность в отношении эпитопа, который отличается от эпитопа указанного антитела. Предпочтительно, однако, эпитопсвязывающий фрагмент содержит все 6 доменов CDR указанного антитела. Эпитопсвязывающий фрагмент антитела может представлять собой одну полипептидную цепь (например, scFv) или может содержать две или более полипептидных цепей, каждая из которых имеет amino-конец и карбокси-конец (например, диатело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub> и т. д.).

[0056] Согласно настоящему изобретению в частности предложены одноцепочечные фрагменты переменных доменов («scFv») антител к PD-1 согласно настоящему изобретению и мультиспецифичные связывающие молекулы, содержащие их. Одноцепочечные фрагменты переменных доменов получают путем соединения переменных доменов легкой цепи и/или тяжелой цепи с использованием короткого соединяющего пептида. В работе Bird *et al.* (1988) («*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*», Science 242:423-426) описан пример соединяющих пептидов, которые образуют связь длиной приблизительно 3,5 нм между карбокси-концом одного переменного домена и amino-концом другого переменного домена. Были разработаны и использованы линкеры, имеющие другие последовательности (Bird *et al.* (1988) «*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*», Science 242:423-426). В свою очередь, линкеры могут быть модифицированы для придания им дополнительных функций, таких как прикрепление лекарственных препаратов или прикрепление к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты могут быть получены рекомбинантными или синтетическими способами. Для получения scFv с помощью синтетических способов может быть использован автоматизированный синтезатор. Для получения scFv с помощью рекомбинантных способов подходящая плазмида, содержащая полинуклеотид, который кодирует scFv, может быть введена в подходящую клетку-хозяина, например, эукариотическую клетку, такую как клетки дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих, или прокариотическую клетку, такую как *E. coli*. Полинуклеотиды, которые кодируют представляющие интерес scFv, могут быть получены с помощью стандартных манипуляций, таких как лигирование полинуклеотидов. Полученный scFv может быть выделен с использованием стандартных способов очистки белка, известных в данной области техники.

[0057] В область настоящего изобретения в частности также включены гуманизированные варианты антител к PD-1 согласно настоящему изобретению и полиспецифичные связывающие молекулы, содержащие их. Термин «гуманизированное» антитело относится к химерной молекуле, обычно полученной с использованием рекомбинантных методик, содержащей антигенсвязывающий сайт иммуноглобулина из видов, отличных от человека, и остальную иммуноглобулиновую структуру молекулы, которая основана на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Антитела к PD-1 человека согласно настоящему изобретению включают гуманизированные, химерные варианты и варианты, содержащие фрагменты антител собачьих, антител МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1. Полинуклеотидная последовательность переменных доменов указанных антител может быть использована для генетической манипуляции, чтобы получить указанные производные и улучшить аффинность или другие характеристики указанных антител. Общий принцип гуманизации антитела включает сохранение основной последовательности антигенсвязывающей части антитела с заменой оставшейся части антитела из вида, отличного от человека, последовательностями антител человека. Существуют четыре общих этапа гуманизации моноклонального антитела. Указанные этапы включают: (1) определение нуклеотидной и предсказанной аминокислотной последовательности исходных переменных доменов легких и тяжелых цепей антитела, (2) дизайн гуманизированного антитела или антитела, содержащего фрагменты антител собачьих, т.е. принимается решение о том, какой каркасный участок антитела будет использован во время процесса гуманизации или включения фрагментов антител собачьих, (3) фактические методологии/методики гуманизации или включения фрагментов антител собачьих, и (4) трансфекцию и экспрессию гуманизированного антитела. См., например, патенты США №№4816567; 5807715; 5866692; и 6331415.

[0058] Антигенсвязывающий сайт может содержать полный переменный домен, гибридный с константным доменом, или только гиперпеременные участки (CDR) указанного переменного домена, привитые на соответствующие каркасные участки. Антигенсвязывающие сайты могут быть дикого типа или могут быть модифицированы одной или более заменами аминокислот. Это исключает константную область в качестве иммуногена у человека, однако сохраняется возможность иммунного ответа на чужеродный переменный домен (LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) «*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*», Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)



86:4220-4224). Другой подход сосредоточен не только на обеспечении константных областей человеческого происхождения, но и на модификации переменных доменов, чтобы как можно более точно изменить их на человеческую форму. Известно, что переменные домены тяжелых и легких цепей содержат три гиперпеременных участка (CDR), которые изменяются в зависимости от рассматриваемых антигенов и определяют способность к связыванию, фланкированных четырьмя каркасными участками (FR), которые являются относительно консервативными у данного вида и которые предположительно обеспечивают каркас для CDR. При получении антител из вида, отличного от человека, по отношению к определенному антигену, переменные домены могут быть «преобразованы» или «гуманизированы» путем прививки CDR, полученных из антител из видов, отличных от человека, на FR, присутствующие в антителе человека, подлежащем модификации. Применение упомянутого подхода к различным антителам было описано в Sato, K. *et al.* (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) «*Reshaping Human Antibodies for Therapy*», *Nature* 332:323-327; Verhoeven, M. *et al.* (1988) «*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*», *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) «*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*», *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) «*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*», *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) «*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*», *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) «*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo*», *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. *et al.* (1991) «*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy*», *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) «*Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy*», *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289; и Co, M.S. *et al.* (1992) «*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*», *J. Immunol.* 148:1149-1154. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гуманизированные антитела сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное мышинное антитело, которое содержит все шесть CDR из мышинных антител). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения гуманизированные антитела содержат один или более CDR (один, два, три, четыре, пять или шесть), последовательности которых отличаются в сравнении с исходным антителом. [0059] Был описан ряд молекул «гуманизированных» антител, содержащих антигенсвязывающий сайт, полученный из иммуноглобулина из вида, отличного от человека, включая химерные антитела, содержащие переменный домен грызуна или

модифицированный вариабельный домен грызуна, и связанные с ними гипервариабельные участки (CDR), гибридизованные с константными доменами человека (см., например, Winter *et al.* (1991) «*Man-made Antibodies*», Nature 349:293-299; Lobuglio *et al.* (1989) «*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*», Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw *et al.* (1987) «*Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen*», J. Immunol. 138:4534-4538, и Brown *et al.* (1987) «*Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody*», Cancer Res. 47:3577-3583). В других ссылках описаны CDR грызунов, привитые в поддерживающий каркасный участок человека (FR), перед гибридизацией с соответствующими константными доменами человека (см., например, Riechmann, L. *et al.* (1988) «*Reshaping Human Antibodies for Therapy*», Nature 332:323-327; Verhoeven, M. *et al.* (1988) «*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*», Science 239:1534-1536; и Jones *et al.* (1986) «*Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse*», Nature 321:522-525). В другой ссылке описаны CDR грызунов, поддерживаемые каркасными участками грызунов после рекомбинации поверхностных остатков. См., например, публикацию европейского патента №519596. Указанные «гуманизированные» молекулы предназначены для минимизации нежелательного иммунологического ответа на молекулы антител грызунов к белкам человека, что ограничивает продолжительность и эффективность терапевтического применения указанных фрагментов у реципиентов-людей. Другие способы гуманизации антител, которые также могут быть использованы, раскрыты в Daugherty *et al.* (1991) «*Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins*», Nucl. Acids Res. 19:2471-2476, и в патентах США №№6180377; 6054297; 5997867; и 5866692.

## **II Рецепторы Fc $\gamma$ (Fc $\gamma$ R)**

[0060] Домены CH2 и CH3 двух тяжелых цепей взаимодействуют с образованием области Fc, которая представляет собой домен, распознаваемый клеточными рецепторами Fc, включая, но не ограничиваясь ими, рецепторы Fc-гамма (Fc $\gamma$ R). В настоящей заявке термин «область Fc» используется для определения C-концевой области тяжелой цепи IgG. Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 примерного IgG1 человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 1):

231 240 250 260 270 280

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

290 300 310 320 330  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
  
340 350 360 370 380  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
  
390 400 410 420 430  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME  
  
440 447  
ALHNHYTQKS LSLSPGX

пронумерованную с использованием индекса ЕС, как изложено в работе Кабат, где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[0061] Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 примерного IgG2 человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 2):

231 240 250 260 270 280  
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD  
  
290 300 310 320 330  
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA  
  
340 350 360 370 380  
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE  
  
390 400 410 420 430  
WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME  
  
440 447  
ALHNHYTQKS LSLSPGX

пронумерованную с использованием индекса ЕС, как изложено в работе Кабат, где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[0062] Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 примерного IgG3 человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 3):

231 240 250 260 270 280  
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD  
  
290 300 310 320 330  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

340 350 360 370 380  
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
  
390 400 410 420 430  
WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE  
  
440 447  
ALHNRFTQKS LSLSPGX

пронумерованную с использованием индекса ЕС, как изложено в работе Кабат, где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[0063] Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 примерного IgG4 человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 4):

231 240 250 260 270 280  
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD  
  
290 300 310 320 330  
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
  
340 350 360 370 380  
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
  
390 400 410 420 430  
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE  
  
440 447  
ALHNHYTQKS LSLSLGX

пронумерованную с использованием индекса ЕС, как изложено в работе Кабат, где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[0064] В настоящем описании нумерация остатков в константной области тяжелой цепи IgG соответствует индексу ЕС, как изложено в работе Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991) («Кабат»), полностью включенной в настоящую заявку посредством ссылки. Термин «индекс ЕС, как изложено в работе Кабат» относится к нумерации в соответствии с системой ЕС антитела IgG1 человека. Аминокислоты из вариабельных доменов зрелых тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов обозначены в соответствии с положением аминокислоты в цепи. В работе Kabat *et al.* описаны многочисленные аминокислотные последовательности для антител, идентифицирована аминокислотная консенсусная последовательность для

каждой подгруппы и каждой аминокислоте присвоен номер остатка, и CDR идентифицированы, как определено в работе Kabat *et al.* (следует понимать, что CDR<sub>H1</sub>, определенный в работе Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) «*Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins*», J. Mol. Biol. 196:901-917), начинается на пять остатков ранее). Схема нумерации Кабат может быть расширена на антитела, не включенные в его сборник, путем сопоставления рассматриваемого антитела с одной из консенсусных последовательностей в Кабат по отношению к консервативным аминокислотам. Этот способ присвоения номеров остатков стал стандартным в данной области техники и позволяет легко идентифицировать аминокислоты в эквивалентных положениях в разных антителах, включая химерные или гуманизированные варианты. Например, аминокислота в положении 50 легкой цепи антитела человека занимает положение, эквивалентное таковому для аминокислоты в положении 50 легкой цепи мышинового антитела.

[0065] Полиморфизмы наблюдали в ряде различных положений в константных областях антитела (например, в положениях СН1, включая, но не ограничиваясь ими, положения 192, 193 и 214, в положениях Fc, включая, но не ограничиваясь ими, положения 270, 272, 312, 315, 356 и 358, в соответствии с системой нумерации ЕС, изложенной в Кабат), и, соответственно, могут существовать небольшие различия между представленной последовательностью и последовательностями, известными из предшествующего уровня техники. Хорошо известны полиморфные формы иммуноглобулинов человека. В настоящее время известно 18 GM-аллотипов: G1m (1, 2, 3, 17) или G1m (a, x, f, z), G2m (23) или G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) или G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, *et al.*, «*The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation*». Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. *et al.*, 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Согласно настоящему изобретению конкретно предусмотрено, что антитела согласно настоящему изобретению могут включать любой аллотип, изоаллотип или гаплотип любого гена иммуноглобулина и не ограничены аллотипом, изоаллотипом или гаплотипом последовательностей, обеспеченных в настоящем документе. Помимо этого в некоторых системах экспрессии С-концевой остаток аминокислоты (выделенный жирным шрифтом) домена СН3 может быть удален после трансляции. Соответственно, С-концевой остаток домена СН3 представляет собой необязательный остаток аминокислоты в PD-1-связывающих молекулах согласно настоящему изобретению. В область настоящего изобретения конкретно включены PD-1-связывающие молекулы, лишенные С-концевого остатка домена СН3. В область

настоящего изобретения также конкретно включены конструкции, содержащие С-концевой остаток лизина домена СНЗ.

[0066] Активирующие и ингибирующие сигналы передаются посредством лигирования области Fc с клеточным рецептором Fc-гамма (FcγR). Способность указанного лигирования осуществлять диаметрально противоположные функции обусловлена структурными различиями между различными FcγR. Два различных домена в цитоплазматических сигнальных доменах рецептора, называемых иммунорецепторными тирозиновыми активирующими мотивами (ITAM) и иммунорецепторными тирозиновыми ингибирующими мотивами (ITIM), являются причиной различных ответов. Привлечение различных цитоплазматических ферментов к этим структурам обуславливает результат опосредуемых FcγR клеточных ответов. ITAM-содержащие комплексы FcγR включают FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIA, тогда как ITIM-содержащие комплексы включают только FcγRIIB. Нейтрофилы человека экспрессируют ген FcγRIIA. Кластеризация FcγRIIA посредством иммунных комплексов или специфичной сшивки антител служит для агрегации ITAM вместе с рецептор-ассоциированными киназами, которые способствуют фосфорилированию ITAM. Фосфорилирование ITAM служит местом стыковки для Syk-киназы, активация которой приводит к активации последующих субстратов (например, PI3K). Клеточная активация приводит к высвобождению провоспалительных медиаторов. Ген FcγRIIB экспрессируется в В-лимфоцитах; внеклеточный домен FcγRIIB на 96% идентичен FcγRIIA и связывается с комплексами IgG аналогичным образом. Присутствие ITIM в цитоплазматическом домене FcγRIIB определяет данный ингибирующий подкласс FcγR. Недавно была установлена молекулярная основа такого ингибирования. При совместном лигировании с активирующим FcγR ITIM в FcγRIIB становится фосфорилированным и притягивает домен SH2 инозитолполифосфат-5'-фосфатазы (SHIP), который гидролизует фосфоинозитные мессинджеры, которые высвобождаются в результате активации тирозинкиназы, опосредуемой ITAM-содержащим FcγR, что впоследствии ведет к предотвращению притока внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>. Соответственно, сшивка FcγRIIB ослабляет активирующий ответ на лигирование FcγR и ингибирует клеточную восприимчивость. Как следствие, предотвращается активация В-клеток, пролиферация В-клеток и секреция антител.

### **III Биспецифические антитела, полиспецифичные диатела и диатела DART®**

[0067] Способность антитела связываться с эпитопом антигена зависит от присутствия и аминокислотной последовательности доменов VL и VH антитела. Взаимодействие легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела, и, в частности, взаимодействие их доменов VL и VH образует один из двух сайтов связывания эпитопов природного антитела. Природные

антитела способны связываться только с одним видом эпитопов (т. е., они моноспецифичны), несмотря на то, что они могут связываться с несколькими копиями указанного вида эпитопа (т. е. проявляют бивалентность или поливалентность).

[0068] Связывающие домены согласно настоящему изобретению связываются с эпитопами «иммуноспецифичным» образом. В настоящей заявке антитело, диатело или другая связывающая эпитоп молекула, как полагают, «иммуноспецифично» связывается с областью другой молекулы (т.е., эпитопом), если она реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с данным эпитопом по сравнению с другими эпитопами. Например, антитело, которое иммуноспецифично связывается с вирусным эпитопом, представляет собой антитело, которое связывается с данным вирусным эпитопом с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, по сравнению с его иммуноспецифичным связыванием с другими вирусными эпитопами или невирусными эпитопами. Также следует понимать, прочитав это определение, что, например, антитело (или фрагмент или эпитоп), которое иммуноспецифично связывается с первой мишенью, может, но необязательно, специфично или предпочтительно связываться со второй мишенью. Соответственно, «иммуноспецифичное связывание» необязательно требует (хотя и может включать его) исключительного связывания. Как правило, но необязательно, ссылка на связывание означает «специфичное» связывание. Считается, что две молекулы способны связываться друг с другом «физиоспецифичным» образом, если такое связывание проявляет специфичность, с которой рецепторы связываются со своими соответствующими лигандами.

[0069] Функциональность антител может быть повышена путем получения полиспецифичных молекул на основе антител, которые могут одновременно связываться с двумя отдельными и разными антигенами (или различными эпитопами одного и того же антигена) и/или путем получения молекулы на основе антитела, имеющего более высокую валентность (т. е. более двух сайтов связывания) в отношении одного и того же эпитопа и/или антигена.

[0070] Для того чтобы обеспечить молекулы, обладающие большими функциональными возможностями, чем природные антитела, был разработан широкий спектр форматов рекомбинантных биспецифических антител (см., например, РСТ публикации WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), в большинстве из которых используют линкерные пептиды, чтобы гибридизовать дополнительный эпитопсвязывающий фрагмент (например, scFv, VL, VH и т. д.) с или в пределах центральной части антитела (IgA, IgD,

IgE, IgG или IgM) или гибридизовать несколько фрагментов, связывающих эпитоп (например, два фрагмента Fab или scFv). В альтернативных форматах используют линкерные пептиды для гибридизации фрагмента, связывающего эпитоп (например, scFv, VL, VH и т. д.), с доменом димеризации, таким как домен CH2-CH3, или альтернативными полипептидами (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). Как правило, упомянутые подходы включают компромиссные варианты и приемлемые варианты. Например, в РСТ публикациях WO 2013/174873, WO 2011/133886 и WO 2010/136172 раскрыто, что использование линкеров может вызвать проблемы в терапевтических условиях, и описано триспецифичное антитело, в котором домены CL и CH1 передвинуты с их соответствующих природных положений, а также домены VL и VH были диверсифицированы (WO 2008/027236, WO 2010/108127), чтобы придать им способность связываться более чем с одним антигеном. Соответственно, в молекулах, раскрытых в указанных документах, специфичность связывания изменена в пользу способности связываться с дополнительными видами антигенов. В РСТ публикациях WO 2013/163427 и WO 2013/119903 раскрыты модификации домена CH2 для включения аддукта гибридного белка, содержащего связывающий домен. В документе отмечено, что домен CH2, вероятно, играет лишь минимальную роль в качестве посредника эффекторной функции. В РСТ публикациях WO 2010/028797, WO2010028796 и WO 2010/028795 раскрыты рекомбинантные антитела, области Fc которых были заменены дополнительными доменами VL и VH так, чтобы получить трехвалентные связывающие молекулы. В РСТ публикациях WO 2003/025018 и WO2003012069 раскрыты рекомбинантные диатела, отдельные цепи которых содержат домены scFv. В РСТ публикации WO 2013/006544 раскрыты поливалентные молекулы Fab, которые синтезируют как одну полипептидную цепь и затем подвергают протеолизу с образованием гетеродимерных структур. Соответственно, в молекулах, раскрытых в указанных документах, все или некоторые функциональные возможности выступать посредниками эффекторной функции изменены в пользу способности связываться с дополнительными видами антигенов. В РСТ публикациях WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 и WO 1991/003493 раскрыты способы добавления дополнительных связывающих доменов или функциональных групп к антителу или части антитела (например, добавление диатела к легкой цепи антитела или добавление дополнительных доменов VL и VH к легким и тяжелым цепям антитела, или добавление гетерологичного гибридного белка, или связывание нескольких доменов Fab друг с другом). Соответственно, в молекулах,



раскрытых в указанных документах, нативная структура антител изменена в пользу способности связываться с дополнительными видами антигенов.

[0071] В данной области техники также упомянута возможность получения диател, которые отличаются от указанных природных антител своей способностью связываться с двумя или более различными видами эпитопов (т.е. проявляют биспецифичность или полиспецифичность в дополнение к бивалентной или поливалентной форме) (см., например, Holliger *et al.* (1993) «*Diabodies*': *Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments*», Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger *et al.*); US 2004/0220388/WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Alt *et al.* (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. *et al.* (2005) «*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*», J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Olafsen, T. *et al.* (2004) «*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*», Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. *et al.* (2001) «*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange*», Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano *et al.* (2004) «*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain*», Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) «*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*», Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. *et al.* (2009) «*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy*», Cancer Res. 69(12):4941-4944).

[0072] Дизайн диател основан на получении производного антитела, известного как одноцепочечный фрагмент переменных доменов (scFv). Подходящие молекулы получают путем связывания переменных доменов легкой цепи и/или тяжелой цепи с использованием короткого соединяющего пептида. В работе Bird *et al.* (1988) («*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*», Science 242:423-426) описан пример соединяющих пептидов, которые образуют мостик длиной приблизительно 3,5 нм между карбокси-концом одного переменного домена и амино-концом другого переменного домена. Были разработаны и использованы линкеры, имеющие другие последовательности (Bird *et al.* (1988) «*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*», Science 242:423-426). В свою очередь, линкеры могут быть модифицированы для придания им дополнительных функций, таких как прикрепление лекарственных препаратов или прикрепление к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты могут быть получены рекомбинантными или синтетическими способами. Для получения scFv синтетическим способом может быть использован

автоматизированный синтезатор. Для получения scFv рекомбинантными способами подходящая плаزمид, содержащая полинуклеотид, который кодирует scFv, может быть введена в подходящую клетку-хозяина, например, эукариотическую клетку, например, клетки дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих, или прокариотическую клетку, такую как клетка *E. coli*. Полинуклеотиды, которые кодируют представляющие интерес scFv, могут быть получены с помощью стандартных манипуляций, таких как лигирование полинуклеотидов. Полученный scFv может быть выделен с использованием стандартных способов очистки белка, известных в данной области техники.

[0073] Обеспечение немоноспецифичных диател представляет значительное преимущество по сравнению с антителами, включая, но не ограничиваясь ими, способность колигировать и колокализировать клетки, которые экспрессируют различные эпитопы. Соответственно, биспецифические диатела имеют широкое применение, включая терапию и иммунодиагностику. Биспецифичность обеспечивает большую гибкость в разработке и модификации диател для различных вариантов применения, обеспечивая повышенную avidность в отношении мультимерных антигенов, сшивание различных антигенов и направленное нацеливание на конкретные типы клеток, которое основано на присутствии обоих антигенов-мишеней. Вследствие своей повышенной валентности, низких скоростей диссоциации и быстрого клиренса из системы кровообращения (для диател небольшого размера около или менее ~50 кДа), молекулы диател, известные в данной области техники, также нашли особое применение в области визуализации опухолей (Fitzgerald *et al.* (1997) «*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris*», Protein Eng. 10:1221).

[0074] Биспецифичность диател легла в основу их применения для колигирования различных клеток, например, сшивки цитотоксических Т-клеток с опухолевыми клетками (Staerz *et al.* (1985) «*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells*», Nature 314:628-631, и Holliger *et al.* (1996) «*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*», Protein Eng. 9:299-305; Marvin *et al.* (2005) «*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*», Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). В другом варианте, или дополнительно, биспецифические диатела могут быть использованы для колигирования рецепторов на поверхности различных клеток или на одной клетке. Колигирование различных клеток и/или рецепторов можно применять для модуляции эффекторных функций и/или передачи сигналов с участием иммунных клеток. Полиспецифичные молекулы (например, биспецифические диатела), содержащие сайты связывания эпитопов, могут быть направлены на поверхностную детерминанту любой иммунной клетки, такую как B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (CD272), CD3, CD8,

CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70 (CD27L), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD94 (KLRD1), CD137 (4-1BB), CD137L (4-1BBL), CD226, CTLA-4 (CD152), галектин-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS (CD278), ICOSL (CD275), рецептор активации клеток-киллеров (KIR), LAG-3 (CD223), LIGHT (TNFSF14, CD258), ГКГС класса I или II, NKG2a, NKG2d, OX40 (CD134), OX40L (CD134L), PD1H, PD-1 (CD279), PD-L1 (B7-H1, CD274), PD-L2 (B7-CD, CD273), PVR (NECL5, CD155), SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 (HAVCR2), и/или VISTA (PD-1H), которые экспрессируются на Т-лимфоцитах, природных клетках-клетках (NK), антигенпрезентирующих клетках или других мононуклеарных клетках. В частности, сайты связывания эпитопов, направленные на рецептор клеточной поверхности (или его лиганд), который участвует в регулировании контрольной точки иммунного ответа, можно применять для получения биспецифических или полиспецифичных связывающих молекул, которые выступают антагонистами или блокируют ингибирующую передачу сигналов молекулами контрольной точки иммунного ответа и тем самым стимулируют, активируют или усиливают иммунные ответы у субъекта. Молекулы, участвующие в регулировании иммунных контрольных точек, включают, но не ограничиваются ими, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, галектин-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, ГКГС класса I или II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 и/или VISTA.

[0075] Однако вышеупомянутые преимущества сопряжены со значительными затратами. Для образования указанных немоноспецифичных диател необходима успешная сборка двух или более отдельных и различных полипептидов (т.е. указанный процесс образования требует, чтобы диатела были образованы путем гетеродимеризации различных типов полипептидных цепей). Этот факт отличается от ситуации с моноспецифичными диателами, которые образуются путем гомодимеризации идентичных полипептидных цепей. Поскольку по меньшей мере два различных полипептида (т.е. две полипептидные молекулы) должны быть обеспечены для образования немоноспецифичного диатела и поскольку гомодимеризация таких полипептидов приводит к получению неактивных молекул (Takemura, S. *et al.* (2000) «*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*», Protein Eng. 13(8):583-588), получение указанных полипептидов должно быть выполнено так, чтобы предотвратить ковалентное связывание между полипептидами одного и того же типа (т.е., чтобы предотвратить гомодимеризацию) (Takemura, S. *et al.* (2000) «*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*», Protein Eng. 13(8):583-588). В этой связи в данной области техники было предложено нековалентное

соединение таких полипептидов (см., например, Olafsen *et al.* (2004) «*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*», *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano *et al.* (2004) «*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain*», Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) «*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*», *Protein Eng.* 13(8):583-588; Lu, D. *et al.* (2005) «*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*», *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672).

[0076] Однако в данной области техники установлено, что биспецифические диатела, состоящие из нековалентно связанных полипептидов, являются нестабильными и легко диссоциируют на нефункциональные мономеры (см., например, Lu, D. *et al.* (2005) «*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*», *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672).

[0077] В свете этой проблемы в данной области техники удалось разработать стабильные, ковалентно связанные гетеродимерные немоноспецифичные диатела, названные диатела DART<sup>®</sup> (**D**ual **A**ffinity **R**e-**T**argeting **R**eagents (перенаправляющие реагенты с двойной аффинностью)); см., например, публикации патентов США №№2013-0295121; 2010-0174053 и 2009-0060910; публикации европейских патентов EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221; и PCT публикации WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; и Sloan, D.D. *et al.* (2015) «*Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells*», *PLoS Pathog.* 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. *et al.* (2015) «*Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART<sup>®</sup>) Platform*», *Blood pii: blood-2014-05-575704*; Chichili, G.R. *et al.* (2015) «*A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates*», *Sci. Transl. Med.* 7(289):289ra82; Moore, P.A. *et al.* (2011) «*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*», *Blood* 117(17):4542-4551; Veri, M.C. *et al.* (2010) «*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold*», *Arthritis Rheum.* 62(7):1933-1943; Johnson, S. *et al.* (2010) «*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion*», *J. Mol. Biol.* 399(3):436-449). Указанные диатела содержат два или более

ковалентно связанных полипептидов и включают модификацию одного или более остатков цистеина в каждой из используемых полипептидных молекул, что позволяет формировать дисульфидные связи и тем самым ковалентно связывать две полипептидные цепи. Например, было показано, что добавление остатка цистеина к С-концу указанных конструкций обеспечивает образование дисульфидной связи между полипептидными цепями, стабилизируя полученный гетеродимер без отрицательного влияния на характеристики связывания двухвалентной молекулы.

[0078] Каждый из двух полипептидов простейшего биспецифического диатела DART<sup>®</sup> состоит из трех доменов. Первый полипептид содержит (в направлении от N-конца к С-концу): (i) первый домен, который содержит связывающую область из переменного домена легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), (ii) второй домен, который содержит связывающую область из переменного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), и (iii) третий домен, который содержит остаток цистеина (или содержащий цистеин домен), и домен, способствующий образованию гетеродимера, который служит для стимулирования гетеродимеризации со вторым полипептидом диатела и для ковалентной связи первого и второго полипептидов диатела друг с другом. Второй полипептид содержит (в направлении от N-конца к С-концу): (i) первый домен, который содержит связывающую область из переменного домена легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), (ii) второй домен, который содержит связывающую область из переменного домена тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), и (iii) третий домен, который содержит остаток цистеина (или содержащий цистеин домен), и комплементарный домен, способствующий образованию гетеродимера, который объединяется с доменом, стимулирующим образование гетеродимера, первой полипептидной цепи, чтобы стимулировать гетеродимеризацию с первой полипептидной цепью. Остаток цистеина (или содержащий цистеин домен) третьего домена второй полипептидной цепи стимулирует образование ковалентной связи между второй полипептидной цепью и первой полипептидной цепью диатела. Указанные молекулы являются стабильными, эффективными и обладают способностью одновременно связываться с двумя или более антигенами. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения третьи домены первого и второго полипептидов содержат остаток цистеина, который служит для связывания полипептидов посредством дисульфидной связи. На Фигуре 1 представлена схема указанного диатела, в котором для образования ковалентной связи используются домены, способствующие образованию гетеродимера, содержащие E-спираль/K-спираль, и содержащий цистеин линкер. Как показано на Фигуре 2 и Фигурах 3А-3С, один или оба полипептида могут дополнительно

содержать последовательность домена CH2-CH3 так, что соединение двух полипептидов диатела образует область Fc, которая способна связываться с рецептором Fc клеток (таких как В-лимфоциты, дендритные клетки, природные клетки-киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки). Как более подробно описано ниже, домены CH2 и/или CH3 указанных полипептидных цепей не обязательно должны иметь идентичные последовательности, и предпочтительно модифицированы, чтобы содействовать соединению двух полипептидных цепей.

[0079] Было описано множество вариантов указанных молекул (см, например, публикации патентов США №№2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318, 2013/0295121, 2010/0174053 и 2009/0060910; публикации европейских патентов EP 2714079 EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221; и PCT публикации WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538). Указанные диатела DART<sup>®</sup>, содержащие область Fc, могут содержать две пары полипептидных цепей. Первая полипептидная цепь содержит (в направлении от N-конца к С-концу): (i) первый домен, который содержит связывающую область из переменного домена легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), (ii) второй домен, который содержит связывающую область из переменного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), (iii) третий домен, который содержит остаток цистеина (или содержащий цистеин домен) и стимулирует гетеродимеризацию со вторым полипептидом диатела и образование ковалентной связи между первым и вторым полипептидами диатела, и (iv) домен CH2-CH3. Второй полипептид содержит (в направлении от N-конца к С-концу): (i) первый домен, который содержит связывающую область из переменного домена легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), (ii) второй домен, который содержит связывающую область из переменного домена тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), и (iii) третий домен, который содержит остаток цистеина (или содержащий цистеин домен), и домен, способствующий образованию гетеродимера, который стимулирует гетеродимеризацию с первой полипептидной цепью. В данном случае два первых полипептида соединяются друг с другом с образованием области Fc. На Фигурах 3А-3С представлены схемы трех вариантов указанных диател, в которых используются разные домены, способствующие образованию гетеродимера.

[0080] Другие диатела DART<sup>®</sup>, содержащие область Fc, могут содержать три полипептидные цепи. Первый полипептид указанных диател DART<sup>®</sup> содержит три домена: (i) домен, содержащий VL1, (ii) домен, содержащий VH2, и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Второй полипептид указанных диател DART<sup>®</sup> содержит: (i) домен, содержащий VL2, (ii) домен, содержащий VH1, и (iii) домен, который стимулирует гетеродимеризацию и образование ковалентной связи с первой

полипептидной цепью диатела. Третий полипептид указанных диател DART<sup>®</sup> содержит последовательность CH2-CH3. Соответственно, первая и вторая полипептидные цепи указанных диател DART<sup>®</sup> связываются с образованием сайта связывания VL1/VH1, который способен связываться с эпитопом, а также сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом. Такие более сложные молекулы DART<sup>®</sup> также содержат цистеинсодержащие домены, которые участвуют в образовании ковалентно связанного комплекса. Соответственно, первый и второй полипептиды связаны друг с другом посредством дисульфидной связи между остатками цистеина в их соответствующих третьих доменах. Примечательно, что первая и третья полипептидные цепи соединяются друг с другом с образованием области Fc, которая стабилизируется посредством дисульфидной связи. На Фигуре 4А-4В представлены схемы указанных диател, содержащих три полипептидные цепи.

[0081] Другие диатела DART<sup>®</sup>, содержащие область Fc, могут содержать пять полипептидных цепей, которые могут содержать связывающие области из переменных доменов легкой цепи и тяжелой цепи вплоть от трех различных иммуноглобулинов (называемых VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3). Например, первая полипептидная цепь указанных диател может содержать: (i) домен, содержащий VH1, (ii) домен, содержащий CH1, и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Вторая и пятая полипептидные цепи указанных диател могут содержать: (i) домен, содержащий VL1, и (ii) домен, содержащий CL. Третья полипептидная цепь указанных диател может содержать: (i) домен, содержащий VH1, (ii) домен, содержащий CH1, (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3, (iv) домен, содержащий VL2, (v) домен, содержащий VH3, и (vi) домен, способствующий образованию гетеродимера, причем домены, способствующие образованию гетеродимера, стимулируют димеризацию третьей цепи с четвертой цепью. Четвертый полипептид указанных диател может содержать: (i) домен, содержащий VL3, (ii) домен, содержащий VH2, и (iii) домен, который стимулирует гетеродимеризацию и образование ковалентной связи с третьей полипептидной цепью диатела. В данном случае первый и третий полипептиды соединяются друг с другом с образованием области Fc. Такие более сложные молекулы DART<sup>®</sup> также содержат цистеинсодержащие домены, которые участвуют в образовании ковалентно связанного комплекса так, что каждая полипептидная цепь связана с по меньшей мере одной дополнительной полипептидной цепью посредством дисульфидной связи с участием остатков цистеина. Предпочтительно указанные домены упорядочены в направлении от N-конца к С-концу. На Фигуре 5 представлены схемы указанных диател, содержащих пять полипептидных цепей.

[0082] Альтернативные конструкции известны в данной области техники для вариантов применения, в которых предпочтительной является четырехвалентная молекула, но область Fc не требуется, включая, но не ограничиваясь ими, четырехвалентные тандемные антитела, также называемые «TandAbs» (см., например, публикации патентов США №№2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667 2013-0189263; публикации европейских патентов EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 и EP 1293514; PCT публикации WO 1999/057150, WO 2003/025018 и WO 2013/013700), которые образованы путем гомодимеризации двух идентичных цепей, каждая из которых содержит домены VH1, VL2, VH2 и VL2.

[0083] Недавно были описаны трехвалентные структуры, включающие два связывающих домена, характерных для диател, и один домен типа, не характерного для диател, и область Fc (см., например, PCT публикацию: PCT/US15/33076, озаглавленную «Триспецифичные связывающие молекулы и способы их применения», поданную 29 мая 2015 г., и PCT/US15/33081, озаглавленную «Триспецифичные связывающие молекулы, которые специфично связываются с несколькими антигенами рака и способы их применения», поданную 29 мая 2015 г.). Указанные трехвалентные молекулы могут быть использованы для получения моноспецифичных, биспецифических или триспецифичных молекул. На Фигурах 6А-6F представлены схемы указанных трехвалентных молекул, содержащих 3 или 4 полипептидные цепи.

#### **IV Молекулы, связывающие PD-1 человека, согласно настоящему изобретению**

[0084] Предпочтительные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению включают антитела, диатела, BiTE и т. д. и способны связываться с непрерывной или прерывистой (например, конформационной) частью (эпитопом) PD-1 человека (CD279). Молекулы, связывающие PD-1 человека, согласно настоящему изобретению предпочтительно также способны связываться с молекулами PD-1 одного или более видов, отличных от человека, в частности с PD-1 приматов (и частности таких видов приматов как яванские макаки). Типичный полипептид PD-1 (последовательность в NCBI NP\_005009.2; включая сигнальную последовательность из 20 остатков аминокислот (показаны подчеркиванием) и 268 остатков аминокислот зрелого белка) содержит аминокислотную последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 68):

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA  
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTQL  
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE  
VPTAHPSPPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI  
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT



[0085] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекулы, связывающие PD-1 человека, согласно настоящему изобретению характеризуются любым (одним или более) из следующих критериев:

- (1) специфично связывается с PD-1 человека, эндогенно экспрессируемым на поверхности стимулированной Т-клетки человека;
- (2) специфично связывается с PD-1 человека с равновесной константой связывания ( $K_D$ ) 40 нМ или менее;
- (3) специфично связывается с PD-1 человека с равновесной константой связывания ( $K_D$ ) 5 нМ или менее;
- (4) специфично связывается с PD-1 человека со скоростью прямой реакции ( $k_a$ )  $1,5 \times 10^4$   $M^{-1} \text{мин}^{-1}$  или более;
- (5) специфично связывается с PD-1 человека со скоростью прямой реакции ( $k_a$ )  $90,0 \times 10^4$   $M^{-1} \text{мин}^{-1}$  или более;
- (6) специфично связывается с PD-1 человека со скоростью обратной реакции ( $k_d$ )  $7 \times 10^4$   $\text{мин}^{-1}$  или менее;
- (7) специфично связывается с PD-1 человека со скоростью обратной реакции ( $k_d$ )  $2 \times 10^4$   $\text{мин}^{-1}$  или менее;
- (8) специфично связывается с PD-1 примата, отличного от человека (например, PD-1 яванской макаки);
- (9) ингибирует (т.е. блокирует или препятствует) связывание/ингибирующую активность лиганда PD-1 (PD-L1/PD-L2) с PD-1;
- (10) стимулирует иммунный ответ; и/или
- (11) оказывает синергическое действие с антителом к LAG-3 человека, чтобы стимулировать антигенспецифичный ответ Т-клеток.

[0086] В настоящей заявке термин «антигенспецифичный ответ Т-клеток» относится к ответам Т-клетки, которые являются результатом стимуляции Т-клетки антигеном, в отношении которого специфична Т-клетка. Неограничивающие примеры ответов Т-клеток при антигенспецифичной стимуляции включают пролиферацию и выработку цитокинов (например, выработку ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ ). Способность молекулы стимулировать антигенспецифичный ответ Т-клеток может быть определена, например, с использованием количественного исследования МКПК, стимулированных энтеротоксином типа В *Staphylococcus aureus* («SEB»), описанного в настоящем документе.

[0087] Предпочтительные молекулы, связывающие PD-1 человека, согласно настоящему изобретению содержат домены VH и/или VL мышинных моноклональных антител к PD-1 человека «МАТ к PD-1 1», «МАТ 2 к PD-1», «МАТ 3 к PD-1», «МАТ 4 к PD-1», «МАТ 5 к PD-1», «МАТ 6 к PD-1», «МАТ 7 к PD-1», «МАТ 8 к PD-1», «МАТ 9 к PD-1», «МАТ 10 к PD-1», «МАТ 11 к PD-1», «МАТ 12 к PD-1», «МАТ 13 к PD-1», «МАТ 14 к PD-1» или «МАТ 15 к PD-1», и более предпочтительно содержат 1, 2 или все 3 CDR<sub>H</sub> домена VH и/или 1, 2 или все 3 CDR<sub>L</sub> домена VL указанных моноклональных антител к PD-1 человека. Указанные предпочтительные молекулы, связывающие PD-1 человека, включают биспецифические (или полиспецифичные) антитела, химерные или гуманизированные антитела, BiTe, диатела и т. д., и указанные связывающие молекулы, содержащие варианты областей Fc.

[0088] Согласно настоящему изобретению в частности предложены PD-1-связывающие молекулы, содержащие PD-1-связывающий домен, которые содержат:

- (A) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH МАТ к PD-1 1;  
(2) три CDR<sub>L</sub> домена VL МАТ к PD-1 1;  
(3) три CDR<sub>H</sub> домена VH МАТ к PD-1 1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL МАТ к PD-1 1;  
(4) домен VH из VH1 МАТ к чPD-1 1;  
(5) домен VL из VL1 МАТ к чPD-1 1;  
(6) домены VH и VL МАТ к чPD-1 1;
- (B) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH МАТ 2 к PD-1;  
(2) три CDR<sub>L</sub> домена VL МАТ 2 к PD-1;  
(3) три CDR<sub>H</sub> домена VH МАТ 2 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL МАТ 2 к PD-1;  
(4) домен VH из VH1 МАТ к чPD-1 2;  
(5) домен VL из VL1 МАТ к чPD-1 2;  
(6) домены VH и VL МАТ к чPD-1 2;
- (C) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH МАТ 3 к PD-1;  
(2) три CDR<sub>L</sub> домена VL МАТ 3 к PD-1;  
(3) три CDR<sub>H</sub> домена VH МАТ 3 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL МАТ 3 к PD-1;
- (D) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH МАТ 4 к PD-1;  
(2) три CDR<sub>L</sub> домена VL МАТ 4 к PD-1;  
(3) три CDR<sub>H</sub> домена VH МАТ 4 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL МАТ 4 к PD-1;
- (E) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH МАТ 5 к PD-1;  
(2) три CDR<sub>L</sub> домена VL МАТ 5 к PD-1;  
(3) три CDR<sub>H</sub> домена VH МАТ 5 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL МАТ 5 к PD-1;
- (F) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH МАТ 6 к PD-1;

- (2) три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 6 к PD-1;
- (3) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 6 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 6 к PD-1;
- (G) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 7 к PD-1;
- (2) три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 7 к PD-1 или VL2 MAT к чPD-1 7 или VL3 MAT к чPD-1 7;
- (3) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 7 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 7 к PD-1 или VL2 MAT к чPD-1 7, VL3 MAT к чPD-1 7;
- (4) домен VH из VH1 MAT к чPD-1 7 или VH2 MAT к чPD-1 7;
- (5) домен VL из VL1 MAT к чPD-1 7 или VL2 MAT к чPD-1 7, или VL3 MAT к чPD-1 7;
- (6) домены VH и VL MAT к чPD-1 7(1.1) или MAT к чPD-1 7(1.2), или MAT к чPD-1 7(1.3), или MAT к чPD-1 7(2.1), или MAT к чPD-1 7(2.2), или MAT к чPD-1 7(2.3);
- (H) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 8 к PD-1;
- (2) три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 8 к PD-1;
- (3) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 8 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 8 к PD-1;
- (I) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 9 к PD-1 или VH2 MAT к чPD-1 9;
- (2) три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 9 к PD-1 или VL2 MAT к чPD-1 9;
- (3) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 9 к PD-1 или VH2 MAT к чPD-1 9 и три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 9 к PD-1 или VL2 MAT к чPD-1 9;
- (4) домен VH из VH1 MAT к чPD-1 9 или VH2 MAT к чPD-1 9;
- (5) домен VL из VL1 MAT к чPD-1 9 или VL2 MAT к чPD-1 9;
- (6) домены VH и VL MAT к чPD-1 9(1.1) или MAT к чPD-1 9(1.2), или MAT к чPD-1 9(2.1), или MAT к чPD-1 9(2.2);
- (J) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 10 к PD-1;
- (2) три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 10 к PD-1;
- (3) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 10 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 10 к PD-1;
- (K) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 11 к PD-1;
- (2) три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 11 к PD-1;
- (3) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 11 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 11 к PD-1;
- (L) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 12 к PD-1;
- (2) три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 12 к PD-1;
- (3) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 12 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 12 к PD-1;

- (M) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 13 к PD-1;  
 (2) три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 13 к PD-1;  
 (3) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 13 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 13 к PD-1;
- (N) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 14 к PD-1;  
 (2) три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 14 к PD-1;  
 (3) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 14 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 14 к PD-1;
- (O) (1) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 15 к PD-1;  
 (2) три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 15 к PD-1;  
 (3) три CDR<sub>H</sub> домена VH MAT 15 к PD-1 и три CDR<sub>L</sub> домена VL MAT 15 к PD-1;  
 (4) домен VH из VH1 MAT к чPD-1 15;  
 (5) домен VL из VL1 MAT к чPD-1 15;  
 (6) домены VH и VL MAT к чPD-1 15;

или

который связывается или конкурирует за связывание с одним и тем же эпитопом, что и MAT к PD-1 1, MAT 2 к PD-1, MAT 3 к PD-1, MAT 4 к PD-1, MAT 5 к PD-1, MAT 6 к PD-1, MAT 7 к PD-1, MAT 8 к PD-1, MAT 9 к PD-1, MAT 10 к PD-1, MAT 11 к PD-1, MAT 12 к PD-1, MAT 13 к PD-1, MAT 14 к PD-1 или MAT 15 к PD-1.

## **A Моноклональное антитело к PD-1 человека 1**

### **1 Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 1**

[0089] Ниже представлена аминокислотная последовательность домена VH MAT к PD-1 1 (SEQ ID NO: 69) (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием).

DVQLQESGPG RVKPSQSLSL TCTVTGFSIT NDYAWNWIRQ FPGNKLEWMMG  
HITYSGSTSY NPSLKSRISL TRDTSKNHFF LQLSSVTPED TATYYCARDY  
GSGYPYTLDY WGQGTSVTVS S

CDR<sub>H1</sub> MAT к PD-1 1 (SEQ ID NO: 71): NDYAWN

CDR<sub>H2</sub> MAT к PD-1 1 (SEQ ID NO: 72): HITYSGSTSYNPSLKS

CDR<sub>H3</sub> MAT к PD-1 1 (SEQ ID NO: 73): DYGSGYPYTLDY

[0090] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT к PD-1 1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac  
 cttctcagtc tctgtccctc acctgcactg tcaactggctt ctcaatcacc

aatgattatg cctggaactg gatccgacag tttccaggaa acaaactgga  
gtggatgggc cacataacct acagtggcag cactagctac aacctatctc  
tcaaaagtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa ccacttcttc  
ctgcagttga gttctgtgac tcctgaggac acagccacat attactgtgc  
aagagattac ggtagtggct acccctatac tttggactac tgggggtcaag  
gtacctcagt caccgtctcc tcc

[0091] Аминокислотная последовательность домена VL MAT к PD-1 1 (SEQ ID NO: 74) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

QIVLTQSPAL MSASPGEKVT MTCSATSIVS YVYWYQQKPG SSPQPWIYLT  
SNLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW SDNPYTFGGG TKLEIK

CDR<sub>L1</sub> MAT к PD-1 1 (SEQ ID NO: 76): SATSIVSYVY

CDR<sub>L2</sub> MAT к PD-1 1 (SEQ ID NO: 77): LTSNLAS

CDR<sub>L3</sub> MAT к PD-1 1 (SEQ ID NO: 78): QQWSDNPYT

[0092] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT к PD-1 1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

caaattgttc tcaccagtc tcacagcactc atgtctgcat ctccagggga  
gaaggtcacc atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact  
ggtaccagca gaagcctgga tcctcccccc aacctggat ttatctcaca  
tccaacctgg cttctggagt cctgtctcgc ttcagtggca gtgggtctgg  
gacctcttac tctctcaca tcagcagcat ggaggctgaa gatgctgcca  
cttattactg cagcagtgg agtgataacc cgtacacgtt cggagggggg  
accaagctgg aaataaaa

## **2 Гуманизация моноклонального антитела к PD-1, MAT к PD-1 1, чтобы получить «MAT к чPD-1 1»**

[0093] Вышеописанное мышинное антитело к PD-1 человека, MAT к PD-1 1, было гуманизировано и дополнительно деиммунизировано после идентификации антигенных эпитопов, чтобы продемонстрировать возможность гуманизации антитела к PD-1 человека с целью уменьшения его антигенности при введении человеку-реципиенту. В результате гуманизации получили один гуманизированный домен VH, обозначенный в настоящем документе как «VH1 MAT к чPD-1 1», и один гуманизированный домен VL, обозначенный в настоящем документе как «VL1 MAT к чPD-1 1». Соответственно, антитело, содержащее гуманизированные домены VL, спаренные с гуманизированным доменом VH, называется «MAT к чPD-1 1».

[0094] Аминокислотная последовательность домена VH из VH1 MAT к чPD-1 1 (SEQ ID NO: 79) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

DVQLQESGPG LVKPSQTL<sup>S</sup>L TCTVSGFSIS NDYAWNWIRQ PPGKGLEWIG  
HITYSGSTSY NPSLKSR<sup>L</sup>TI TRDTSKNQFV LTMTNMDPVD TATYYCARDY  
GSGYPYTLDY WGQGT<sup>T</sup>TVTS S

[0095] Примерный полинуклеотид, который кодирует VH1 MAT к чPD-1 1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac  
actgagcctg acttgcaccg tgagtggtct ctccatctca aatgactacg  
cctggaattg gattaggcag cctcccggta aagggctgga gtggatcggc  
cacatcacat acagcggctc cacatcatat aatcccagtc tgaagagccg  
tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttggt ctgaccatga  
ccaacatgga cctgtggat actgcaacat actattgtgc tcgaggattat  
ggttctgggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt  
gaccgtgagc tcc

[0096] Аминокислотная последовательность домена VL из VL1 MAT к чPD-1 1 (SEQ ID NO: 81) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EIVLTQSPAT LSVSPGEKVT ITCSATSIVS YVYWYQOKPG QAPQPLIYLT  
SNLASGIPAR FSGSGSGTDF TLTISSLEAE DAATYYCQQW SDNPYTFGGG TKVEIK

[0097] Примерный полинуклеотид, который кодирует VL1 MAT к чPD-1 1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaaatcgctc tgaccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga  
aaaggtcacc attacttgct ctgctacttc tatcgtgtcc tacgtgtact  
ggtatcagca gaagcccggc caggctcccc agccattgat atatctgacc  
agcaacctgg cttctgggat cccagctcgt ttttccggta gcgggtccgg  
gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa gacgccgcca  
cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcgggtggc  
accaaagtgc aaataaag

## **В Моноклональное антитело к PD-1 человека 2**

### **1 Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 2**

[0098] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 2 к PD-1 (SEQ ID NO: 83) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием).

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY  
ISSGSMSISY ADTVKGRRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCASLS  
DYFDYWGQGT TLTVSS

CDR<sub>H1</sub> MAT 2 к PD-1 (SEQ ID NO: 85): SFGMH

CDR<sub>H2</sub> MAT 2 к PD-1 (SEQ ID NO: 86): YISSGSMSISYADTVKG

CDR<sub>H3</sub> MAT 2 к PD-1 (SEQ ID NO: 87): LSDYFDY

[0099] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 2 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc  
ccggaactc tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa  
tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac  
atcagtagtg gcagtatgag catttcctat gcagacacag tgaagggccg  
attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaatga  
ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt  
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc

[00100] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 2 к PD-1 (SEQ ID NO: 88) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPK  
LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV FFCSQTTHVP  
WTFGGGTKLE IK

CDR<sub>L1</sub> MAT 2 к PD-1 (SEQ ID NO: 90): RSSQSLVHSTGNTYLH

CDR<sub>L2</sub> MAT 2 к PD-1 (SEQ ID NO: 91): RVSNRFS

CDR<sub>L3</sub> MAT 2 к PD-1 (SEQ ID NO: 92): SQTTHVPWT

[00101] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 2 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gatgttgatga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga  
tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca ggccttggt cacagtactg  
gaaacaccta tttacattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag  
ctctgatct acagggtttc taaccgattt tctgggggtcc ccgacagggt  
cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agtagagtgg  
aggctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaactac acatggtccg  
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

## 2 Гуманизация моноклонального антитела к PD-1 человека, МАТ 2 к PD-1, чтобы получить «МАТ к чPD-1 2»

[00102] Вышеописанное мышинное моноклональное антитело PD-1 человека, МАТ 2 к PD-1, было гуманизировано и дополнительно деиммунизировано после идентификации антигенных эпитопов, чтобы продемонстрировать возможность гуманизации антитела к PD-1 человека с целью уменьшения его антигенности при введении человеку-реципиенту. В результате гуманизации получили один гуманизированный домен VH, обозначенный в настоящем документе как «VH1 МАТ к чPD-1 2», и один гуманизированный домен VL, обозначенный в настоящем документе как «VL1 МАТ к чPD-1 1». Соответственно, любое антитело, содержащее гуманизированные домены VL, спаренные с гуманизированным доменом VH, называется «МАТ к чPD-1 2».

[00103] Аминокислотная последовательность домена VH из VH1 МАТ к чPD-1 2 (SEQ ID NO: 93) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY  
ISSGMSISY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTEG TALYYCASLS  
DYFDYWGQGT TTVVSS

[00104] Примерный полинуклеотид, который кодирует VH1 МАТ к чPD-1 2, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaagtgcaat tggttgagag tgggtggtggc ctggtgcagc caggtggaag  
tctgcggttg tctgtgagc caagcggatt tgtgttcagc tcttttggga  
tgcattgggt gcgccaggct cccggcaagg gtctcgagtg gtagcacatac  
atctccagcg ggtccatgtc tattagttat gccgacacag tgaaaggcag  
gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cacactgtac ctgcaaatga  
atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgagc ttccctgtct  
gattacttcg actactgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc

[00105] Аминокислотная последовательность домена VL из VL1 МАТ к чPD-1 2 (SEQ ID NO: 95) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPQ  
LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQTTHVP  
WTFGQGTKLE IK

[00106] Примерный полинуклеотид, который кодирует VL1 МАТ к чPD-1 2, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):



gacgttgatga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccttggggcca  
gccagccagt atttcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag  
gaaatacata tctccattgg tacctgcaaaa aaccagggca gagccccag  
ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt tctggcgtgc cagatcggtt  
cagcggcagc gggctctggca ctgatttcac actgaaaatc tctaggggtgg  
aggcagagga cgtaggcgtt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc  
tggaacttttg gccaaaggtac taagctggaa atcaag

### **С Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 3**

[00107] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 3 к PD-1 (SEQ ID NO: 97) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием).

QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYVMHWVKQT PVHGLEWIGT  
IDPETGGTAY NQKFKGKAIL TADKSSNTAY MELRSLTSED SAVYYFTREK  
ITTIVEGTYW YFDVWGTGTT VTVSS

CDR<sub>H1</sub> MAT 3 к PD-1 (SEQ ID NO: 99): DYVMH

CDR<sub>H2</sub> MAT 3 к PD-1 (SEQ ID NO: 100): TIDPETGGTAYNQKFKG

CDR<sub>H3</sub> MAT 3 к PD-1 (SEQ ID NO: 101): EKITTIVEGTYWYFDV

[00108] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 3 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc  
agtgacgctg tcttgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa  
tgcactgggt gaagcagaca cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact  
attgatcctg aaactgggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggcaa  
ggccatactg actgcagaca agtcctcaa cacagcctac atggagctcc  
gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag  
attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac  
agggaccagc gtcaccgtct cctca

[00109] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 3 к PD-1 (SEQ ID NO: 102) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DVLLTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNGDTYLEW YLQKPGQSPK  
LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHLPL  
YTFGGGKLE IK

CDR<sub>L1</sub> MAT 3 к PD-1 (SEQ ID NO: 104): RSSQNIVHSNGDTYLE

CDR<sub>L2</sub> MAT 3 к PD-1 (SEQ ID NO: 105): KVSNRFS

CDR<sub>L3</sub> MAT 3 к PD-1 (SEQ ID NO: 106): FQGSHLPLYT

[00110] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 3 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gatgttttgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga  
tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg  
gagacaccta ttggaatgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag  
ctctgatct ataaagtffc caaccgattt tctgggggtcc cagacaggtt  
cagtggcagt gggtcaggga cagattttac actcaaaatc agcagagtgg  
aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggffc acatcttccg  
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

#### D Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 4

[00111] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 4 к PD-1 (SEQ ID NO: 107) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием).

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY  
ISSGSMSISY ADTVKGRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCASLT  
DYFDYWGQGT TLTVSS

CDR<sub>H1</sub> MAT 4 к PD-1 (SEQ ID NO: 109): SFGMH

CDR<sub>H2</sub> MAT 4 к PD-1 (SEQ ID NO: 110): YISSGSMSISYADTVKG

CDR<sub>H3</sub> MAT 4 к PD-1 (SEQ ID NO: 111): LTDYFDY

[00112] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 4 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 108 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc  
ccggaaactc tctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa  
tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat  
attagtagtg gcagtatgag tatttcctat gcagacacag tgaagggccg  
attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaatga  
ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact  
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca

[00113] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 4 к PD-1 (SEQ ID NO: 112) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DVVMSTPLS LPVSLGDQAS ISRSSQSLV HSTGNTYFHW YLQKPGQSPK  
LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQTTHVP  
WTFGGGKLE IK

CDR<sub>L1</sub> MAT 4 к PD-1 (SEQ ID NO: 114): **RSSQSLVHSTGNTYFH**

CDR<sub>L2</sub> MAT 4 к PD-1 (SEQ ID NO: 115): RVSNRFS

CDR<sub>L3</sub> MAT 4 к PD-1 (SEQ ID NO: 116): SQTTHVPWT

[00114] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 4 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 113 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga  
tcaagcctcc atctcctgca gatctagtca gagccttggt cacagtactg  
gaaacaccta tttccattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag  
ctcctgatct acagggtttc taaccgattt tctgggggtcc ccgacaggtt  
cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg  
aggctgagga tctgggagtt tattttctgct ctcaaacctac acatggtccg  
tggaacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

#### **Е Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 5**

[00115] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 5 к PD-1 (SEQ ID NO: 117) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием).

QVQLQQPGVE LVRPGASVKL SCKASGYSFT AYWMNWMKQR PGQGLEWIGV  
IHPDSE TWL NQKFKDKATL TVDKSSSTAY MQLISPTSED SAVYYCAREH  
YGSSPFAYWG QGTLVTVSA

CDR<sub>H1</sub> MAT 5 к PD-1 (SEQ ID NO: 119): AYWMN

CDR<sub>H2</sub> MAT 5 к PD-1 (SEQ ID NO: 120): VIHPDSE TWLNQKFKD

CDR<sub>H3</sub> MAT 5 к PD-1 (SEQ ID NO: 121): EHYGSSPFAY

[00116] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 5 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 118 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

caggccaac tgcagcagcc tggggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc  
agtgaagctg tcttgcaagg cttctggcta ctcttcacc gcctactgga  
tgaactgat gaaacagagg cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg  
attcatcctt ccgatagtga aacttggtta aatcagaagt tcaaggacaa  
ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac atgcaactca  
tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagcac  
tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca

[00117] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 5 к PD-1 (SEQ ID NO: 122) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIYAASNQGS GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDTAMY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKLEI K

CDR<sub>L1</sub> MAT 5 к PD-1 (SEQ ID NO: 124): RANESVDNYGMSFMN

CDR<sub>L2</sub> MAT 5 к PD-1 (SEQ ID NO: 125): AASNQGS

CDR<sub>L3</sub> MAT 5 к PD-1 (SEQ ID NO: 126): QQSKEVPYT

[00118] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 5 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 123 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca  
gagggccacc atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca  
tgagttttat gaactggttc caacagaaac caggacagcc acccaaacctc  
ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag  
tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat cctatggagg  
aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac  
acgttcggag gggggaccaa gctggaata aaa

#### **F Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 6**

[00119] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 6 к PD-1 (SEQ ID NO: 127) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием).

EVKLVESGGG LVNPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PEKRLEWVAT  
ISGGGSDTYYPDSVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSSLRSED TALYYCARQK  
ATTWFAYWGQ GTLVTVST

CDR<sub>H1</sub> MAT 6 к PD-1 (SEQ ID NO: 129): SYGMS

CDR<sub>H2</sub> MAT 6 к PD-1 (SEQ ID NO: 130): TISGGGSDTYYPDSVKG

CDR<sub>H3</sub> MAT 6 к PD-1 (SEQ ID NO: 131): QKATTWFAY

[00120] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 6 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 128 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga  
acgtgccact ctcaagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca  
tgtccttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg  
ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct ggggtgcctt cacgtttttc  
tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc

cagaggactt tgccgtctat ttctgcccagc aatctaaaga ggtgccctat  
acttttgggtg gcgggacca ggttgagatc aaa

[00121] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 6 к PD-1 (SEQ ID NO: 132) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD NYGISFMNWF QQKPGQPPKL  
LIYPASNQGS GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDAAMY FCQOSKEVPW  
TFGGGTKLEI K

CDR<sub>L1</sub> MAT 6 к PD-1 (SEQ ID NO: 134): RASESVDNYGISFMN

CDR<sub>L2</sub> MAT 6 к PD-1 (SEQ ID NO: 135): PASNQGS

CDR<sub>L3</sub> MAT 6 к PD-1 (SEQ ID NO: 136): QOSKEVPWT

[00122] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 6 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 133 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca  
gagggccacc atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca  
ttagttttat gaactggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc  
ctcatctatc ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag  
tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg  
aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg  
acgttcgggtg gaggcacca gctggaaatc aaa

## **G Моноклональное антитело к PD-1 человека 7**

### **1 Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 7**

[00123] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 7 к PD-1 (SEQ ID NO: 137) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYSFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGV  
IHPSDSE TWL DQKFKDKATL TVDKSSTTAY MQLISPTSED SAVYYCAREEH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

CDR<sub>H1</sub> MAT 7 к PD-1 (SEQ ID NO: 139): SYWMN

CDR<sub>H2</sub> MAT 7 к PD-1 (SEQ ID NO: 140): VIHPSDSETWLDQKFKD

CDR<sub>H3</sub> MAT 7 к PD-1 (SEQ ID NO: 141): EHYGTSPFAY

[00124] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 7 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 138 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgagge ctggagcttc  
agtgaagctg tcttgcaagg cttctggcta ctcttcacc agctactgga  
tgaactgggt gaagcagagg cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg  
attcatcctt ccgatagtga aacttggtta gatcagaagt tcaaggacaa  
ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac atgcaactca  
tcagcccgc atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagggagcac  
tacggtacta gcccgttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt gtcttcc

[00125] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 7 к PD-1 (SEQ ID NO: 142) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPARFSGSG FGTDFSLNIH PMEEDDAAMY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKLEI K

CDR<sub>L1</sub> MAT 7 к PD-1 (SEQ ID NO: 144): RANESVDNYGMSFMN

CDR<sub>L2</sub> MAT 7 к PD-1 (SEQ ID NO: 145): AASNQGS

CDR<sub>L3</sub> MAT 7 к PD-1 (SEQ ID NO: 146): QQSKEVPYT

[00126] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 7 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 143 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca  
gagggccacc atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca  
tgagttttat gaactggttc caacagaaac caggacagcc acccaactc  
ctcatccatg ctgcatcca ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag  
tggcagtggg tttgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg  
aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac  
acgttcggag gggggacca gctggaata aaa

## 2 Гуманизация моноклонального антитела к PD-1 человека 7, чтобы получить «MAT к чPD-1 7»

[00127] Вышеописанное мышинное моноклональное антитело к PD-1 человека, MAT 7 к PD-1, было гуманизировано и дополнительно деиммунизировано после идентификации антигенных эпитопов, чтобы продемонстрировать возможность гуманизации антитела к PD-1 человека с целью уменьшения его антигенности при введении человеку-реципиенту. В результате гуманизации получили два гуманизированных домена VH, обозначенных в настоящем документе как «VH1 MAT к чPD-1 7» и «VH2 MAT к чPD-1 7», и три гуманизированных домена VL, обозначенных в настоящем документе как «VL1 MAT к чPD-1 7», «VL2 MAT к чPD-1 7» и «VL3 MAT к

чPD-1 7». Любой из гуманизированных доменов VL может быть спарен с любым из гуманизированных доменов VH. Соответственно, любое антитело, содержащее один из гуманизированных доменов VL, спаренных с гуманизированным доменом VH, в общем называется «МАТ к чPD-1 7», и конкретные комбинации гуманизированных доменов VH/VL упоминаются со ссылкой на определенные домены VH/VL, например, гуманизированное антитело, содержащее VH1 МАТ к чPD-1 7 и VL2 МАТ к чPD-1 1, в частности называется «МАТ к чPD-1 7(1.2)».

[00128] Аминокислотная последовательность домена VH из VH1 МАТ к чPD-1 7 (SEQ ID NO: 147) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPDSE TWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

[00129] Примерный полинуклеотид, который кодирует VH1 МАТ к чPD-1 7, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 148 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

caagttcaat tggtagacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag  
tgtaagggtg tcttgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga  
tgaattgggt gcgtcaagca ccagggcagg gtctggaatg gattggggtg  
atacatcctt ctgacagcga aacatgggtg gaccagaaat ttaaagatcg  
tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atggaactct  
ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcmc cagaggagcac  
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaaactc tcgtaaccgt atcctcc

[00130] Аминокислотная последовательность домена VH из VH2 МАТ к чPD-1 7 (SEQ ID NO: 149) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWAGV  
IHPDSE TWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

[00131] Примерный полинуклеотид, который кодирует VH2 МАТ к чPD-1 7, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 150 (нуклеотиды, кодирующие CDR<sub>H</sub> остатки, выделены подчеркиванием):

caagttcaat tggtagacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag  
tgtaagggtg tcttgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga  
tgaattgggt gcgtcaagca ccagggcagg gtctggaatg ggctggggtg  
atacatcctt ctgacagcga aacatgggtg gaccagaaat ttaaagatcg  
tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atggaactct

ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac  
tacggcacat caccttttgc atactggggc caggaactc tcgtaaccgt atcctcc

[00132] Аминокислотная последовательность домена VL из VL1 MAT к чPD-17 (SEQ ID NO: 151) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRANESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQOSKEVPY  
TFGGGTKVEI K

[00133] Примерный полинуклеотид, который кодирует VL1 MAT к чPD-17, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 152 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaaatcgtag tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtag  
acgtgccact ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca  
tgtccttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaaactg  
ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct ggggtgcctt cacgtttttc  
tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc  
cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat  
acttttggtag gcgggaccaaa ggttgagatc aaa

[00134] Аминокислотная последовательность домена VL из VL2 MAT к чPD-17 (SEQ ID NO: 153) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQOSKEVPY  
TFGGGTKVEI K

[00135] Примерный полинуклеотид, который кодирует VL2 MAT к чPD-17, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 154 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaaatcgtag tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtag  
acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca  
tgtccttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaaactg  
ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct ggggtgcctt cacgtttttc  
tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc  
cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat  
acttttggtag gcgggaccaaa ggttgagatc aaa

[00136] Аминокислотная последовательность домена VL из VL3 MAT к чPD-17 (SEQ ID NO: 155) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):



EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNRGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQOSKEVPY  
TFGGGTKVEI K

[00137] Примерный полинуклеотид, который кодирует VL3 МАТ к чPD-1 7, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 156 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga  
acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca  
tgtccttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg  
ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct ggggtgcctt cacgtttttc  
tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc  
cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgcctat  
acttttgggtg gcgggaccaaa ggttgagatc aaa

[00138] CDR<sub>L1</sub> домена VL из VL2 МАТ к чPD-1 7 и VL3 МАТ к чPD-1 7 содержит замену аспарагина аминокислотой серином и содержит аминокислотную последовательность: RASESVDNYGMSFMN ((SEQ ID NO: 157), замененный серин выделен подчеркиванием). Согласно настоящему изобретению предусмотрено, что аналогичная замена может быть включена в любой из доменов CDR<sub>L1</sub> МАТ 7 к PD-1, описанных выше.

[00139] Помимо этого CDR<sub>L2</sub> домена VL VL3 МАТ к чPD-1 7 содержит замену глутамина аминокислотой аргинином и содержит аминокислотную последовательность: AASNRGS ((SEQ ID NO: 158), замененный аргинин выделен подчеркиванием). Согласно настоящему изобретению предусмотрено, что аналогичная замена может быть включена в любой из доменов CDR<sub>L2</sub> МАТ 7 к PD-1, описанных выше.

## **H Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 8**

[00140] Аминокислотная последовательность домена VH МАТ 8 к PD-1 (SEQ ID NO: 159) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием).

EGQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYYMNWVKQN HGKSLEWIGD  
INPKNGDTHY NQKFKGEATL TVDKSSTAY MELRSLTSED SAVYYCASDF  
DYWGQGTTLT VSS

CDR<sub>H1</sub> МАТ 8 к PD-1 (SEQ ID NO: 161): DYYMN

CDR<sub>H2</sub> МАТ 8 к PD-1 (SEQ ID NO: 162): DINPKNGDTHYNQKFKG

CDR<sub>H3</sub> МАТ 8 к PD-1 (SEQ ID NO: 163): DFDY

[00141] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 8 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 160 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc  
agtgaagata tcttgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca  
tgaactgggt gaagcagaac catggaaaga gccttgagtg gattggagat  
attaatccta aaaatggtga cactcactac aaccagaagt tcaagggcga  
ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac atggagctcc  
gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcgatttt  
gactactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctcc

[00142] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 8 к PD-1 (SEQ ID NO: 164) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DVVMTQTPLS LPVGLGDQAS ISCRSSQTLV YSNGNTYLNW FLQKPGQSPK  
LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP  
FTFGSGTKLE IK

CDR<sub>L1</sub> MAT 8 к PD-1 (SEQ ID NO: 166): RSSQTLVYSNGNTYLN

CDR<sub>L2</sub> MAT 8 к PD-1 (SEQ ID NO: 167): KVSNRFS

CDR<sub>L3</sub> MAT 8 к PD-1 (SEQ ID NO: 168): SQSTHVPFT

[00143] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 8 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 165 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgctgtcg gtcttgagaga  
tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gacccttgta tatagtaatg  
gaaacaccta tttaaattgg ttctgcaga agccaggcca gtctccaaag  
ctctgatct acaaaagtttc caaccgattt tctgggggtcc cagacaggtt  
cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg  
aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca  
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa

## I Моноклональное антитело к PD-1 человека 9

### 1 Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 9

[00144] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 9 к PD-1 (SEQ ID NO: 169) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVSWVRQT PEKRLWVAT  
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQISSLRSED TALYYCARYG  
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

CDR<sub>H1</sub> MAT 9 к PD-1 (SEQ ID NO: 171): SYLVS  
CDR<sub>H2</sub> MAT 9 к PD-1 (SEQ ID NO: 172): TISGGGGNTYYSDSVKG  
CDR<sub>H3</sub> MAT 9 к PD-1 (SEQ ID NO: 173): YGFDGAWFAY

[00145] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 9 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 170 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggagggc ttagtgaagc ctggagggtc  
cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatcttg  
tgtcttgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc  
attagtggtg gtgggtggtaa cacctactat tcagacagtg tgaagggtcg  
attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatca  
gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaggtatgggt  
ttcgacggcg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc

[00146] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 9 к PD-1 (SEQ ID NO: 174) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIQMTQSPAS LSASVGDIVT ITCRASENIY SYLAWYQQKQ EKSPQLLVYN  
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTQ FSLTINSLQP EDFGNYYCQH HYAVPWTFGG GTRLEIT

CDR<sub>L1</sub> MAT 9 к PD-1 (SEQ ID NO: 176): RASENIYSYLA  
CDR<sub>L2</sub> MAT 9 к PD-1 (SEQ ID NO: 177): NAKTLAA  
CDR<sub>L3</sub> MAT 9 к PD-1 (SEQ ID NO: 178): QHNYAVPWT

[00147] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 9 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 175 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga  
tattgtcacc atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag  
catgggtatca gcagaaacag gaaaaatctc ctcagctcct ggtctataat  
gcaaaaaacct tggcagcagg tgtgccatca aggttcagtg gcagtggatc  
aggcacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct gaagattttg  
ggaattatta ctgtcagcat cattatgctg ttccgtggac gttcgggtgga  
ggcaccagac tggaaatcac a

## 2 Гуманизация моноклонального антитела к PD-1 человека 9, чтобы получить «MAT к чPD-1 9»

[00148] Вышеописанное мышинное моноклональное антитело к PD-1 человека 9 гуманизировали и дополнительно деиммунизировали после идентификации антигенных

эпитопов, чтобы продемонстрировать возможность гуманизации антитела к PD-1 человека с целью уменьшения его антигенности при введении человеку-реципиенту. В результате гуманизации получили два гуманизованных домена VH, обозначенных в настоящей заявке как «VH1 МАТ к чPD-1 9» и «VH2 МАТ к чPD-1 9», и два гуманизованных домена VL, обозначенных в настоящей заявке как «VL1 МАТ к чPD-1 9» и «VL2 МАТ к чPD-1 9». Любой из гуманизованных доменов VL может быть спарен с гуманизованными доменами VH. Соответственно, любое антитело, содержащее один из гуманизованных доменов VL, спаренных с гуманизованным доменом VH, в общем случае называется «МАТ к чPD-1 9», и конкретные комбинации гуманизованных доменов VH/VL упоминаются со ссылкой на определенные домены VH/VL, например, гуманизованное антитело, содержащее VH1 МАТ к чPD-1 9 и VL2 МАТ к чPD-1 9, в частности называется «МАТ к чPD-1 9(1.2)».

[00149] Аминокислотная последовательность домена VH из VH1 МАТ к чPD-1 9 (SEQ ID NO: 179) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EVQLVESGGG LVRPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVSWVRQA PGKGLEWVAT  
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARYG  
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

[00150] Примерный полинуклеотид, который кодирует VH1 МАТ к чPD-1 9, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 180 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaggtgcagc tgggtggaag tgggggscggc ctggtgcgac ccgggggaag  
tctgaaactg tctgtgagcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg  
tgtcttgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg ggtggccact  
atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaaggaag  
atctaccatc agtcgagaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga  
actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga  
tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaccggt tagctcc

[00151] Аминокислотная последовательность домена VH из VH2 МАТ к чPD-1 9 (SEQ ID NO: 181) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EVQLVESGGG LARPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVGWVRQA PGKGLEWTAT  
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSARAED TATYYCARYG  
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

[00152] Примерный полинуклеотид, который кодирует VH2 МАТ к чPD-1 9, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 182 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaggtgcagc tgggtggaag tgggggcggc ctggcgcgac ccgggggaag  
tctgaaactg tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg  
tgggctgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg gacggcact  
atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaagggaag  
atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga  
actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga  
tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaacggt tagctcc

[00153] CDR<sub>H1</sub> домена VH из VH2 MAT к чPD-19 содержит замену серина аминокислотой глицином и содержит аминокислотную последовательность: SYLVG ((SEQ ID NO: 183), замененный глицин выделен подчеркиванием). Согласно настоящему изобретению предусмотрено, что аналогичная замена может быть включена в любой из доменов CDR<sub>H1</sub> MAT 9 к PD-1, описанных выше.

[00154] Аминокислотная последовательность домена VL из VL1 MAT к чPD-19 (SEQ ID NO: 184) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SYLAWYQQKP GKAPKLLIYN  
AKTLAAGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH NYAVPWTFGQ GTKLEIK

[00155] Примерный полинуклеотид, который кодирует VL1 MAT к чPD-19, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 185 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga  
tcgggtcacc atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg  
cctggtatca acagaaacct ggtaaagccc caaaattgct catttacaaac  
gccaagacc tcgcagctgg cgtgccaaagt aggttctcag gcagcggctc  
agggacagat ttcacctca ccatatcctc actgcagccc gaggattttg  
ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgcctggac cttcggacaa  
ggcactaagc tcgagatcaa a

[00156] Аминокислотная последовательность домена VL из VL2 MAT к чPD-19 (SEQ ID NO: 186) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY NYLAWYQQKP GKAPKLLIYD  
AKTLAAGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH NYAVPWTFGQ GTKLEIK

[00157] Примерный полинуклеотид, который кодирует VL2 MAT к чPD-19, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 187 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga  
tcgggtcacc atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg

cctggtatca acagaaacct ggtaaagccc caaaattgct catttacgac  
gccaagaccc tcgcagctgg cgtgccaaagt aggttctcag gcagcggctc  
aggacagat ttcacctca ccatatcctc actgcagccc gaggattttg  
ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccctggac cttcggacaa  
ggcactaagc tcgagatcaa a

[00158] CDR<sub>L1</sub> домена VL из VL2 MAT к чPD-1 9 содержит замену серина аминокислотой аспарагином и содержит аминокислотную последовательность: RASENIYNYLA (SEQ ID NO: 188), замененный аспарагин выделен подчеркиванием). Согласно настоящему изобретению предусмотрено, что аналогичная замена может быть включена в любой из доменов CDR<sub>L1</sub> MAT 9 к PD-1, описанных выше.

[00159] CDR<sub>L2</sub> домена VL из VL2 MAT к чPD-1 9 содержит замену аспарагина аминокислотой аспаратом и содержит аминокислотную последовательность: DAKTLAA ((SEQ ID NO: 189), замененный аспарат выделен подчеркиванием). Согласно настоящему изобретению предусмотрено, что аналогичная замена может быть включена в любой из доменов CDR<sub>L2</sub> MAT 7 к PD-1, описанных выше.

## J Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 10

[00160] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 10 к PD-1 (SEQ ID NO: 190) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием).

EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NYLMSWVRQT PEKRLEWVAS  
ISGGGSNIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRSED TALYYCARQE  
LAFDYWGQGT TLTVSS

CDR<sub>H1</sub> MAT 10 к PD-1 (SEQ ID NO: 192): NYLMS

CDR<sub>H2</sub> MAT 10 к PD-1 (SEQ ID NO: 193): SISGGGSNIYYPDSVKG

CDR<sub>H3</sub> MAT 10 к PD-1 (SEQ ID NO: 194): QELAFDY

[00161] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 10 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 191 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaagtgatac tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc  
cctgaaactc tctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatctca  
tgtcttgggt tcgccagact ccgagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt  
attagtggtg gtggtagtaa tatctactat ccagacagtg tgaagggtcg  
attcaccata tccagggaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatga  
acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagaa  
ctggcttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc

[00162] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 10 к PD-1 (SEQ ID NO: 195) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCRTSQDIS NFLNWYQQKP DGTIKLLIYY  
TSRLHSGVPS RFGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GSTLPWTFGG GTKLEII

CDR<sub>L1</sub> MAT 10 к PD-1 (SEQ ID NO: 197): RTSQDISNFLN

CDR<sub>L2</sub> MAT 10 к PD-1 (SEQ ID NO: 198): YTSRLHS

CDR<sub>L3</sub> MAT 10 к PD-1 (SEQ ID NO: 199): QQGSTLPWT

[00163] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 10 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 196 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga  
cagagtcacc atcagttgca a ggacaagtca ggacattagc aattttttaa  
actgggtatca gcagaaacca gatggaacta ttaaactcct gatctacttac  
acatcaagat tacactcagg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc  
tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa gaagatattg  
ccacttactt ttgccaacag ggtagtacgc ttccgtggac gttcgggtgga  
ggcaccaagc tggaaatcat a

## **К Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 11**

[00164] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 11 к PD-1 (SEQ ID NO: 200) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EVQLQQSGTV LARPGASVKM SCKTSGYTFT GYWMHWVKQR PGQGLKWMGA  
IYPGNSDTHY NQKFKGKAKL TAVTSASTAY MELSSLTNEQ SAIYYCTTGT  
YSYFDVWGTG TTVTSS

CDR<sub>H1</sub> MAT 11 к PD-1 (SEQ ID NO: 202): GYWMH

CDR<sub>H2</sub> MAT 11 к PD-1 (SEQ ID NO: 203): AIYPGNSDTHYNQKFKG

CDR<sub>H3</sub> MAT 11 к PD-1 (SEQ ID NO: 204): GTYSYFDV

[00165] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 11 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 201 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc  
agtgaagatg tcctgcaaga cttctggcta cacatttacc ggctactgga  
tgcactgggt aaaacagagg cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct  
atttatcctg gaaatagtga tactcactac aaccagaagt tcaagggcaa  
ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac atggagctca

gcagcctgac aaatgaggac tctgcatct attactgtac tactgggacc  
tactcgtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc a

[00166] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 11 к PD-1 (SEQ ID NO: 205) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TSIHWYQHRT NGSPRLLIKY  
ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ SNSWLTFGAG TKLELK

CDR<sub>L1</sub> MAT 11 к PD-1 (SEQ ID NO: 207): RASQSIGTSIH

CDR<sub>L2</sub> MAT 11 к PD-1 (SEQ ID NO: 208): YASESIS

CDR<sub>L3</sub> MAT 11 к PD-1 (SEQ ID NO: 209): QQSNSWLT

[00167] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 11 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 206 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga  
aagagtcagt ttctcctgca gggccagtc gagcattggc acaagcatac  
actgggtatca gcacagaaca aatggttctc caaggcttct cataaagtat  
gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc aggtttagtg gcagtggatc  
agggactgat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct gaagatattg  
cagattatta ctgtcaaca agtaatagct ggctcacgtt cggtgctggg  
accaagctgg agctgaaa

## L Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 12

[00168] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 12 к PD-1 (SEQ ID NO: 210) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

QGHLOQSGAE LVRPGASVTL SCKASGFTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGT  
IDPETGGTAY NQKFKGKAIL TVDKSSTTTY MELRSLTSED SAVFYCSRER  
ITTVVEGAYW YFDVWGTGTT VTVSS

CDR<sub>H1</sub> MAT 12 к PD-1 (SEQ ID NO: 212): DYEMH

CDR<sub>H2</sub> MAT 12 к PD-1 (SEQ ID NO: 213): TIDPETGGTAYNQKFKG

CDR<sub>H3</sub> MAT 12 к PD-1 (SEQ ID NO: 214): ERITTVVEGAYWYFDV

[00169] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 12 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 211 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

cagggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc  
agtgacgctg tcctgcaagg cttcgggctt cacatttact gactatgaga  
tgcactgggt gaaacagaca cctgtgcatg gcctggaatg gattgggact



attgatcctg aaactggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggcaa  
ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac atggagctcc  
gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagagagagg  
attactacgg ttgttgaggg ggcatactgg tacttcgatg tctggggcac  
agggaccacg gtcaccgtct cctca

[00170] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 4 к PD-1 (SEQ ID NO: 215) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK  
LLICKVSTRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP  
YTFGGGKLE IK

CDR<sub>L1</sub> MAT 12 к PD-1 (SEQ ID NO: 217): RSSQNIVHSNNGNTYLE

CDR<sub>L2</sub> MAT 12 к PD-1 (SEQ ID NO: 218): KVSTRFS

CDR<sub>L3</sub> MAT 12 к PD-1 (SEQ ID NO: 219): FQGSHPYTT

[00171] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 12 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 216 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gatgttttga tgaccagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga  
tcaagcctcc atctcttgaa gatctagtca gaacattgta catagtaatg  
gaaacaccta tttagaatgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag  
ctcctgatct gcaaaagtttc cacccgattt tctgggggtcc cagacaggtt  
cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg  
aggctgagga tctgggagtt tattattgct ttcaaggttc acatgttccg  
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

## **М Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 13**

[00172] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 13 к PD-1 (SEQ ID NO: 220) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SHTMSWVRQT PEKRLEWVAT  
ISGGGSNIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCARQA  
YYGNYWYFDV WGTGTTVTVS S

CDR<sub>H1</sub> MAT 13 к PD-1 (SEQ ID NO: 222): SHTMS

CDR<sub>H2</sub> MAT 13 к PD-1 (SEQ ID NO: 223): TISGGGSNIYYPDSVKG

CDR<sub>H3</sub> MAT 13 к PD-1 (SEQ ID NO: 224): QAYYGNYWYFDV

[00173] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 13 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 221 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaagtgatgc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc  
cctgaaactc tctctgtgcag cctctggatt cactttcagt agccatacca  
tgtcttgggt tgc ccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcacc  
attagtgggtg gtggttctaa tatctactat ccagacagtg tgaagggtcg  
attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatga  
gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct  
tactacggta attactggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt  
cacgctctcc tcc

[00174] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 13 к PD-1 (SEQ ID NO: 225) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIQMTQSPAT QSASLGESVT ITCLASQTIG TWLAWYQQKP GKSPQLLIYA  
ATSLADGVPS RFGSGSGGTK FSEKISSLQA EDFVSYYCQQ LDSIPWTFGG GTKLEIK

CDR<sub>L1</sub> MAT 13 к PD-1 (SEQ ID NO: 227): LASQTIGTWLA

CDR<sub>L2</sub> MAT 13 к PD-1 (SEQ ID NO: 228): AATSLAD

CDR<sub>L3</sub> MAT 13 к PD-1 (SEQ ID NO: 229): QQLD SIPWT

[00175] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 13 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 226 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gacattcaga tgaccagtc tctctgccacc cagtctgcat ctctgggaga  
aagtgtcacc atcacgtgc c tggcaagtca gaccattggt acatgggttag  
catgggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct  
gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gtagtggatc  
tggcaca<sup>5</sup> ttttctttca agatcagcag cctacaggct gaagat<sup>5</sup>ttg  
taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcgggtgga  
ggcacc<sup>5</sup>aagc tggaaatcaa a

#### N Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 14

[00176] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 14 к PD-1 (SEQ ID NO: 230) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYNFI SYWITWVKQR PGQGLQWIGN  
IYPGTDGTTY NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MHLRRLTSED SAVYYCATGL  
HWYFDVWGTG TTVT<sup>5</sup>VSS

CDR<sub>H1</sub> MAT 14 к PD-1 (SEQ ID NO: 232): SYWIT  
CDR<sub>H2</sub> MAT 14 к PD-1 (SEQ ID NO: 233): NIYPGTDGTTYNEKFKS  
CDR<sub>H3</sub> MAT 14 к PD-1 (SEQ ID NO: 234): GLHWYFDV

[00177] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 14 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 231 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc  
agtgaagatg tcttgcaagg cttctggcta caacttcac agctactgga  
taacctgggt gaaacagagg cctggacaag gccttcagtg gattggaaat  
atttaccctg gtactgatgg tactacctac aatgagaagt tcaagagcaa  
ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac atgcacctca  
gtcgcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aactgggcta  
cactgggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc c

[00178] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 14 к PD-1 (SEQ ID NO: 235) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQSVG TNVAWYQQKP GQSPKALIYS  
ASSRFSGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFCQQ YNSYPYTFGG GTKLEIK

CDR<sub>L1</sub> MAT 14 к PD-1 (SEQ ID NO: 237): KASQSVGTNVA  
CDR<sub>L2</sub> MAT 14 к PD-1 (SEQ ID NO: 238): SASSRFS  
CDR<sub>L3</sub> MAT 14 к PD-1 (SEQ ID NO: 239): QQYNSYPYT

[00179] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 14 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 236 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga  
cagggtcagt gtcacctgca aggccagtca gagtgtgggt actaatgtag  
cctggtatca acagaagccc ggtcaatctc ctaaagcact gatttacttcg  
gcatcctccc gattcagtgg cgtccctgat cgcttcacag gcagtggatc  
tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct gaagacttgg  
cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg  
gggaccaagc tggaaataaa a

## **О Моноклональное антитело к PD-1 человека 15**

### **1 Мышиное моноклональное антитело к PD-1 человека 15**

[00180] Аминокислотная последовательность домена VH MAT 15 к PD-1 (SEQ ID NO: 240) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием).

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFIFS SYLISWVRQT PEKRLEWVAA  
ISGGGADTY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCTRRG  
TYAMDYWGQG TSVTVSS

CDR<sub>H1</sub> MAT 15 к PD-1 (SEQ ID NO: 242): SYLIS

CDR<sub>H2</sub> MAT 15 к PD-1 (SEQ ID NO: 243): AISGGGADTYADSVKG

CDR<sub>H3</sub> MAT 15 к PD-1 (SEQ ID NO: 244): RGTYAMDY

[00181] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VH MAT 15 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 241 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc  
cctgaaactc tctctgtgcag cctctggatt cattttcagt agctatctca  
tctcttgggt tgcagagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgctgcc  
attagtggtg gtgggtgctga cacctactat gccgacagtg tgaagggtcg  
attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat ctgcaaatga  
gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg  
acctatgcta tggactactg ggggtcaagga acctcagtc caagtcctc c

[00182] Аминокислотная последовательность домена VL MAT 15 к PD-1 (SEQ ID NO: 245) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIQMTQSPAS QSASLGESVT ITCLASQTIG TWLAWYQQKP GKSPQLLIYA  
ATSLADGVPS RFGSGSGGTK FSKISSLQA EDFVNYYCQQ LYSIPWTFGG GTKLEIK

CDR<sub>L1</sub> MAT 15 к PD-1 (SEQ ID NO: 247): LASQTIGTWLA

CDR<sub>L2</sub> MAT 15 к PD-1 (SEQ ID NO: 248): AATSLAD

CDR<sub>L3</sub> MAT 15 к PD-1 (SEQ ID NO: 249): QQLYSIPWT

[00183] Примерный полинуклеотид, который кодирует домен VL MAT 15 к PD-1, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 246 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>L</sub>, выделены подчеркиванием):

gacattcaga tgaccagtc tcccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga  
aagtgtcacc atcacatgc c tggcaagtca gaccattgg acatggtag  
catgggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctgagctcct gatttatgct  
gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gtagtggatc  
tggcacaanaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct gaagattttg  
taaattatta ctgtcaacaa ctttacagta ttccgtggac gttcgggtgga  
ggcaccaagc tggaaatcaa a

## 2 Гуманизация моноклонального антитела к PD-1 человека 15, чтобы получить «МАТ к чPD-1 15»

[00184] Вышеописанное мышинное моноклональное антитело к PD-1 человека было гуманизировано и дополнительно деиммунизировано после идентификации антигенных эпитопов, чтобы продемонстрировать возможность гуманизации антитела к PD-1 человека с целью уменьшения его антигенности при введении человеку-реципиенту. В результате гуманизации получили один гуманизированный домен VH, обозначенный в настоящем документе как «VH1 МАТ к чPD-1 2», и один гуманизированный домен VL, обозначенный в настоящем документе как «VL1 МАТ к чPD-1 1». Антитело, содержащее гуманизированный домен VL, спаренный с гуманизированным доменом VH, называется «МАТ к чPD-1 15».

[00185] Аминокислотная последовательность домена VH из VH1 МАТ к чPD-1 15 (SEQ ID NO: 250) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS SYLISWVRQA PGKGLEWVAA  
ISGGADTY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARRG  
TYAMDYWGQG TLVTVSS

[00186] Примерный полинуклеотид, который кодирует VH1 МАТ к чPD-1 15, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 251 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gaagtgcaac tggttgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtggttc  
actcagactg tcttgtgcag cttcaggctt tacattctcc tcttatctta  
tctcttgggt gcgccaagcc ccaggtaagg gccttgaatg ggtcgccgcc  
attagtgggg gtggtgccga tacatattat gccgacagcg tcaagggacg  
tttcaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac ctgcagatga  
actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc ccggcgcggg  
acttacgcta tggactattg gggccagggc accttgggtca ctgtctcacc c

[00187] Аминокислотная последовательность домена VH из VL1 МАТ к чPD-1 15 (SEQ ID NO: 252) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQTIG TWLAWYQQKP GKAPKLLIYA  
ATSLADGVPS RFGSGSGTD FTFTISLQP EDFATYYCQQ LYSIPWTFGQ GTKLEIK

[00188] Примерный полинуклеотид, который кодирует VL1 МАТ к чPD-1 15, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 253 (нуклеотиды, кодирующие остатки CDR<sub>H</sub>, выделены подчеркиванием):

gatatccaga tgaccagtc tcccagctct ctcagtgcaa gcgtaggcga  
ccgtgtgacc atcacctgtc tggccagtc gaccattgga acctggctcg

cctggtatca gcagaaacct ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc  
gccacctccc tcgcagatgg agtgcctcc cgatttagcg ggtccgggtc  
cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc gaggatttcg  
ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttggtcag  
ggtactaaac tggagatcaa a

## **V Моноклональные антитела к PD-1 человеку 1-15 и их производные, содержащие модифицированную область Fc**

[00189] При нормальном функционировании иммунной системы взаимодействие комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы приводит к широкому спектру ответов, начиная от эффекторных функций, таких как зависимость от антител цитотоксичность, дегрануляция тучных клеток и фагоцитоз, до иммуномодулирующих сигналов, таких как регулирование пролиферации лимфоцитов и секреции антител. Все указанные взаимодействия инициируются путем связывания области Fc антител или иммунных комплексов со специализированными поверхностными рецепторами клеток на кровяных клетках. Разнообразие клеточных ответов, вызванных антителами и иммунными комплексами, обусловлено структурной гетерогенностью трех рецепторов Fc: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) и Fc $\gamma$ RIII (CD16). Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIA (CD32A) и Fc $\gamma$ RIII (CD16) являются активирующими (т.е., усиливающими иммунную систему) рецепторами; Fc $\gamma$ RIIB (CD32B) является ингибирующим (т.е. ослабляющим иммунную систему) рецептором. Помимо этого взаимодействие с неонатальным рецептором Fc (FcRn) выступает посредником рециркуляции молекул IgG из эндосомы к поверхности клетки и высвобождения в кровь. Аминокислотная последовательность примерного IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1), IgG2 (SEQ ID NO: 2), IgG3 (SEQ ID NO: 3) и IgG4 (SEQ ID NO: 4) представлена ниже.

[00190] Модификация области Fc обычно приводит к измененному фенотипу, например, измененному периоду полувыведения из сыворотки крови, измененной стабильности, измененной восприимчивости к клеточным ферментам или измененной эффекторной функции. Желательной может быть модификация антитела или другой связывающей молекулы согласно настоящему изобретению в отношении эффекторной функции, например, для того чтобы повысить эффективность указанной молекулы в лечении рака. Снижение или устранение эффекторной функции является желательным в некоторых случаях, например, в случае антител, механизм действия которых включает блокирование или антагонистическое действие, но не лизис клеток, несущих антиген-мишень. Повышенная эффекторная функция обычно является желательной, когда она направлена на нежелательные клетки, такие как опухолевые и чужеродные клетки, в

которых Fc $\gamma$ R экспрессируются с низкими уровнями, например, опухолеспецифичные В-клетки с низким уровнем Fc $\gamma$ RIIB (например, неходжкинская лимфома, CLL и лимфома Беркитта). В указанных вариантах реализации молекулы согласно настоящему изобретению, которым придали или которые имеют измененную эффекторную функциональную активность, можно применять для лечения и/или предотвращения заболевания, расстройства или инфекции, при которых желательной является повышенная эффективность эффекторной функциональной активности.

[00191] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат область Fc, которая содержит одну или более модификаций (например, замен, делеций или вставок) в аминокислотной последовательности области Fc дикого типа (например, SEQ ID NO: 1), которые снижают аффинность и авидность области Fc, и, соответственно, молекулы согласно настоящему изобретению, в отношении одного или более рецепторов Fc $\gamma$ R. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения молекулы согласно настоящему изобретению содержат область Fc, которая содержит одну или более модификаций аминокислот области Fc дикого типа, которые увеличивают аффинность и авидность области Fc и, соответственно, молекулы согласно настоящему изобретению, в отношении одного или более рецепторов Fc $\gamma$ R. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения молекулы содержат вариант области Fc, причем указанный вариант придает или опосредует повышенную активность, связанную с антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ), и/или повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIA по сравнению с молекулой, не содержащей область Fc или содержащей область Fc дикого типа. В других вариантах реализации настоящего изобретения молекулы содержат вариант области Fc, причем указанный вариант придает или опосредует сниженную активность АЗКЦ (или другой эффекторной функции) и/или повышенное связывание с Fc $\gamma$ RIIB по сравнению с молекулой, не содержащей область Fc или содержащей область Fc дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации в область настоящего изобретения включены PD-1-связывающие молекулы, содержащие вариант области Fc, причем указанный вариант области Fc не проявляет детектируемого связывания с любым Fc $\gamma$ R по сравнению с сопоставимой молекулой, содержащей область Fc дикого типа. Согласно другим вариантам реализации в область настоящего изобретения включены PD-1-связывающие молекулы, содержащие вариант области Fc, причем указанный вариант области Fc связывается только с одним Fc $\gamma$ R, предпочтительно с одним из Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB или Fc $\gamma$ RIIA. Любое подходящее повышение аффинности и/или авидности предпочтительно оценивают путем измерения в условиях *in vitro* степени

детектируемого связывания с Fc $\gamma$ R или Fc $\gamma$ R-связанной активности в клетках, которые экспрессируют низкие уровни Fc $\gamma$ R, когда активность связывания исходной молекулы (без модифицированной области Fc) не поддается детектированию в клетках, или в клетках, которые экспрессируют целевые антигены, отличные от рецепторов Fc $\gamma$ , в плотности от 30000 до 20000 молекул/клетку, в плотности от 20000 до 10000 молекул/клетку, в плотности от 10000 до 5000 молекул/клетку, в плотности от 5000 до 1000 молекул/клетку, в плотности от 1000 до 200 молекул/клетку или в плотности 200 молекул/клетку или менее (но не менее 10, 50, 100 или 150 молекул/клетку).

[00192] PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать вариант области Fc, имеющий измененную аффинность в отношении активирующего и/или ингибирующего рецептора Fc $\gamma$ . Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD-1-связывающая молекула содержит вариант области Fc, который имеет повышенную аффинность в отношении Fc $\gamma$ R1B и сниженную аффинность в отношении Fc $\gamma$ R1A и/или Fc $\gamma$ R1A по сравнению с сопоставимой молекулой, содержащей область Fc дикого типа. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения PD-1-связывающая молекула согласно настоящему изобретению, содержит вариант области Fc, который имеет уменьшенную аффинность в отношении Fc $\gamma$ R1B и повышенную аффинность в отношении Fc $\gamma$ R1A и/или Fc $\gamma$ R1A по сравнению с сопоставимой молекулой, содержащей область Fc дикого типа. В другом варианте реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат вариант области Fc, который имеет уменьшенную аффинность в отношении Fc $\gamma$ R1B и уменьшенную аффинность в отношении Fc $\gamma$ R1A и/или Fc $\gamma$ R1A по сравнению с сопоставимой молекулой, содержащей область Fc дикого типа. В другом варианте реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат вариант области Fc, который имеет неизменную аффинность в отношении Fc $\gamma$ R1B и уменьшенную (или повышенную) аффинность в отношении Fc $\gamma$ R1A и/или Fc $\gamma$ R1A относительно сопоставимой молекулы, содержащей область Fc дикого типа.

[00193] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат вариант области Fc, имеющий измененную аффинность в отношении Fc $\gamma$ R1A и/или Fc $\gamma$ R1A, так, что иммуноглобулин обладает повышенной эффекторной функцией. Неограничивающие примеры эффекторных функций клеток включают антитело-зависимую клеточную цитотоксичность, антитело-зависимый фагоцитоз, фагоцитоз, опсонизацию,



опсонофагоцитоз, связывание клеток, образование розеток, связывание с компонентом комплемента C1q и комплемент-зависимую клеточную цитотоксичность.

[00194] В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения аффинность или эффекторная функция изменяется по меньшей мере в 2 раза, предпочтительно по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз по сравнению с сопоставимой молекулой, содержащей область Fc дикого типа. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения вариант области Fc $\gamma$  иммуноспецифично связывается с одним или более FcR с величиной аффинности, которая по меньшей мере на 65%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225% или 250% превышает аффинность молекулы, содержащей область Fc дикого типа. Такие измерения могут представлять собой количественные исследования в условиях *in vivo* или *in vitro*, и в предпочтительном варианте представляют собой количественные исследования в условиях *in vitro*, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) или поверхностный плазмонный резонанс.

[00195] Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат вариант области Fc, причем указанный вариант является агонистом по меньшей мере одного вида активности рецептора Fc $\gamma$ R или является антагонистом по меньшей мере одного вида активности рецептора Fc $\gamma$ R. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения молекулы содержат вариант, который является антагонистом одного или более видов активности Fc $\gamma$ RIIB, например, опосредуемой В-клетками передачи сигналов, активации В-клеток, пролиферации В-клеток, выработки антител, внутриклеточного притока кальция в В-клетки, прогрессирования клеточного цикла, Fc $\gamma$ RIIB-опосредуемого ингибирования передачи сигналов с участием Fc $\epsilon$ RI, фосфорилирования Fc $\gamma$ RIIB, привлечения SHIP, фосфорилирования SHIP и связывания с Shc, или активности одной или более молекул последующих каскадов реакций (например, MAP-киназы, JNK, p38 или Akt) в пути передачи сигнала с участием Fc $\gamma$ RIIB. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат вариант, который является агонистом одного или более видов активности Fc $\epsilon$ RI, например, активации тучных клеток, мобилизации кальция, дегрануляции, выработки цитокинов или высвобождения серотонина.

[00196] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекулы содержат область Fc, содержащую области из двух или более изотипов IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). В настоящей заявке область Fc, как полагают, имеет конкретный изотип IgG, если ее аминокислотная последовательность наиболее гомологична указанному изотипу относительно других изотипов IgG. Различные изотипы IgG проявляют различные физические и функциональные свойства, включая период полувыведения из сыворотки крови, связывание комплемента, аффинность связывания в отношении Fc $\gamma$ R и активность эффекторных функций (например, АЗКЦ, КЗЦ и т. д.), вследствие различий в аминокислотных последовательностях шарнирной области и/или области Fc, например, как описано в Flesch and Neppert (1999) *J. Clin. Lab. Anal.* 14:141-156; Chappel *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 33:25124-25131; Chappel *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:9036-9040; или Brüggemann *et al.* (1987) *J. Exp. Med* 166:1351-1361. Указанный тип варианта области Fc $\gamma$  можно применять по отдельности, или в комбинации с модификацией аминокислот, для воздействия на Fc-опосредуемую эффекторную функцию и/или активность связывания. В случае использования в комбинации, модификация аминокислоты и шарнирная область/область Fc IgG могут проявлять сходную функциональность (например, повышенную аффинность в отношении Fc $\gamma$ РПА) и могут действовать аддитивно или, более предпочтительно, синергически, чтобы модифицировать эффекторную функциональность в молекуле согласно настоящему изобретению, по сравнению с молекулой согласно настоящему изобретению, которая содержит область Fc дикого типа. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения модификация аминокислот и область Fc IgG могут проявлять противоположную функциональность (например, повышение и уменьшение аффинности в отношении Fc $\gamma$ РПА, соответственно) и могут селективно регулировать или снижать специфичную функциональность в молекуле согласно настоящему изобретению, по сравнению с молекулой согласно настоящему изобретению, не содержащей область Fc или содержащей область Fc дикого типа такого же изотипа.

[00197] В предпочтительном конкретном варианте реализации PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат вариант области Fc, причем указанный вариант области Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, по сравнению с областью Fc дикого типа, так, что указанная молекула имеет измененную аффинность в отношении FcR, при условии, что указанный вариант области Fc не содержит замену в положениях, которые непосредственно вступают в контакт с Fc $\gamma$ R, на основании данных кристаллографического и структурного анализа взаимодействий Fc-FcR, таких как те, которые описаны Sonderrmann *et al.* (2000) *Nature*

406:267-73. Примеры положений в области Fc, которые непосредственно вступают в контакт с FcγR, представляют собой остатки аминокислот 234-239, остатки аминокислот 265-269 (петля В/С), остатки аминокислот 297-299 (петля С'/Е) и остатки аминокислот 327-332 (петля F/G). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекулы согласно настоящему изобретению содержат варианты области Fc, содержащие модификацию по меньшей мере одного остатка, который не вступает в непосредственный контакт с FcγR, на основании данных структурного и кристаллографического анализа, например, находится вне сайта связывания Fc-FcγR.

[00198] Варианты области Fc хорошо известны в данной области техники, и любой известный вариант области Fc может быть использован согласно настоящему изобретению для придания или модификации эффекторной функции, проявляемой молекулой согласно настоящему изобретению, содержащей область Fc (или ее часть), в соответствии с данными функциональных исследований, например, в НК-зависимом или независимом от макрофагов количественном исследований. Например, варианты области Fc, идентифицированные как варианты, изменяющие эффекторную функцию, раскрыты в РСТ публикациях WO 04/063351; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; и WO 2008/140603, и любой подходящий вариант, раскрытый в указанных публикациях, можно применять в молекулах согласно настоящему изобретению.

[00199] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат вариант области Fc, содержащий одну или более модификаций аминокислот в одной или более областях, модификация (модификации) которых изменяет (относительно области Fc дикого типа) соотношение величин аффинности варианта области Fc в пользу активирующего FcγR (например, FcγRIIA или FcγRIIA) относительно ингибирующего FcγR (такого как FcγRIIB):

Соотношение величин аффинности = Изменение аффинности варианта Fc, относительно дикого типа, в пользу активирующего FcγR/Изменение аффинности варианта Fc, относительно дикого типа, в пользу ингибирующего FcγR

[00200] Особенно предпочтительными являются PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению, которые содержат вариант области Fc (по сравнению с областью Fc дикого типа), в которых вариант области Fc имеет соотношение величин аффинности больше 1. Указанные молекулы особенно полезны в обеспечении терапевтического или профилактического лечения заболевания, расстройства или инфекции или улучшения ее симптома, когда желательной является повышенная

эффективность эффекторной функции клеток (например, АЗКЦ), опосредуемой FcγR, например, при раке или инфекционном заболевании. Напротив, вариант области Fc, имеющий соотношение величин аффинности меньше 1, вызывает уменьшение эффективности эффекторной функции клеток. В таблице 1 приведены примерные одинарные, двойные, тройные, четырехкратные и пятикратные мутации, независимо от того, характерно для них соотношение величин аффинности больше или меньше 1.

<b>Таблица 1</b>				
<b>Типичные одинарные и множественные мутации, перечисленные в соответствии с соотношением величин аффинности</b>				
<b>Одинарная</b>	<b>Двойная</b>	<b>Тройная</b>	<b>Четырехкратная</b>	<b>Пятикратная</b>
<b>Соотношение величин аффинности &gt;1</b>				
F243L	F243L и R292P	F243L, P247L и N421K	L234F, F243L, R292P и Y300L	L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L
D270E	F243L и Y300L	F243L, R292P и Y300L	L235I, F243L, R292P и Y300L	L235P, F243L, R292P, Y300L и P396L
R292G	F243L и P396L	F243L, R292P и V305I	L235Q, F243L, R292P и Y300L	F243L, R292P, V305I, Y300L и P396L
R292P	D270E и P396L	F243L, R292P и P396L	F243L, P247L, D270E и N421K	
	R292P и Y300L	F243L, Y300L и P396L	F243L, R255L, D270E и P396L	
	R292P и V305I	P247L, D270E и N421K	F243L, D270E, G316D и R416G	
	R292P и P396L	R255L, D270E и P396L	F243L, D270E, K392T и P396L	
	Y300L и P396L	D270E, G316D и R416G	F243L, D270E, P396L и Q419H	
	P396L и Q419H	D270E, K392T и P396L	F243L, R292P, Y300L, и P396L	
		D270E, P396L и Q419H	F243L, R292P, V305I и P396L	
		V284M, R292L и K370N	P247L, D270E, Y300L и N421K	
		R292P, Y300L и	R255L, D270E,	

<b>Таблица 1</b>				
<b>Типичные одинарные и множественные мутации, перечисленные в соответствии с соотношением величин аффинности</b>				
<b>Одинарная</b>	<b>Двойная</b>	<b>Тройная</b>	<b>Четырехкратная</b>	<b>Пятикратная</b>
		P396L	R292G и P396L	
			R255L, D270E, Y300L и P396L	
			D270E, G316D, P396L и R416G	
<b>Соотношение величин аффинности &lt;1</b>				
Y300L	F243L и P396L	F243L, R292P и V305I		
P396L	P247L и N421K			
	R255L и P396L			
	R292P и V305I			
	K392T и P396L			
	P396L и Q419H			

[00201] Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения варианты области Fc содержат любые модификации аминокислот (например, замены) в любом из положений 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328 или 330 и предпочтительно один или более из следующих остатков: A240, I240, L241, L243, H244, N298, I328 или V330. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения варианты области Fc содержат любые модификации аминокислот (например, замены) в любом из положений 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439 и предпочтительно один или более из следующих остатков: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300 или L300.

[00202] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения варианты области Fc, которые связываются с FcγR с измененной аффинностью, содержат

любые модификации аминокислот (например, замены) в любом из положений 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Предпочтительно вариант области Fc содержит любой из следующих остатков: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 или A430.

[00203] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения варианты области Fc, которые связываются с FcγR (посредством своей области Fc) со сниженной аффинностью, содержат любые модификации аминокислот (например, замены) в любом из положений 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 или 439.

[00204] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения варианты области Fc, которые связываются с FcγR (посредством своей области Fc) с повышенной аффинностью, содержат любые модификации аминокислот (например, замены) в любом из положений 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 или 430. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения варианты области Fc, которые связываются с FcγR1A с повышенной аффинностью, содержат любой из следующих остатков: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 или A430.

[00205] Предпочтительные варианты содержат одну или более модификаций в любом из положений: 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 или 332.

[00206] Особенно предпочтительные варианты содержат одну или более модификаций, выбранных из групп A-AI:

A	228E, 228K, 228Y или 228G;
B	230A, 230E, 230Y или 230G;
C	231E, 231K, 231Y, 231P или 231G;
D	232E, 232K, 232Y, 232G;
E	233D;

F	234I или 234F;
G	235D, 235Q, 235P, 235I или 235V;
H	239D, 239E, 239N или 239Q;
I	240A, 240I, 240M или 240T;
J	243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H или 243I;
K	244H;
L	245A;
M	247G, 247V или 247L;
N	262A, 262E, 262I, 262T, 262E или 262F;
O	263A, 263I, 263M или 263T;
P	264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T или 264W;
Q	265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265V, 265N или 265Q;
R	266A, 266I, 266M или 266T;
S	271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I, 271F, 271M, 271Y, 271W или 271G;
T	273I;
U	275L или 275W;
V	281D, 281K, 281Y или 281P;
W	284E, 284N, 284T, 284L, 284Y или 284M;
X	291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I или 291G;
Y	299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W или 299Y;
Z	302I;
AA	304D, 304N, 304T, 304H или 304L
AB	305I;
AC	313F;
AD	323I;
AE	325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T, 325V, 325Y, 325W или 325P;
AF	328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328A, 328E, 328F, 328H, 328M или 328N;
AG	330L, 330Y, 330I или 330V;
AH	332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F, 332M, 332W, 332P, 332G или 332Y; и

AI	336E, 336K или 336Y
----	---------------------

[00207] Еще более предпочтительные варианты содержат одну или более модификаций, выбранных из групп 1-105:

Группа	Вариант	Группа	Вариант
1	A330L/I332E	54	S239D/D265L/N297D/I332E
2	D265F/N297E/I332E	55	S239D/D265T/N297D/I332E
3	D265Y/N297D/I332E	56	S239D/D265V/N297D/I332E
4	D265Y/N297D/T299L/I332E	57	S239D/D265Y/N297D/I332E
5	F241E/F243Q/V262T/V264F	58	S239D/I332D
6	F241E/F243Q/V262T/V264E/ I332E	59	S239D/I332E
7	F241E/F243R/V262E/V264R	60	S239D/I332E/A330I
8	F241E/F243R/V262E/V264R/ I332E	61	S239D/I332N
9	F241E/F243Y/V262T/V264R	62	S239D/I332Q
10	F241E/F243Y/V262T/V264R/ I332E	63	S239D/N297D/I332E
11	F241L/F243L/V262I/V264I	64	S239D/N297D/I332E/A330Y
12	F241L/V262I	65	S239D/N297D/I332E/A330Y/F241S/F243H/V262T/V264T
13	F241R/F243Q/V262T/V264R	66	S239D/N297D/I332E/K326E
14	F241R/F243Q/V262T/V264R/ I332E	67	S239D/N297D/I332E/L235D
15	F241W/F243W/V262A/V264A	68	S239D/S298A/I332E
16	F241Y/F243Y/V262T/V264T	69	S239D/V264I/A330L/I332E
17	F241Y/F243Y/V262T/V264T/ N297D/I332E	70	S239D/V264I/I332E
18	F243L/V262I/V264W	71	S239D/V264I/S298A/I332E
19	P243L/V264I	72	S239E/D265N
20	L328D/I332E	73	S239E/D265Q
21	L328E/I332E	74	S239E/I332D
22	L328H/I332E	75	S239E/I332E



Группа	Вариант	Группа	Вариант
23	L328I/I332E	76	S239E/I332N
24	L328M/I332E	77	S239E/I332Q
25	L328N/I332E	78	S239E/N297D/I332E
26	L328Q/I332E	79	S239E/V264I/A330Y/I332 E
27	L328T/I332E	80	S239E/V264I/I332 E
28	L328V/I332E	81	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
29	N297D/A330Y/I332E	82	S239N/A330L/I332E
30	N297D/I332E	83	S239N/A330Y/I332E
31	N297D/I332E/S239D/A330L	84	S239N/I332D
32	N297D/S298A/A330Y/I 332E	85	S239N/I332E
33	N297D/T299L/I332E	86	S239N/I332N
34	N297D/T299F/I332E/N297D/ T299H/I332E	87	S239N/I332Q
35	N297D/T299I/I332E	88	S239N1S298A/I332E
36	N297D/T299L/I332E	89	S239Q/I332D
37	N297D/T299V/I332E	90	S239Q/I332E
38	N297E/I332E	91	S239Q/I332N
39	N297S/I332E	92	S239Q/I332Q
40	P230A/E233D/I332E	93	S239Q/V264I/I332E
41	P244H/P245A/P247V	94	S298A/I332E
42	S239D/A330L/I332E	95	V264E/N297D/I332E
43	S239D/A330Y/I332E	96	V264I/A330L/I332E
44	S239D/A330Y/I332E/K326E	97	V264I/A330Y/I332E
45	S239D/A330Y/I332E/K326T	98	V264I/I332E
46	S239D/A330Y/I332E/L234I	99	V264I/S298A/I332E
47	S239D/A330Y/I332E/L235D	100	Y296D/N297D/I332E
48	S239D/A330Y/I332E/V240I	101	Y296E/N297D/I332 E
49	S239D/A330Y/I332E/V264T	102	Y296H/N297D/I332E
50	S239D/A330Y/I332E/V266I	103	Y296N/N297D/I332E
51	S239D/D265F/N297D/I332E	104	Y296Q/N297I/I332E
52	S239D/D265H/N297D/I332E	105	Y296T/N297D/I332E
53	S239D/D265I/N297D/I332E		

[00208] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD-1-связывающая молекула согласно настоящему изобретению будет содержать вариант области Fc, содержащий по меньшей мере одну модификацию в области Fc. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант области Fc содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L.

[00209] Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения вариант области Fc содержит:

(A) по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L;

(B) по меньшей мере две замены, выбранные из группы, состоящей из:

(1) F243L и P396L;

(2) F243L и R292P; и

(3) R292P и V305I;

(C) по меньшей мере три замены, выбранные из группы, состоящей из:

(1) F243L, R292P и Y300L;

(2) F243L, R292P и V305I;

(3) F243L, R292P и P396L; и

(4) R292P, V305I и P396L;

(D) по меньшей мере четыре замены, выбранные из группы, состоящей из:

(1) F243L, R292P, Y300L и P396L; и

(2) F243L, R292P, V305I и P396L; или

(E) по меньшей мере пять замен, выбранных из группы, состоящей из:

(1) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L; и

(2) L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L.

[00210] В другом конкретном варианте реализации настоящего изобретения вариант области Fc содержит замены:

(A) F243L, R292P и Y300L;

(B) L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L; или

(C) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L.

[00211] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD-1-связывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит вариант области Fc, который проявляет уменьшенное (или по существу отсутствующее) связывание с Fc $\gamma$ RIA (CD64), Fc $\gamma$ RIIA (CD32A), Fc $\gamma$ RIIB (CD32B), Fc $\gamma$ RIIIA (CD16a) или Fc $\gamma$ RIIIB (CD16b) (по сравнению со связыванием, проявляемым областью Fc IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1)).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD-1-связывающая молекула согласно настоящему изобретению будет содержать вариант области Fc, которая проявляет сниженное (или по существу отсутствующее) связывание с FcγR (например, FcγRIIIA) и сниженную (или по существу отсутствующую) эффекторную функцию АЗКЦ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант области Fc содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из L234A, L235A, D265A, N297Q и N297G. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения вариант области Fc содержит замену L234A; L235A; L234A и L235A; D265A; N297Q или N297G.

[00212] Предпочтительные последовательности IgG1 для доменов CH2 и CH3 PD-1-связывающих молекул согласно настоящему изобретению будут содержать замены L234A/L235A (SEQ ID NO: 5):

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMNE  
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[00213] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения PD-1-связывающая молекула согласно настоящему изобретению содержит область Fc, которая по своей природе проявляет уменьшенное (или по существу отсутствующее) связывание с FcγRIIIA (CD16a) и/или сниженную эффекторную функцию (по сравнению со связыванием, проявляемым Fc IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1)). Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения PD-1-связывающая молекула согласно настоящему изобретению не содержит область Fc IgG2 (SEQ ID NO: 2) или область Fc IgG4, (SEQ ID NO: 4). В случае использования области Fc IgG4, в область настоящего изобретения также включено введение стабилизирующей мутации, такой как замена S228P шарнирной области IgG4 (см., например, SEQ ID NO: 13: ESKYGPPCPCP, (Lu *et al.*, (2008) «*The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation*», J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969), чтобы уменьшить частоту обмена нитей. Другие стабилизирующие мутации, известные в данной области техники, могут быть введены в область Fc IgG4 (Peters, P *et al.*, (2012) «*Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability*», J. Biol. Chem., 287:24525-24533; PCT публикация патента WO 2008/145142).

[00214] Согласно другим вариантам реализации в область настоящего изобретения включено применение любого варианта области Fc, известного в данной области техники, такого как те, которые раскрыты в Jefferis, B.J. *et al.* (2002) «*Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcγR: Current Models*», *Immunol. Lett.* 82:57-65; Presta, L.G. *et al.* (2002) «*Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function*», *Biochem. Soc. Trans.* 30:487-90; Idusogie, E.E. *et al.* (2001) «*Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement*», *J. Immunol.* 166:2571-75; Shields, R.L. *et al.* (2001) «*High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc Gamma RI, Fc Gamma RII, Fc Gamma RIII, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R*», *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604; Idusogie, E.E. *et al.* (2000) «*Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc*», *J. Immunol.* 164:4178-84; Reddy, M.P. *et al.* (2000) «*Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4*», *J. Immunol.* 164:1925-1933; Xu, D. *et al.* (2000) «*in vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies*», *Cell. Immunol.* 200:16-26; Armour, K.L. *et al.* (1999) «*Recombinant human IgG Molecules Lacking FcγR Binding And Monocyte Triggering Activities*», *Eur. J. Immunol.* 29:2613-24; Jefferis, R. *et al.* (1996) «*Modulation Of Fc(γ)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions*», *Immunol. Lett.* 54:101-04; Lund, J. *et al.* (1996) «*Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains*», *J. Immunol.* 157:4963-4969; Hutchins *et al.* (1995) «*Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H*», *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 92:11980-84; Jefferis, R. *et al.* (1995) «*Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation*», *Immunol. Lett.* 44:111-17; Lund, J. *et al.* (1995) «*Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors*», *FASEB J.* 9:115-19; Alegre, M.L. *et al.* (1994) «*A Non-Activating «Humanized» Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties in vivo*», *Transplantation* 57:1537-1543; Lund *et al.* (1992) «*Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11*», *Mol. Immunol.* 29:53-59; Lund *et al.* (1991) «*Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG*», *J. Immunol.* 147:2657-2662; Duncan, A.R. *et al.* (1988) «*Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG*», *Nature* 332:563-564; патентах США №№5624821; 5885573; 6194551; 7276586; и 7317091; и РСТ публикациях WO 00/42072 и РСТ WO 99/58572.

[00215] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекулы согласно настоящему изобретению дополнительно содержат один или более сайтов гликозилирования так, что один или более углеводных фрагментов ковалентно присоединены к молекуле. Предпочтительно молекулы согласно настоящему изобретению, содержащие один или более сайтов гликозилирования и/или одну или более модификаций в области Fc, обеспечивают или обладают повышенной эффекторной функцией, опосредуемой антителом, например, повышенной активностью АЗКЦ, по сравнению с немодифицированным антителом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены молекулы, содержащие одну или более модификаций аминокислот, которые, как известно, непосредственно или косвенно взаимодействуют с углеводным фрагментом области Fc, включая, но не ограничиваясь ими, аминокислоты в положениях 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 и 301. Аминокислоты, которые прямо или косвенно взаимодействуют с углеводным фрагментом области Fc, известны в данной области техники, см., например, Jefferis *et al.*, 1995 *Immunology Letters*, 44: 111-7, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

[00216] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложены молекулы, которые были модифицированы путем введения одного или более сайтов гликозилирования в один или более сайтов молекул, предпочтительно без изменения функциональности молекул, например, активности связывания с антиген-мишенью или FcγR. Сайты гликозилирования могут быть введены в переменную и/или константную область молекул согласно настоящему изобретению. В настоящей заявке термин «сайты гликозилирования» включает любую конкретную аминокислотную последовательность в антителе, к которой будет специфично или ковалентно прикреплен олигосахарид (т.е., углеводы, содержащие два или более простых сахара, соединенных вместе). Олигосахаридные боковые цепи, как правило, присоединены к остову антитела посредством N- или O-связей. N-связанное гликозилирование относится к присоединению олигосахаридного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению олигосахаридного фрагмента к гидроксиаминокислоте, например, серину, треонину. Молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать один или более сайтов гликозилирования, включая N-связанные и O-связанные сайты гликозилирования. Любой сайт гликозилирования для N-связанного или O-связанного гликозилирования, известный в данной области техники, может быть использован в соответствии с настоящим изобретением. Примерный N-связанный сайт гликозилирования, который можно применять в соответствии со

способами согласно настоящему изобретению, представляет собой аминокислотную последовательность: Asn-X-Thr/Ser, в которой X может представлять собой любую аминокислоту, и Thr/Ser означает треонин или серин. Подходящий сайт или сайты могут быть введены в молекулу согласно настоящему изобретению с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение (см., например, *in vitro* MUTAGENESIS, RECOMBINANT DNA: A SHORT COURSE, J. D. Watson, *et al.* W.H. Freeman and Company, New York, 1983, chapter 8, pp. 106-116, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки. Примерный способ введения сайта гликозилирования в молекулу согласно настоящему изобретению может включать: модификацию или мутирование аминокислотной последовательности молекулы так, чтобы получить желательную последовательность Asn-X-Thr/Ser.

[00217] Согласно некоторым вариантам реализации согласно настоящему изобретению предложены способы модификации содержания углеводов в молекуле согласно настоящему изобретению путем добавления или удаления сайта гликозилирования. Способы модификации содержания углеводов в антителах (и молекулах, содержащих домены антител, например, область Fc) хорошо известны в данной области техники и включены в область настоящего изобретения, см., например, патент США №6218149; EP 0359096 B1; публикацию патента США US 2002/0028486; WO 03/035835; публикацию патента США 2003/0115614; патент США №6218149; патент США №6472511; все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно другим вариантам реализации согласно настоящему изобретению предложены способы модификации содержания углеводов в молекуле согласно настоящему изобретению путем удаления одного или более эндогенных углеводных фрагментов молекулы. Согласно конкретному варианту реализации согласно настоящему изобретению предложено смещение сайта гликозилирования области Fc антитела путем модификации положений, смежных с 297. Согласно конкретному варианту реализации согласно настоящему изобретению предложена модификация положения 296 так, что положение 296, но не положение 297, является гликозилированным.

[00218] Эффекторная функция также может быть модифицирована с помощью методик, таких как введение одного или более остатков цистеина в область Fc, обеспечивая тем самым возможность образования межцепочечной дисульфидной связи в указанной области с получением гомодимерного антитела, которое может иметь улучшенную способность к интернализации и/или повышенную комплемент-зависимую цитотоксичность и АЗКЦ (Caron, P.C. *et al.* (1992) «*Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies*», J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shopes, B. (1992) «A

*Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity*», J. Immunol. 148(9):2918-2922. Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью также могут быть получены с использованием гетеробифункциональных сшивающих агентов, описанных в Wolff, E.A. *et al.* (1993) «*Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice*», Cancer Research 53:2560-2565. В другом варианте, антитело может быть модифицировано для включения двух областей Fc и, соответственно, может иметь повышенную активность комплемент-опосредованной цитотоксичности и АЗКЦ (Stevenson, G.T. *et al.* (1989) «*A Chimeric Antibody With Dual Fc Regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge*», Anti-Cancer Drug Design 3:219-230)

[00219] Период полувыведения из сыворотки крови молекул согласно настоящему изобретению, содержащих области Fc, может быть увеличен за счет увеличения аффинности связывания области Fc в отношении FcRn. В настоящей заявке термин «период полувыведения» означает фармакокинетическое свойство молекулы, которое является мерой среднего времени существования молекул после их введения. Период полувыведения может быть выражен как время, необходимое для выведения пятидесяти процентов (50%) известного количества молекулы из организма субъекта (например, пациента-человека или другого млекопитающего) или конкретного компартмента его организма, например, при измерении в сыворотке крови, т.е., период полувыведения из кровотока, или в других тканях. В целом, увеличение периода полувыведения приводит к увеличению среднего времени удержания (MRT) в кровотоке для введенной молекулы.

[00220] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат вариант области Fc, причем указанный вариант области Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, по сравнению с областью Fc дикого типа, так, что указанная молекула имеет увеличенный период полувыведения (по сравнению с областью Fc дикого типа).

[00221] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат вариант области Fc, причем указанный вариант области Fc содержит замену аминокислоты, которая увеличивает период полувыведения, в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435 и 436. Многочисленные специфичные мутации, способные увеличивать период полувыведения молекулы, содержащей область Fc, известны в данной области техники и включают, например, M252Y, S254T, T256E и их комбинации. Например, см. мутации,

описанные в патентах США №№6277375, 7083784; 7217797, 8088376; публикации заявок на патент США 2002/0147311; 2007/0148164; и международные публикации WO 98/23289; WO 2009/058492; и WO 2010/033279, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Молекулы, содержащие область Fc, с увеличенным периодом полувыведения также включают те, которые содержат замены в двух или более остатках области Fc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 и 436. В частности, указанные молекулы содержат две или более замен, выбранных из: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K и Y436I.

[00222] Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения вариант области Fc содержит замены:

- (A) M252Y, S254T и T256E;
- (B) M252Y и S254T;
- (C) M252Y и T256E;
- (D) T250Q и M428L;
- (E) T307Q и N434A;
- (F) A378V и N434A;
- (G) N434A и Y436I;
- (H) V308P и N434A; или
- (I) K288D и H435K.

[00223] В область настоящего изобретения дополнительно включены варианты областей Fc, которые содержат:

- (A) одну или более мутаций, которые изменяют эффекторную функцию и/или FcγR; и
- (B) одну или более мутаций, которые увеличивают период полувыведения из сыворотки крови.

#### **VI Биспецифические молекулы, связывающие PD-1 человека**

[00224] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены биспецифические связывающие молекулы, которые способны связываться с «первым эпитопом» и «вторым эпитопом», причем указанный первый эпитоп представляет собой эпитоп PD-1 человека, и указанный второй эпитоп аналогичен или отличается от эпитопа PD-1, или представляет собой эпитоп другой молекулы, который присутствует на поверхности иммунной клетки (такой как Т-лимфоцит) и участвует в регулировании контрольной точки иммунного ответа. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения второй эпитоп представляет собой эпитоп B7-H3, B7-H4, BTLA, CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, галектина-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS,



ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, ГКГС класса I или II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 или VISTA. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения второй эпитоп не является эпитопом PD-1. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения второй эпитоп представляет собой CD137, CTLA-4, LAG-3, OX40, TIGIT или TIM-3. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифическая молекула содержит более двух сайтов связывания эпитопов. Указанные биспецифические молекулы могут связывать два или более различных эпитопов LAG-3 и по меньшей мере один эпитоп молекулы, которая отлична от LAG-3.

[00225] В область настоящего изобретения включены биспецифические антитела, способные одновременно связываться с PD-1 и вторым эпитопом (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, ГКГС класса I или II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т. д.). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифическое антитело, способное одновременно связываться с PD-1 и вторым эпитопом, получают с использованием любого из способов, описанных в РСТ публикациях WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873 и WO 2014/022540, каждая из которых полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

#### **А Биспецифические диатела, не содержащие области Fc**

[00226] Согласно одному варианту реализации согласно настоящему изобретению предложены биспецифические диатела, которые содержат, и наиболее предпочтительно состоят из них, первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, последовательности которых обеспечивают ковалентное связывание указанных полипептидных цепей друг с другом с образованием ковалентно связанного диатела, которое способно одновременно связываться с первым эпитопом и вторым эпитопом, причем указанные эпитопы не идентичны друг другу. Соответственно, указанные биспецифические диатела содержат домены «VL1»/«VH1», которые способны связываться с первым эпитопом, и домены «VL2»/«VH2», которые способны связываться со вторым эпитопом. Обозначение «VL1» и «VH1» означает, соответственно, переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые связываются с «первым» эпитопом, указанного биспецифического диатела. Аналогичным

образом, обозначение «VL2» и «VH2» означает, соответственно, переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые связываются со «вторым» эпитопом, указанного биспецифического диатела. Вне зависимости от того, обозначен ли конкретный эпитоп как первый и второй эпитоп; такое обозначение имеет отношение только к присутствию и ориентации доменов полипептидных цепей связывающих молекул согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один из указанных эпитопов представляет собой эпитоп PD-1, и другой из указанных эпитопов не является эпитопом PD-1 (например, эпитоп B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, ГКГС класса I или II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т. д.).

[00227] Домен VL первой полипептидной цепи взаимодействует с доменом VH второй полипептидной цепи с образованием первого функционального антигенсвязывающего сайта, который специфичен в отношении первого антигена (т. е. PD-1 или антигена, который содержит второй эпитоп). Аналогичным образом, домен VL второй полипептидной цепи взаимодействует с доменом VH первой полипептидной цепи с образованием второго функционального антигенсвязывающего сайта, который специфичен в отношении второго антигена (т.е., антигена, который содержит второй эпитоп, или PD-1). Следовательно, выбор доменов VL и VH первой и второй полипептидных цепей скоординирован так, что две полипептидные цепи диатела в совокупности содержат домены VL и VH, способные связываться как с эпитопом PD-1, так и со вторым эпитопом (т. е. они содержат  $VL_{PD-1}/VH_{PD-1}$  и  $VL_2/VH_2$ , где PD-1 представляет собой «первый» эпитоп, или  $VL_1/VH_1$  и  $VL_{PD-1}/VH_{PD-1}$ , где PD-1 представляет собой «второй» эпитоп).

[00228] Первая полипептидная цепь варианта реализации указанных биспецифических диател содержит, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL1 моноклонального антитела, способный связываться с первым или вторым эпитопом (т. е.,  $VL_{PD-1}$  или  $VL_{\text{эпитоп 2}}$ ), первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), домен VH2 моноклонального антитела, способный связываться со вторым эпитопом (если указанная первая полипептидная цепь содержит  $VL_{PD-1}$ ) или первым эпитопом (если указанная первая полипептидная цепь содержит  $VL_{\text{эпитоп 2}}$ ), второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), необязательно содержащий остаток цистеина, домен, способствующий образованию гетеродимера, и C-конец (Фигура 1).

[00229] Вторая полипептидная цепь указанного варианта реализации биспецифических диател содержит, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL2 моноклонального антитела, способный связываться с PD-1 или вторым эпитопом

(т.е., VL<sub>PD-1</sub> или VL<sub>эпитоп 2</sub>, и при этом указанный домен VL не является подходящим для включения в первую полипептидную цепь диатела), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH1 моноклонального антитела, способный связываться со вторым эпитопом (если указанная вторая полипептидная цепь содержит VL<sub>PD-1</sub>) или PD-1 (если указанная вторая полипептидная цепь содержит VL<sub>эпитоп 2</sub>), второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), необязательно содержащий остаток цистеина, домен, способствующий образованию гетеродимера, и С-конец (Фигура 1).

[00230] Наиболее предпочтительно длина промежуточного линкерного пептида (например, линкера 1), который разделяет указанные домены VL и VH, выбрана так, чтобы по существу или полностью препятствовать связыванию доменов VL и VH полипептидной цепи друг с другом. Соответственно, домены VL и VH первой полипептидной цепи по существу или полностью неспособны связываться друг с другом. Аналогичным образом, домены VL и VH второй полипептидной цепи по существу или полностью неспособны связываться друг с другом. Предпочтительный промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) содержит последовательность, представленную в (SEQ ID NO: 14): GGGSGGGG.

[00231] Длина и состав второго промежуточного линкерного пептида (линкера 2) выбраны на основании выбора доменов, стимулирующих образование гетеродимера. Как правило, второй промежуточный линкерный пептид (линкер 2) будет содержать 3-20 остатков аминокислот. В частности, если домены, способствующие образованию гетеродимера, не содержат остаток цистеина, используют второй промежуточный линкерный пептид, содержащий цистеин (линкер 2). Второй промежуточный линкерный пептид, содержащий цистеин (линкер 2), будет содержать 1, 2, 3 или более остатков цистеина. Предпочтительный цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15: GGCGGG. В другом варианте, линкер 2 не содержит цистеин (например, GGG, GGGS (SEQ ID NO: 29), LGGGSG (SEQ ID NO: 261), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 262), ASTKG (SEQ ID NO: 30), LEPKSS (SEQ ID NO: 33), APSSS (SEQ ID NO: 34), и т.д.), и используется цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера, описанный ниже. Необязательно, может быть использован цистеинсодержащий линкер 2 и цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера.

[00232] Домены, способствующие образованию гетеродимера, могут представлять собой (SEQ ID NO: 16) или VEPKSC (SEQ ID NO: 17), или AEPKSC (SEQ ID NO: 18) на одной полипептидной цепи, и GFNRGEC (SEQ ID NO: 19) или FNRGEC (SEQ ID NO: 20) на другой полипептидной цепи (US2007/0004909).

[00233] Более предпочтительно, однако, домены, способствующие образованию гетеродимера, указанных диалел образованы одним, двумя, тремя или четырьмя тандемно повторяющимися спиральными доменами противоположного заряда, которые содержат последовательность из по меньшей мере шести, по меньшей мере семи или по меньшей мере восьми остатков аминокислот, так, что домен, способствующий образованию гетеродимера, обладает общим зарядом (Apostolovic, B. *et al.* (2008) «*pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil*», *Biomacromolecules* 9:3173–3180; Arndt, K.M. *et al.* (2001) «*Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain*», *J. Molec. Biol.* 312:221-228; Arndt, K.M. *et al.* (2002) «*Comparison of in vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils*», *Structure* 10:1235-1248; Boucher, C. *et al.* (2010) «*Protein Detection By Western Blot Via Coiled–Coil Interactions*», *Analytical Biochemistry* 399:138-140; Cachia, P.J. *et al.* (2004) «*Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*», *J. Mol. Recognit.* 17:540-557; De Crescenzo, G.D. *et al.* (2003) «*Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding*», *Biochemistry* 42:1754-1763; Fernandez-Rodriquez, J. *et al.* (2012) «*Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag*», *Protein Science* 21:511-519; Ghosh, T.S. *et al.* (2009) «*End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures*», *Acta Crystallographica D* 65:1032-1041; Grigoryan, G. *et al.* (2008) «*Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions*», *Curr. Opin. Struc. Biol.* 18:477-483; Litowski, J.R. *et al.* (2002) «*Designing Heterodimeric Two-Stranded  $\alpha$ -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And  $\alpha$ -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity*», *J. Biol. Chem.* 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. *et al.* (2012) «*The d'--d--d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'--a--a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif*», *J. Amer. Chem. Soc.* 134(5):2626–2633; Straussman, R. *et al.* (2007) «*Kinking the Coiled Coil – Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface*», *J. Molec. Biol.* 366:1232-1242; Tripet, B. *et al.* (2002) «*Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance*», *J. Molec. Biol.* 323:345–362; Woolfson, D.N. (2005) «*The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies*», *Adv. Prot. Chem.* 70:79-112; Zeng, Y. *et al.* (2008) «*A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism*», *J. Gene Med.* 10:355-367).

[00234] Указанные повторяющиеся спиральные домены могут быть точными повторами или могут содержать замены. Например, спиральный домен из домена, стимулирующего образование гетеродимера, первой полипептидной цепи может содержать последовательность из восьми остатков аминокислот, выбранную для придания отрицательного заряда указанному домену, стимулирующему образованию гетеродимера, и спиральный домен из домена, стимулирующего образование гетеродимера, второй полипептидной цепи может содержать последовательность из восьми остатков аминокислот, отобранных для придания положительного заряда указанному домену, стимулирующему образованию гетеродимера. Вне зависимости от того, какая спираль предусмотрена для первой или второй полипептидных цепей, предусмотрено, что для другой полипептидной цепи используется спираль противоположного заряда. Положительно заряженная аминокислота может представлять собой лизин, аргинин, гистидин и т. д. и/или отрицательно заряженная аминокислота может представлять собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту и т. д. Положительно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой лизин и/или отрицательно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой глутаминовую кислоту. Возможно использование только одного домена, стимулирующего образование гетеродимера, (поскольку указанный домен будет ингибировать гомодимеризацию и тем самым способствовать гетеродимеризации), однако предпочтительно, чтобы первая и вторая полипептидные цепи диател согласно настоящему изобретению содержали домены, способствующие образованию гетеродимера.

[00235] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения один из доменов, стимулирующих образование гетеродимера, будет содержать четыре тандемных спиральных домена «Е-спираль» (SEQ ID NO: 21: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), в которых остатки глутамата будут придавать отрицательный заряд при pH=7, в то время как другие домены, стимулирующие образование гетеродимера, будут содержать четыре тандемных домена «К-спираль» (SEQ ID NO: 22: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE), в которых остатки лизина будут придавать положительный заряд при pH=7. Присутствие указанных заряженных доменов способствует ассоциации первого и второго полипептидов и, соответственно, способствует образованию гетеродимера. Особенно предпочтительным является домен, способствующий образованию гетеродимера, в котором один из четырех тандемных спиральных доменов «Е-спираль», содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, был модифицирован для включения остатка цистеина: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 23). Аналогичным образом, особенно

предпочтительным является домен, способствующий образованию гетеродимера, в котором один из четырех tandemных спиральных доменов «К-спираль», содержащий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22, был модифицирован для включения остатка цистеина: KVAAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 24).

[00236] Как раскрыто в WO 2012/018687, для того чтобы улучшить фармакокинетические свойства диател в условиях *in vivo*, диатело может быть модифицировано, чтобы содержать полипептидную часть сывороточного связывающего белка на одном или более концах диатела. Наиболее предпочтительно указанная полипептидная часть сывороточного связывающего белка будет встроена на С-конце диатела. Альбумин является самым распространенным белком в плазме крови и имеет период полувыведения 19 дней у человека. Альбумин содержит несколько сайтов связывания небольших молекул, которые позволяют ему нековалентно связываться с другими белками и тем самым продлевать их периоды полувыведения из сыворотки крови. Альбуминсвязывающий домен 3 (ABD3) белка G штамма *Streptococcus* G148 состоит из 46 остатков аминокислот, образующих стабильный трехвинтовой жгут, и обладает широкой альбуминсвязывающей специфичностью (Johansson, M.U. *et al.* (2002) «*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules*», J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). Соответственно, особенно предпочтительная полипептидная часть сывороточного связывающего белка для улучшения фармакокинетических свойств диатела в условиях *in vivo* представляет собой альбуминсвязывающий домен (ABD) из стрептококкового белка G и более предпочтительно альбуминсвязывающий домен 3 (ABD3) белка G штамма *Streptococcus dysgalactiae* G148 (SEQ ID NO: 25): LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

[00237] Как раскрыто в WO 2012/162068 (который включен в настоящую заявку посредством ссылки), «деиммунизированные» варианты, содержащие последовательность SEQ ID NO: 25, способны ослаблять или устранять связывание с ГКГС класса II. Исходя из результатов комбинированных мутаций, следующие комбинации замен рассматривают как предпочтительные замены для получения указанного деиммунизированного ABD: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. Варианты ABD содержат модификации L64A, I65A и D79A или модификации N66S, T70S и D79A. Варианты деиммунизированного ABD, содержащего аминокислотную последовательность:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLID<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub> A<sub>71</sub>EGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO: 26),

или аминокислотную последовательность:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIS<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub> VEGVKALIAA<sub>79E</sub> ILAALP (SEQ ID NO: 27),

или аминокислотную последовательность:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIS<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub> VEGVKALIAA<sub>79E</sub> ILAALP (SEQ ID NO: 28),

являются особенно предпочтительными, поскольку указанные деиммунизированные ABD проявляют по существу связывание дикого типа, обеспечивая при этом ослабленное связывание с ГКГС класса II. Соответственно, первая полипептидная цепь указанного диатела, содержащего ABD, содержит пептидный линкер, предпочтительно расположенный на С-конце относительно содержащего Е-спираль (или К-спираль) домена указанной полипептидной цепи, так, чтобы указанный линкер находился между содержащим Е-спираль (или К-спираль) доменом и ABD (который предпочтительно представляет собой деиммунизированный ABD). Предпочтительная последовательность для указанного линкерного пептида представляет собой последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29: GGGG.

## **В Биспецифические диатела, содержащие области Fc**

[00238] Согласно одному варианту реализации согласно настоящему изобретению предложены биспецифические диатела, содержащие область Fc, способную одновременно связываться с PD-1 и вторым эпитопом (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, ГКГС класса I или II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3 и т. д.). Добавление домена CH2-CH3 IgG к одной или обоим полипептидным цепям антитела так, что соединение цепей диатела приводит к образованию области Fc, увеличивает биологический период полувыведения и/или изменяет валентность диатела. Включение доменов CH2-CH3 IgG в оба полипептида диатела обеспечит образование двухцепочечного биспецифического диатела, содержащего область Fc (Фигура 2).

[00239] В другом варианте, включение доменов CH2-CH3 IgG только в один из полипептидов диатела обеспечит образование более сложного четырехцепочечного биспецифического диатела, содержащего область Fc (Фигуры 3А-3С). На Фигуре 3С представлено типичное четырехцепочечное диатело, содержащее константный домен легкой цепи (CL) и константный домен тяжелой цепи CH1, однако в качестве альтернативы могут быть использованы фрагменты указанных доменов, а также другие

полипептиды (см., например, Фигуры 3А и 3В, публикации патентов США 2013-0295121; 2010-0174053 и 2009-0060910; публикацию европейского патента EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 и PCT публикации WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Следовательно, например, вместо домена CH1 можно применять пептид, содержащий аминокислотную последовательность GVPEPKSC (SEQ ID NO: 16), VEPEPKSC (SEQ ID NO: 17) или AEPEPKSC (SEQ ID NO: 18), полученную из шарнирного домена IgG человека, и вместо домена CL можно применять 6 С-концевых аминокислот легкой каппа-цепи человека GFNRGEC (SEQ ID NO: 19) или FNRGEC (SEQ ID NO: 20). Типичное четырехцепочечное диатело, содержащее пептид, представлено на Фигуре 3А. В другом варианте или, в дополнение, можно применять пептид, содержащий тандемные спиральные домены противоположного заряда, такие как спиральные домены «Е-спираль» (SEQ ID NO: 21: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK или SEQ ID NO: 23: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); и домены «К-спираль» (SEQ ID NO: 22: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE или SEQ ID NO: 24: KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE). Типичный спиральный домен, входящий в состав четырехцепочечного диатела, представлен на Фигуре 3В.

[00240] Молекулы диател, содержащих области Fc, согласно настоящему изобретению обычно содержат дополнительные промежуточные линкерные пептиды (линкеры). Как правило, дополнительные линкеры будут содержать 3-20 остатков аминокислот. Дополнительные или альтернативные линкеры, которые могут быть использованы в молекулах антител, содержащих область Fc, согласно настоящему изобретению, включают: GGGG (SEQ ID NO: 29), LGGGG (SEQ ID NO: 261), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 262), ASTKG (SEQ ID NO: 30), DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 31), EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 32), LEPKSS (SEQ ID NO: 33), APSSS (SEQ ID NO: 34), и APSSSPME (SEQ ID NO: 35), LEPKSADKTHTCPPC (SEQ ID NO: 36), GGC и GGG. SEQ ID NO: 33 можно использовать вместо GGG или GGC, чтобы облегчить клонирование. Помимо этого непосредственно после аминокислот GGG или последовательности, представленной в SEQ ID NO: 33, может быть расположена последовательность, представленная в SEQ ID NO: 31, с образованием альтернативных линкеров: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 263); и LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 37). Молекула диатела, содержащая область Fc, согласно настоящему изобретению может содержать шарнирную область IgG в дополнение или вместо линкера. Примерная шарнирная область содержит: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 32) из IgG1, ERKCCVECP (SEQ ID NO: 11) из IgG2, ESKYGPPCP (SEQ ID NO: 12) из IgG4 и



ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 13) и вариант шарнирной области IgG4, содержащий стабилизирующую замену для уменьшения обмена нитей.

[00241] Как показано на Фигуре 3А-3С, диатела согласно настоящему изобретению могут содержать четыре разные цепи. Первая и третья полипептидные цепи указанного диатела содержат три домена: (i) домен, содержащий VL1, (ii) домен, содержащий VH2, (iii) домен, способствующий образованию гетеродимера, и (iv) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Вторая и четвертая полипептидные цепи содержат: (i) домен, содержащий VL2, (ii) домен, содержащий VH1, и (iii) домен, способствующий образованию гетеродимера, причем домены, способствующие образованию гетеродимера, способствуют димеризации первой/третьей полипептидных цепей со второй/четвертой полипептидными цепями. Домены VL и/или VH третьей и четвертой полипептидных цепей, а также домены VL и/или VH первой и второй полипептидных цепей могут быть одинаковыми или различными, чтобы обеспечить четырехвалентное связывание, которое является моноспецифичным, биспецифическим или тетраспецифичным. Обозначение «VL3» и «VH3» означает, соответственно, переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые связываются с «третьим» эпитопом, указанного диатела. Аналогичным образом, обозначение «VL4» и «VH4» означает, соответственно, переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые связываются с «четвертым» эпитопом, указанного диатела. Общая структура полипептидных цепей типичных четырехцепочечных диател, содержащих область Fc, согласно настоящему изобретению представлена в таблице 2:

<b>Таблица 2</b>		
Биспецифическое диатело	2 цепь	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 цепь	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	1 цепь	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	2 цепь	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
Тетраспецифичное диатело	2 цепь	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 цепь	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3 цепь	NH <sub>2</sub> -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	4 цепь	NH <sub>2</sub> -VL4-VH3-HPD-COOH

HPD = домен, способствующий образованию гетеродимера.

[00242] Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения диатела согласно настоящему изобретению являются биспецифическими, четырехвалентными (т.е., содержат четыре эпитопсвязывающих сайта), Fc-содержащими диателами (Фигуры 3А-3С), которые состоят из четырех полных полипептидных цепей. Биспецифические четырехвалентные диатела, содержащие область Fc, согласно настоящему изобретению содержат два эпитопсвязывающих сайта, иммунологически специфичных в отношении PD-1 (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом PD-1 или с различными эпитопами PD-1), и два эпитопсвязывающих сайта, специфичных в отношении второго эпитопа (например, В7-Н3, В7-Н4, ВТLА, CD40, CD80, CD86, CD137, СТLА-4, ICOS, KIR, LAG-3, ГКГС класса I или II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.).

[00243] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения биспецифические диатела, содержащие области Fc, могут содержать три полипептидные цепи. Первый полипептид указанного диатела содержит три домена: (i) домен, содержащий VL1, (ii) домен, содержащий VH2, и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Второй полипептид указанных диател содержит: (i) домен, содержащий VL2, (ii) домен, содержащий VH1, и (iii) домен, который стимулирует гетеродимеризацию и образование ковалентной связи с первой полипептидной цепью диатела. Третий полипептид указанных диател содержит последовательность CH2-CH3. Соответственно, первая и вторая полипептидные цепи указанных диател связываются друг с другом с образованием сайта связывания VL1/VH1, который способен связываться с первым эпитопом, а также сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом. Первый и второй полипептиды связаны друг с другом посредством дисульфидной связи, включающей остатки цистеина в их соответствующих третьих доменах. Примечательно, что первая и третья полипептидные цепи соединяются друг с другом с образованием области Fc, которая стабилизируется посредством дисульфидной связи. Указанные диатела обладают повышенной эффективностью. На Фигурах 4А и 4В представлены структуры указанных диател. Указанные биспецифические диатела, содержащие область Fc, могут иметь одну из двух ориентаций (таблица 3):

<b>Таблица 3</b>		
Первая ориентация	3 цепь	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH
	1 цепь	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH
	2 цепь	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
Вторая ориентация	3 цепь	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH

	1 цепь	NH2-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	2 цепь	NH2-VL2-VH1-HPD-COOH

HPD = домен, способствующий образованию гетеродимера.

[00244] Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения диатела согласно настоящему изобретению являются биспецифическими, двухвалентными (т.е., содержат два эпитопсвязывающих сайта), Fc-содержащими диателами (Фигуры 4А-4В), которые состоят из трех полных полипептидных цепей. Биспецифические, двухвалентные Fc-содержащие диатела согласно настоящему изобретению содержат один сайт связывания эпитопа, иммунологически специфичный в отношении PD-1, и один сайт связывания эпитопа, специфичный в отношении второго эпитопа (например, B7-Н3, B7-Н4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, ГКГС класса I или II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т. д.).

[00245] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения биспецифические диатела, содержащие области Fc, могут содержать в общей сложности пять полипептидных цепей. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения две из указанных пяти полипептидных цепей содержат одинаковую аминокислотную последовательность. Первая полипептидная цепь указанных диател содержит: (i) домен, содержащий VH1, (ii) домен, содержащий CH1, и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Первая полипептидная цепь может представлять собой тяжелую цепь антитела, которая содержит VH1 и константную область тяжелой цепи. Вторая и пятая полипептидные цепи указанных диател содержат: (i) домен, содержащий VL1, и (ii) домен, содержащий CL. Вторая и/или пятая полипептидные цепи указанных диател могут представлять собой легкие цепи антитела, которое содержит VL1, комплементарный VH1 первой/третьей полипептидной цепи. Первая, вторая и/или пятая полипептидные цепи могут быть выделены из природных антител. В другом варианте, они могут быть сконструированы рекомбинантно. Третья полипептидная цепь указанных диател содержит: (i) домен, содержащий VH1, (ii) домен, содержащий CH1, (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3, (iv) домен, содержащий VL2, (v) домен, содержащий VH3, и (vi) домен, способствующий образованию гетеродимера, причем домены, способствующие образованию гетеродимера, способствуют димеризации третьей цепи с четвертой цепью. Четвертый полипептид указанных диател содержит: (i) домен, содержащий VL3, (ii) домен, содержащий VH2, и (iii) домен, который способствует гетеродимеризации и образованию ковалентной связи с третьей полипептидной цепью диатела.

[00246] Соответственно, первая и вторая, а также третья и пятая, полипептидные цепи указанных диател связываются с образованием двух сайтов связывания VL1/VH1, способных связываться с первым эпитопом. Третья и четвертая полипептидные цепи указанных диател связываются с образованием сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом, а также сайтом связывания VL3/VH3, который способен связываться с третьим эпитопом. Первый и третий полипептиды связываются друг с другом посредством дисульфидной связи, включающей остатки цистеина в их соответствующих константных областях. Примечательно, что первая и третья полипептидные цепи соединяются друг с другом с образованием области Fc. Указанные диатела обладают повышенной эффективностью. На Фигуре 5 представлена структура указанных диател. Следует понимать, что домены VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3 могут быть одинаковыми или различными так, чтобы обеспечить связывание, которое является моноспецифичным, биспецифическим или триспецифичным. Однако, как указано в настоящем документе, указанные домены предпочтительно выбраны так, чтобы связываться с PD-1 и вторым эпитопом (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, ГКГС класса I или II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т. д.).

[00247] Домены VL и VH полипептидных цепей выбраны так, чтобы образовывать сайты связывания VL/VH, специфичные в отношении желательного эпитопа. Сайты связывания VL/VH, образованные при связывании полипептидных цепей, могут быть одинаковыми или различными, чтобы обеспечить тетравалентное связывание, которое является моноспецифичным, биспецифическим, триспецифичным или тетраспецифичным. В частности, домены VL и VH могут быть выбраны так, что биспецифическое антитело может содержать два сайта связывания для первого эпитопа и два сайта связывания для второго эпитопа или три сайта связывания для первого эпитопа и один сайт связывания для второго эпитопа, или два сайта связывания для первого эпитопа, один сайт связывания для второго эпитопа и один сайт связывания для третьего эпитопа (как показано на Фигуре 5). Общая структура полипептидных цепей типичных пятицепочечных диател, содержащих область Fc, представлена в таблице 4:

Таблица 4		
Биспецифическое диатело (2×2)	2 цепь	NH2-VL1-CL-COOH
	1 цепь	NH2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3 цепь	NH2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH
	5 цепь	NH2-VL1-CL-COOH

	4 цепь	NH2-VL2-VH2-HPD-COOH
Биспецифическое диатело (3×1)	2 цепь	NH2-VL1-CL-COOH
	1 цепь	NH2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3 цепь	NH2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	5 цепь	NH2-VL1-CL-COOH
	4 цепь	NH2-VL2-VH1-HPD-COOH
Триспецифичное диатело (2×1×1)	2 цепь	NH2-VL1-CL-COOH
	1 цепь	NH2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3 цепь	NH2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH
	5 цепь	NH2-VL1-CL-COOH
	4 цепь	NH2-VL3-VH2-HPD-COOH

HPD = домен, способствующий образованию гетеродимера.

[00248] Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения диатела согласно настоящему изобретению являются биспецифическими четырехвалентными (т.е. содержат четыре эпитопсвязывающих сайта) диателами, содержащими область Fc, которые состоят из пяти полных полипептидных цепей, содержащих два сайта связывания для первого эпитопа и два сайта связывания для второго эпитопа. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения биспецифические четырехвалентные диатела, содержащие область Fc, согласно настоящему изобретению содержат два эпитопсвязывающих сайта, иммунологически специфичных в отношении PD-1 (которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом PD-1 или с различными эпитопами PD-1), и два эпитопсвязывающих сайта, специфичных в отношении второго эпитопа (например, B7-H3, B7-H4, VTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 ГКГС класса I или II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения биспецифические четырехвалентные диатела, содержащие область Fc, согласно настоящему изобретению содержат три эпитопсвязывающих сайта, иммунологически специфичных в отношении PD-1, которые могут быть способны связываться с одним и тем же эпитопом PD-1 или с различными эпитопами PD-1), и один эпитопсвязывающий сайт, специфичный в отношении второго эпитопа (например, B7-H3, B7-H4, VTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 ГКГС класса I или II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т.д.). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения биспецифические четырехвалентные диатела, содержащие область Fc, согласно настоящему изобретению содержат один эпитопсвязывающий сайт, иммунологически специфичный в отношении PD-1, и три эпитопсвязывающих сайта, специфичных в

отношении второго эпитопа (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 ГКГС класса I или II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т. д.).

### **С Биспецифические трехвалентные связывающие молекулы, содержащие области Fc**

[00249] Согласно другому варианту реализации согласно настоящему изобретению предложены биспецифические трехвалентные связывающие молекулы, содержащие область Fc, способные одновременно связываться с первым эпитопом, вторым эпитопом и третьим эпитопом, причем по меньшей мере один из указанных эпитопов не идентичен другому. Соответственно, указанные биспецифические диатела содержат домены «VL1»/«VH1», которые способны связываться с первым эпитопом, домены «VL2»/«VH2», которые способны связываться со вторым эпитопом, и домены «VL3»/«VH3», которые способны связываться с третьим эпитопом. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или два из указанных эпитопов представляют собой эпитоп PD-1, и другой (или другие) из указанных эпитопов не является эпитопом PD-1 (например, эпитоп B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, ГКГС класса I или II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3 и т. д.). Указанные биспецифические трехвалентные связывающие молекулы содержат три эпитопсвязывающих сайта, два из которых являются связывающими доменами, характерными для диател, которые обеспечивают сайт связывания А и сайт связывания В, и один из которых является связывающим доменом, не характерным для диател, который обеспечивает сайт связывания С (см., например, Фигуры 6А-6F и РСТ заявку: РСТ/US15/33081; и РСТ/US15/33076).

[00250] Как правило, трехвалентные связывающие молекулы согласно настоящему изобретению будут содержать четыре различные полипептидные цепи (см. Фигуры 6А-6В), однако молекулы могут содержать меньшее или большее количество полипептидных цепей, например, путем гибридизации указанных полипептидных цепей друг с другом (например, посредством пептидной связи) или путем деления указанных полипептидных цепей с образованием дополнительных полипептидных цепей или путем связывания меньшего количества или дополнительных полипептидных цепей посредством дисульфидных связей. На Фигурах 6В-6F проиллюстрирован данный аспект настоящего изобретения путем схематического представления указанных молекул, содержащих три полипептидные цепи. Как показано на Фигурах 6А-6F, трехвалентные связывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут иметь альтернативные ориентации, в которых связывающие домены, характерные для диател, являются N-концевыми (Фигуры 6А, 6С и 6D) или С-концевыми (Фигуры 6В, 6Е и 6F) относительно области Fc.

[00251] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первая полипептидная цепь указанных трехвалентных связывающих молекул согласно настоящему изобретению содержит: (i) домен, содержащий VL1, (ii) домен, содержащий VH2, (iii) домен, способствующий образованию гетеродимера, и (iv) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Домены VL1 и VL2 будут расположены в направлении N-конца или C-конца относительно домена, содержащего CH2-CH3, как представлено в таблице 5 (Фигуры 6A и 6B). Вторая полипептидная цепь указанных вариантов реализации содержит: (i) домен, содержащий VL2, (ii) домен, содержащий VH1, и (iii) домен, способствующий образованию гетеродимера. Третья полипептидная цепь указанных вариантов реализации содержит: (i) домен, содержащий VH3, (ii) домен, содержащий CH1, и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Третья полипептидная цепь может представлять собой тяжелую цепь антитела, которая содержит VH3 и константную область тяжелой цепи. Четвертый полипептид указанных вариантов реализации содержит: (i) домен, содержащий VL3, и (ii) домен, содержащий CL. Четвертая полипептидная цепь может представлять собой легкую цепь антитела, которая содержит VL3, комплементарный VH3 третьей полипептидной цепи. Третья или четвертая полипептидные цепи могут быть выделены из природных антител. В другом варианте, они могут быть сконструированы с помощью рекомбинантных, синтетических или других способов.

[00252] Вариабельные домены легкой цепи первой и второй полипептидных цепей отделены от вариабельных доменов тяжелой цепи указанных полипептидных цепей промежуточным спейсерным линкером, длина которого недостаточна для соединения их доменов VL1/VH2 (или VL2/VH1) с образованием эпитопсвязывающего сайта, способного связываться с любым из первого или второго эпитопов. Предпочтительный промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) для этой цели содержит последовательность, представленную в (SEQ ID NO: 14): GGGSGGGG. Другие домены трехвалентных связывающих молекул могут быть разделены одним или более промежуточными спейсерными пептидами, необязательно содержащими остаток цистеина. Примерные линкеры, пригодные для получения трехвалентных связывающих молекул, предложены в настоящем документе и также предложены в PCT заявке: PCT/US15/33081; и PCT/US15/33076. Соответственно, первая и вторая полипептидные цепи указанных трехвалентных связывающих молекул соединяются с образованием сайта связывания VL1/VH1, способного связываться с первым эпитопом, а также сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом. Третья и четвертая полипептидные цепи указанных трехвалентных связывающих молекул

соединяются с образованием сайта связывания VL3/VH3, который способен связываться с третьим эпитопом. Следует понимать, что домены VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3 могут быть одинаковыми или различными так, чтобы обеспечить связывание, которое является моноспецифичным, биспецифическим или триспецифичным.

[00253] Как описано выше, трехвалентные связывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать три полипептида. Трехвалентные связывающие молекулы, содержащие три полипептидные цепи, могут быть получены путем присоединения доменов четвертого полипептида к N-концу VH3-содержащего домена третьего полипептида. В другом варианте, используется третья полипептидная цепь трехвалентной связывающей молекулы согласно настоящему изобретению, содержащая следующие три домена: (i) домен, содержащий VL3, (ii) домен, содержащий VH3, и (iii) домен, содержащий CH2-CH3, причем VL3 и VH3 отделены друг от друга промежуточным спейсерным пептидом, который является достаточно длинным (содержит по меньшей мере 9 или более аминокислотных остатков), чтобы обеспечить возможность соединения указанных доменов с образованием эпитопсвязывающего сайта.

[00254] Следует понимать, что домены VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3 могут быть одинаковыми или различными так, чтобы обеспечить связывание, которое является моноспецифичным, биспецифическим или триспецифичным. Однако в настоящем документе указанные домены предпочтительно выбраны так, чтобы связываться с PD-1 и вторым эпитопом (или вторым и третьим эпитопом) (предпочтительно указанные эпитопы представляют собой эпитопы B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 ГКГС класса I или II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т. д.).

[00255] В частности, домены VL и VH могут быть выбраны так, что трехвалентная связывающая молекула содержит два сайта связывания для первого эпитопа и один сайт связывания для второго эпитопа или один сайт связывания для первого эпитопа и два сайта связывания для второго эпитопа, или один сайт связывания для первого эпитопа, один сайт связывания для второго эпитопа и один сайт связывания для третьего эпитопа. Общая структура полипептидных цепей типичных трехвалентных связывающих молекул согласно настоящему изобретению представлена на Фигурах 6A-6F и в таблице 5:

Таблица 5		
Четыре цепи 1 ориентация	2 цепь	NH2-VL2-VH1-HPD-COOH
	1 цепь	NH2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3 цепь	NH2-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	4 цепь	NH2-VL3-CL-COOH



Четыре цепи 2 ориентация	2 цепь	NH2-VL2-VH1-HPD-COOH
	1 цепь	NH2 -CH2-CH3--VL1-VH2-HPD COOH
	3 цепь	NH2-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	4 цепь	NH2-VL3-CL-COOH
Три цепи 1 ориентация	2 цепь	NH2-VL2-VH1-HPD-COOH
	1 цепь	NH2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3 цепь	NH2-VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
Три цепи 2 ориентация	2 цепь	NH2-VL2-VH1-HPD-COOH
	1 цепь	NH2 -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD COOH
	3 цепь	NH2-VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH

HPD = домен, способствующий образованию гетеродимера.

[00256] Согласно одному варианту реализации согласно настоящему изобретению предложены биспецифические трехвалентные связывающие молекулы, которые содержат два эпитопсвязывающих сайта для PD-1 и один эпитопсвязывающий сайт для второго эпитопа, присутствующего на молекуле, отличной от PD-1 (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, ГКГС класса I или II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т. д.). Два эпитопсвязывающих сайта для PD-1 могут связываться с одним и тем же эпитопом или различными эпитопами. Согласно другому варианту реализации согласно настоящему изобретению предложены биспецифические трехвалентные связывающие молекулы, которые содержат один эпитопсвязывающий сайт для PD-1 и два эпитопсвязывающих сайта, которые связываются со вторым антигеном, присутствующим на молекуле, отличной от PD-1 (например, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, ГКГС класса I или II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3 и т. д.). Два эпитопсвязывающих сайта для второго антигена могут связываться с одним и тем же эпитопом или различными эпитопами антигена (например, с одинаковыми или различными эпитопами LAG-3). Как указано выше, указанные биспецифические трехвалентные связывающие молекулы могут содержать три или четыре полипептидные цепи.

## **VII Константные домены и области Fc**

[00257] Согласно настоящему изобретению предложены константные домены антитела, которые можно применять в получении PD-1-связывающих молекул (например, антител, диател, трехвалентных связывающих молекул и т. д.) согласно настоящему изобретению.

[00258] Предпочтительный домен CL представляет собой домен CL легкой каппа-цепи IgG человека. Аминокислотная последовательность примерного домена CL легкой

каппа-цепи человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 8):

```
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG  
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
```

[00259] В другом варианте примерный домен CL представляет собой домен CL лямбда-цепи IgG человека. Аминокислотная последовательность примерного домена CL лямбда-цепи человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 9):

```
QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA  
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP  
TECS
```

[00260] Согласно настоящему изобретению PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать область Fc. Область Fc указанных молекул согласно настоящему изобретению может быть любого изотипа (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать домен CH1 и/или шарнирную область. Если домен CH1 и/или шарнирная область присутствуют в указанных молекулах, то они могут быть любого изотипа (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) и предпочтительно имеют тот же изотип, что и желательная область Fc.

[00261] Примерный домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG1 человека. Аминокислотная последовательность примерного домена CH1 IgG1 человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 10):

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV
```

[00262] Примерный домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG2 человека. Аминокислотная последовательность примерного домена CH1 IgG2 человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 257):

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV
```

[00263] Примерный домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG4 человека. Аминокислотная последовательность примерного домена CH1 IgG4 человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 254):

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV
```

[00264] Одна примерная шарнирная область представляет собой шарнирную область IgG1 человека. Аминокислотная последовательность примерной шарнирной области IgG1 человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 32): EPKSCDKTHTCPSPCR.

[00265] Другая примерная шарнирная область представляет собой шарнирную область IgG2 человека. Аминокислотная последовательность примерной шарнирной области IgG2 человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 11): ERKCCVESPSPCR.

[00266] Другая примерная шарнирная область представляет собой шарнирную область IgG4 человека. Аминокислотная последовательность примерной шарнирной области IgG4 человека представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 12): ESKYGPPCPSPCR. Как описано в настоящем документе, шарнирная область IgG4 может содержать стабилизирующую мутацию, такую как замена S228P. Аминокислотная последовательность типичной стабилизированной шарнирной области IgG4 представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 13): ESKYGPPCPPSPCR.

[00267] Область Fc молекул, содержащих область Fc (например, антител, диател и трехвалентных молекул), согласно настоящему изобретению может представлять собой полную область Fc (например, полную область Fc IgG) или только фрагмент области Fc. Необязательно, область Fc молекул, содержащих область Fc, согласно настоящему изобретению не имеет С-концевого аминокислотного остатка лизина. В частности, область Fc молекул, содержащих область Fc, согласно настоящему изобретению может представлять собой модифицированный вариант области Fc. Несмотря на то, что область Fc биспецифических молекул, содержащих области Fc, согласно настоящему изобретению может быть способна связываться с одним или более рецепторами Fc (например, FcγR), более предпочтительно указанный вариант области Fc имеет измененные характеристики связывания с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого областью Fc дикого типа) или будет иметь существенно сниженную или отсутствующую способность связываться с ингибирующим рецептором. Соответственно, область Fc молекул, содержащих область Fc, согласно настоящему изобретению может содержать некоторые или все домены CH2 и/или некоторые или все домены CH3 полной области Fc или может содержать вариант последовательности CH2 и/или вариант последовательности CH3 (который может содержать, например, одну или более вставок и/или одну или более делеций по отношению к доменам CH2 или CH3 полной области

Fc). Указанные области Fc могут содержать участки полипептида, отличные от области Fc, или могут содержать части областей Fc, которые в природных условиях не являются полными, или могут содержать неприродные ориентации доменов CH2 и/или CH3 (такие как, например, два домена CH2 или два домена CH3, или, в направлении от N-конца к C-концу, домен CH3, соединенный с доменом CH2, и т. д.).

[00268] Модификации области Fc, идентифицированные как изменяющие эффекторную функцию, известны в данной области техники, включая модификации, которые увеличивают связывание с активирующими рецепторами (например, FcγRIIA (CD16A) и уменьшают связывание с ингибирующими рецепторами (например, FcγRIIB (CD32B) (см., например, Stavenhagen, J.B. *et al.* (2007) «*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells in vitro And Controls Tumor Expansion in vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors*», *Cancer Res.* 57(18):8882-8890). Примерные варианты областей Fc IgG1 человека со сниженным связыванием с CD32B и/или повышенным связыванием с CD16A содержат замены F243L, R292P, Y300L, V305I или P296L. Указанные замены аминокислот могут присутствовать в области Fc IgG1 человека в любой комбинации или дополнительной комбинации. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вариант области Fc IgG1 человека содержит замену F243L, R292P и Y300L. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вариант области Fc IgG1 человека содержит замену F243L, R292P, Y300L, V305I и P296L.

[00269] В частности, предпочтительно области Fc полипептидных цепей молекул, содержащих область Fc, согласно настоящему изобретению проявляют уменьшенное (или по существу отсутствующее) связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого областью Fc IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1). Варианты областей Fc и мутированные формы, способные опосредовать такое измененное связывание, описаны выше. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения молекулы, содержащие области Fc, согласно настоящему изобретению содержат область Fc IgG, которая проявляет сниженную эффекторную функцию АЗКЦ. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения домен CH2-CH3 первой и/или третьей полипептидных цепей указанных молекул, содержащих область Fc, содержит любую 1, 2 или 3 замены: L234A, L235A, N297Q и N297G. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вариант области Fc IgG человека содержит замену N297Q, замену N297G, замены L234A и L235A или замену D265A, поскольку эти мутации устраняют связывание с FcR. В другом варианте используют домен CH2-CH3

области Fc, который по своей природе проявляет уменьшенное (или по существу отсутствующее) связывание с FcγRIIIA (CD16a) и/или сниженную эффекторную функцию (относительно связывания, проявляемого областью Fc IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1)). Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения молекулы, содержащие области Fc, согласно настоящему изобретению содержат область Fc IgG2 (SEQ ID NO: 2) или область Fc IgG4 (SEQ ID NO: 4). При использовании области Fc IgG4 в область настоящего изобретения включено введение стабилизирующей мутации, такой как замена S228P в шарнирной области, описанной выше (см., например, SEQ ID NO: 13). Поскольку замены N297G, N297Q, L234A, L235A и D265A устраняют эффекторную функцию, в тех случаях, когда желательной является эффекторная функция, указанные замены предпочтительно не будут использованы.

[00270] В частности, предпочтительно области Fc полипептидных цепей молекул, содержащих область Fc, согласно настоящему изобретению проявляют увеличенный период полувыведения из сыворотки крови (относительно периода полувыведения, проявляемого соответствующей Fc дикого типа). Варианты области Fc и мутированные формы, имеющие увеличенный период полувыведения из сыворотки крови, описаны выше. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения домены CH2-CH3 первой и/или третьей полипептидных цепей указанных молекул, содержащих область Fc, содержит любую 1, 2 или 3 из замен: M252Y, S254T и T256E. В область настоящего изобретения также включены молекулы, содержащие область Fc, согласно настоящему изобретению, содержащие варианты области Fc, содержащие: (A) одну или более мутаций, которые изменяют эффекторную функцию и/или FcγR; и (B) одну или более мутаций, которые увеличивают период полувыведения из сыворотки крови.

[00271] Предпочтительная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 молекул, содержащих область Fc, согласно настоящему изобретению будет содержать замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (SEQ ID NO: 258):

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYTT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[00272] Предпочтительная последовательность IgG4 для доменов CH2 и CH3 молекул, содержащих область Fc, согласно настоящему изобретению будет содержать замены M252Y/S254T/T256E (SEQ ID NO: 259):

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
SIEKTIISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME  
ALHNHYTQKS LSLSLGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[00273] Для диател и трехвалентных связывающих молекул, первая и третья полипептидные цепи которых не идентичны, желательным является снижение или предотвращение гомодимеризации между доменами CH2-CH3 двух первых полипептидных цепей или между доменами CH2-CH3 двух третьих полипептидных цепей. Домены CH2 и/или CH3 указанных полипептидных цепей не обязательно должны иметь одинаковые последовательности, и преимущественно модифицированы, чтобы стимулировать комплексообразование между двумя полипептидными цепями. Например, замена аминокислоты (предпочтительно замена аминокислотой, содержащей объемную боковую группу, образующую «выступ», например, триптофаном), может быть введена в домен CH2 или CH3 так, что стерическое влияние предотвратит взаимодействие с доменом, мутированным аналогичным образом, и приведет к спариванию мутированного домена с доменом, в который была введена комплементарная или содействующая мутация, т. е. «впадина» (например, замена глицином). Такие группы мутаций могут быть введены в любую пару полипептидов, содержащих домены CH2-CH3, которые образуют область Fc. Способы модификации белков для стимулирования гетеродимеризации по отношению к гомодимеризации хорошо известны в данной области техники, в частности, в отношении модификации молекул, подобных иммуноглобулинам, и включены в область настоящего изобретения (см., например, работы Ridgway *et al.* (1996) «*Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization*», Protein Engr. 9:617-621, Atwell *et al.* (1997) «*Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library*», J. Mol. Biol. 270: 26-35, и Xie *et al.* (2005) «*A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis*», J. Immunol. Methods 296:95-101; каждая из которых полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки). Предпочтительно «выступ» вводят в домены CH2-CH3 первой полипептидной цепи, и «впадину» вводят в домены CH2-CH3 третьей полипептидной цепи диател, содержащих три полипептидные цепи.

Соответственно, «выступ» предотвратит гомодимеризацию первой полипептидной цепи посредством ее доменов СН2 и/или СН3. Поскольку третья полипептидная цепь предпочтительно содержит замену, обеспечивающую «впадину», она будет гетеродимеризоваться с первой полипептидной цепью, а также гомодимеризоваться сама с собой. Указанная стратегия может быть использована для антител и трехвалентных связывающих молекул, содержащих три, четыре или пять цепей, описанных выше, в которых «выступ» введен в домены СН2-СН3 первой полипептидной цепи, и «впадина» введена в домены СН2-СН3 третьей полипептидной цепи.

[00274] Предпочтительный выступ создают путем модификации области Fc IgG для включения модификации T366W. Предпочтительную впадину создают путем модификации области Fc IgG для включения модификации T366S, L368A и Y407V. Чтобы облегчить очистку гомодимера третьей полипептидной цепи, несущей впадину, из готовой биспецифической гетеродимерной молекулы, содержащей область Fc, сайт связывания белка А доменов СН2 и СН3, несущих впадину, третьей полипептидной цепи предпочтительно мутируют путем замены аминокислоты в положении 435 (H435R). Соответственно, гомодимер третьей полипептидной цепи, несущей впадину, не будет связываться с белком А, тогда как биспецифический гетеродимер сохранит свою способность связываться с белком А посредством сайта связывания белка А в первой полипептидной цепи. В другом варианте реализации третья полипептидная цепь, несущая впадину, может содержать замены аминокислот в положениях 434 и 435 (N434A/N435K).

[00275] Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG1 для доменов СН2 и СН3 первой полипептидной цепи молекулы, содержащей область Fc, согласно настоящему изобретению будет содержать последовательность «несущую выступ», представленную ниже (SEQ ID NO: 6):

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[00276] Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG1 для доменов СН2 и СН3 второй полипептидной цепи молекулы, содержащей область Fc, согласно настоящему изобретению, содержащей две полипептидные цепи (или третьей полипептидной цепи молекулы, содержащей область Fc, содержащей три, четыре или пять

полипептидных цепей), будет содержать «несущую впадину» последовательность, представленную ниже (SEQ ID NO: 7):

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
ALHNRYTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[00277] Как следует отметить, домены CH2-CH3 из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, содержат замену в положении 234 остатком аланина и в положении 235 остатком аланина и, соответственно, образуют область Fc, которая проявляет уменьшенное (или по существу отсутствующее) связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого областью Fc дикого типа (SEQ ID NO: 1)). В область настоящего изобретения также включены указанные домены CH2-CH3, которые содержат альтернативные и/или дополнительные замены, которые модифицируют эффекторную функцию и/или активность связывания области Fc с FcγR. В область настоящего изобретения также включены указанные домены CH2-CH3, которые дополнительно содержат одну или более замен аминокислот, увеличивающих период полувыведения. В частности, в область настоящего изобретения включены указанные «несущие впадину» и «несущие выступ» домены CH2-CH3, которые дополнительно содержат M252Y/S254T/T256E.

[00278] Предпочтительно первая полипептидная цепь будет содержать «несущую выступ» последовательность CH2-CH3, например, представленную в SEQ ID NO: 6. Однако, как будет отмечено, «несущий впадину» домен CH2-CH3 (например, SEQ ID NO: 7) может быть использован в первой полипептидной цепи, и в этом случае «несущий выступ» домен CH2-CH3 (например, SEQ ID NO: 6) может быть использован во второй полипептидной цепи молекулы, содержащей область Fc, согласно настоящему изобретению, содержащей две полипептидные цепи (или в третьей полипептидной цепи молекулы, содержащей область Fc, содержащей три, четыре или пять полипептидных цепей).

[00279] Как подробно описано выше, в область настоящего изобретения включены молекулы, содержащие область Fc (например, антитела и диатела, содержащие область Fc), содержащие домены CH2 и CH3 дикого типа или содержащие домены CH2 и CH3 с комбинациями замен, описанными выше. Примерная аминокислотная последовательность



домена CH2-CH3 IgG1, включающая такие варианты, представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 260):

```
APEX1X2GGPSV FLFPKPKDT LX3IX4RX5PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLX6CX7VK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLX8SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME  
ALHX9X10YTQKS LSLSPGX11
```

в которой:

- (a) X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> оба представляют собой L (дикий тип) или оба представляют собой A (уменьшенное связывание с FcγR);
- (b) X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> и X<sub>5</sub>, соответственно, представляют собой M, S и T (дикий тип) или Y, T и E (увеличенный период полувыведения),
- (c) X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub> и X<sub>8</sub>, соответственно, представляют собой T, L и Y (дикий тип) или W, L и Y (выступ), или S, A и V (впадина);
- (d) X<sub>9</sub> и X<sub>10</sub>, соответственно, представляют собой N и H (дикий тип) или представляют собой N и R (отсутствует связывание с белком A), или A и K (отсутствует связывание с белком A); и
- (e) X<sub>11</sub> представляет собой K или отсутствует.

[00280] Согласно другим вариантам реализации в область настоящего изобретения включены PD-1-связывающие молекулы, содержащие домены CH2 и/или CH3, которые были модифицированы, чтобы способствовать гетеродимеризации по сравнению с гомодимеризацией, с использованием мутаций, известных в данной области техники, таких как те, которые раскрыты в РСТ публикациях WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867, все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

### **VIII Биспецифические связывающие молекулы PD-1×LAG-3**

[00281] Согласно настоящему изобретению в частности предложены биспецифические связывающие молекулы PD-1×LAG-3 (например, биспецифические антитела, биспецифические диатела и т.д.), содержащие эпитопсвязывающий фрагмент антитела к PD-1 и предпочтительно одно из новых антител к PD-1 человека, предложенных в настоящем документе, и эпитопсвязывающий фрагмент антитела к LAG-3 человека, предпочтительно одно из новых антител к LAG-3 человека, предложенных в настоящем документе. Предпочтительные биспецифические связывающие молекулы PD-1×LAG-3 согласно настоящему изобретению содержат эпитопсвязывающие фрагменты антител, которые позволяют им скоординировано связываться с двумя различными

эпитопами: эпитопом PD-1 и эпитопом LAG-3 так, чтобы ослабить ингибиторную активность указанных молекул. В настоящей заявке такое ослабление относится к уменьшению по меньшей мере на 20%, уменьшению по меньшей мере на 50%, уменьшению по меньшей мере на 80% или уменьшению по меньшей мере на 90% детектируемой ингибиторной активности PD-1 и/или LAG-3, или к полному устранению детектируемой ингибиторной активности PD-1 и/или LAG-3. Выбор эпитопсвязывающих фрагментов (например, доменов VL и VH) антитела к PD-1 человека и антитела к LAG-3 координируется так, что полипептидные цепи, которые образуют указанные биспецифические связывающие молекулы PD-1×LAG-3, соединяются с образованием по меньшей мере одного функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфичным в отношении первого антигена (т. е., PD-1 или LAG-3), и по меньшей мере одного функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфичным в отношении второго антигена (т. е., PD-1 или LAG-3, в зависимости от идентичности первого антигена).

[00282] Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения биспецифическая связывающая молекула PD-1×LAG-3 согласно настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело, которое предпочтительно содержит две, три, четыре или пять полипептидных цепей, описанных в настоящем документе. В другом конкретном варианте реализации биспецифическая связывающая молекула PD-1×LAG-3 согласно настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело, которое предпочтительно содержит две, три или четыре полипептидные цепи, описанные в настоящем документе (см., например, WO 2007/024715; WO2007/110205; WO 2009/080251; WO 2009/080254; WO 2009/089004; WO 2011/069104; WO 2011/117329; WO 2011/131746; WO 2011/133886; WO 2011/143545; WO 2012/023053; WO 2013/060867, все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки).

#### **A Антитела к LAG-3 человека**

[00283] Примерные антитела, которые являются иммуноспецифичными для LAG-3 человека, приведены ниже. Дополнительные желательные антитела могут быть получены путем выделения гибридом, секретирующих антитела, выявленных с использованием LAG-3 или его пептидного фрагмента, или путем скрининга библиотек рекомбинантных антител для определения связывания с LAG-3 или его пептидным фрагментом. LAG-3 человека (включая сигнальную последовательность, состоящую из 28 остатков аминокислот (выделена подчеркиванием), и зрелый белок, состоящий из 497 остатков аминокислот) содержит аминокислотную последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 38):

MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEVV VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL  
 QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT  
 VLSVGPGLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA  
 VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV  
 HWFRNRGQGR VPVRESPHHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN  
 VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP  
 PGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSOAQAGT YTCHIHLEEQ QLNATVTLAI  
 ITVTPKSFSG PGS LGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA  
 QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL  
 LLFLILGVLS LLLLVTGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE  
 ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL

## 1 Моноклональное антитело к LAG-3 А

[00284] Антитело к LAG-3 человека, BMS-986016 (25F7; Medarex/BMS), обозначенное в настоящем документе «МАТ к LAG-3 А», и его варианты были описаны (см., например, WO 2014/008218). Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи МАТ к LAG-3 А содержит аминокислотную последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 39) (CDR выделены подчеркиванием):

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE  
INHNGNTNSN PSLKSRVTLSDT SKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS  
DYEYNWFDPW GQGTLVTVSS

[00285] Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи МАТ к LAG-3 А содержит аминокислотную последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 40) (CDR выделены подчеркиванием):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ  
 GTNLEIK

[00286] Недавно были идентифицированы дополнительные мышинные антитела к LAG-3 человека, обладающие уникальными характеристиками связывания (см. заявку на патент США №62/172277). Предпочтительные биспецифические связывающие молекулы PD-1×LAG-3 согласно настоящему изобретению содержат эпитопсвязывающие фрагменты антитела к LAG-3, МАТ к LAG-3 1 или МАТ к LAG-3 6, которые связываются с новым эпитопом и не конкурируют с BMS-986016 за связывание с LAG-3. Особенно предпочтительными являются биспецифические связывающие молекулы PD-1×LAG-3 согласно настоящему изобретению, которые содержат гуманизированные домены VH и/или VL МАТ к LAG-3 1 или МАТ к LAG-3 6.

## 2 МАТ к LAG-3 1

[00287] Аминокислотная последовательность домена VH МАТ к LAG-3 1 (SEQ ID NO: 41) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием).

QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFR NYGMNWVKQA PGKVLKWMGW  
INTYTGESTY ADDFEGRFAF SLGTSASTAY LQINILKNED TATYFCAREES  
LYDYYSMDYW GQGTSVTVSS

CDR<sub>H1</sub> МАТ к LAG-3 1 (SEQ ID NO: 42): RNYGMN

CDR<sub>H2</sub> МАТ к LAG-3 1 (SEQ ID NO: 43): WINTYTGESTYADDFEG

CDR<sub>H3</sub> МАТ к LAG-3 1 (SEQ ID NO: 44): ESLYDYYSMDY

[00288] Аминокислотная последовательность домена VL МАТ к LAG-3 1 (SEQ ID NO: 45) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQRPGQSPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHFP  
YTFGGGTKLE IK

CDR<sub>L1</sub> МАТ к LAG-3 1 (SEQ ID NO: 46): KSSQSLHSDGKTYLN

CDR<sub>L2</sub> МАТ к LAG-3 1 (SEQ ID NO: 47): LVSELD

CDR<sub>L3</sub> МАТ к LAG-3 1 (SEQ ID NO: 48): WQGTHTFPYT

[00289] Два примерных гуманизованных домена VH МАТ к LAG-3 1, обозначенных в настоящем документе «VH1 МАТ к чLAG-3 1» и «МАТ к чLAG-3 1 VH2», и четыре примерных гуманизованных домена VL МАТ к LAG-3 1 «VL1 МАТ к чLAG-3 1», «VL2 МАТ к чLAG-3 1», «VL3 МАТ к чLAG-3 1» и «VL4 МАТ к чLAG-3 1», приведены ниже. Любой из гуманизованных доменов VL может быть спарен с любым из гуманизованных доменов VH, чтобы получить LAG-3-связывающий домен. Соответственно, любое антитело, содержащее один из гуманизованных доменов VL, спаренный с гуманизованным доменом VH, в общем называется «МАТ к чLAG-3 1», и конкретные комбинации гуманизованных доменов VH/VL упоминаются посредством ссылки на определенные домены VH/VL, например, гуманизованное антитело, содержащее VH1 МАТ к чLAG-3 1 и VL2 МАТ к чLAG-3 1, в частности называется «МАТ к чLAG-3 1 (1.2)».

[00290] Аминокислотная последовательность домена VH из VH1 МАТ к чLAG-3 1 (SEQ ID NO: 49) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW  
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISLKAED TAVYYCAREES  
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS

[00291] Аминокислотная последовательность домена VH из VH2 МАТ к чLAG-3 1 (SEQ ID NO: 50) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW  
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISLKAED TAVYFCARES  
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS

[00292] Аминокислотная последовательность домена VL из VL1 МАТ к чLAG-3 1 (SEQ ID NO: 51) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWWQGTHFP  
YTFGGGTKVE IK

[00293] Аминокислотная последовательность домена VL из VL2 МАТ к чLAG-3 1 (SEQ ID NO: 52) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQRPGQSPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWWQGTHFP  
YTFGGGTKVE IK

[00294] Аминокислотная последовательность домена VL из VL3 МАТ к чLAG-3 1 (SEQ ID NO: 53) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQPPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWWQGTHFP  
YTFGGGTKVE IK

[00295] Аминокислотная последовательность домена VL из VL4 МАТ к чLAG-3 1 (SEQ ID NO: 54) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWWQGTHFP  
YTFGGGTKVE IK

[00296] CDR<sub>L1</sub> домена VL из VL4 МАТ к чLAG-3 1 содержит замену глицина остатком аланина и содержит аминокислотную последовательность: KSSQSLLHSDAKTYLN (SEQ ID NO: 55), замененный аланин выделен подчеркиванием. Согласно настоящему изобретению предусмотрено, что аналогичная замена может быть включена в любой из описанных выше доменов CDR<sub>L1</sub> МАТ к LAG-3 1.

### 3 МАТ к LAG-3 6

[00297] Аминокислотная последовательность домена VH МАТ к LAG-3 6 (SEQ ID NO: 56) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EVLLQQSGPE LVKPGASVKI PCKASGYTFT DYNMDWVKQS HGESLEWIGD  
INPDNGVTIY NQKFEGKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVYYCAREEA

DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

CDR<sub>H1</sub> МАТ к LAG-3 6 (SEQ ID NO: 57): DYNMD

CDR<sub>H2</sub> МАТ к LAG-3 6 (SEQ ID NO: 58): DINPDNGVTIYNQKFEG

CDR<sub>H3</sub> МАТ к LAG-3 6 (SEQ ID NO: 59): EADYFYFDY

[00298] Аминокислотная последовательность домена VL МАТ к LAG-3 6 (SEQ ID NO: 60) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIVMTQSHRF MSTSVGDRVS ITCKASQDVS SVVAWYQOKP GQSPKLLIFS  
ASYRYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ HYSTPWTFGG  
GTKLEIK

CDR<sub>L1</sub> МАТ к LAG-3 6 (SEQ ID NO: 61): KASQDVSSVVA

CDR<sub>L2</sub> МАТ к LAG-3 6 (SEQ ID NO: 62): SASRYT

CDR<sub>L3</sub> МАТ к LAG-3 6 (SEQ ID NO: 63): HYSTPWT

[00299] Два примерных гуманизованных домена VH МАТ к LAG-3 6, обозначенных в настоящем документе как «VH1 МАТ к чLAG-3 6» и «VH2 МАТ к чLAG-3 6», и два примерных гуманизованных домена VL МАТ к LAG-3 6, обозначенных «VL1 МАТ к чLAG-3 1» и «VL2 МАТ к чLAG-3 1», приведены ниже. Любой из гуманизованных доменов VL может быть спарен с любым из гуманизованных доменов VH, чтобы получить LAG-3-связывающий домен. Соответственно, любое антитело, содержащее один из гуманизованных доменов VL, спаренный с гуманизованным доменом VH, в общем называется «МАТ к чLAG-3 6», и конкретные комбинации гуманизованных доменов VH/VL упоминаются посредством ссылки на определенные домены VH/VL, например, гуманизованное антитело, содержащее VH1 МАТ к чLAG-3 6 и VL2 МАТ к чLAG-3 6, в частности называется «МАТ к чLAG-3 6 (1.2)».

[00300] Аминокислотная последовательность домена VH из VH1 МАТ к чLAG-3 6 (SEQ ID NO: 294) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYNMDWVRQA PGQGLEWMGD  
INPDNGVTIY NQKFEGRVTM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCAREEA  
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

[00301] Аминокислотная последовательность домена VH из VH2 МАТ к чLAG-3 6 (SEQ ID NO: 295) представлена ниже (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYNMDWVRQA PGKGLEWVSD  
INPDNGVTIY NQKFEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREEA  
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

[00302] Аминокислотная последовательность домена VL из VL1 МАТ к чLAG-3 6 (SEQ ID NO: 296) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS  
ASYRYTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG GTKLEIK

[00303] Аминокислотная последовательность домена VL из VL2 МАТ к чLAG-3 6 (SEQ ID NO: 297) представлена ниже (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS  
ASYRYTGVPD RFGSGSGTD FTFTISSLQP EDIAVYYCQQ HYSTPWTFGG GTKLEIK

[00304] CDR<sub>L1</sub> домена VL из VL1 и VL2 МАТ к чLAG-3 6 содержит замену лизина остатком аминокислоты аргинина, и содержит аминокислотную последовательность: RASQDVSSVVA (SEQ ID NO: 298), замененный аргинин выделен подчеркиванием. Согласно настоящему изобретению предусмотрено, что аналогичная замена может быть включена в любой из доменов CDR<sub>L1</sub> МАТ к LAG-3 6, описанных выше.

## **В Примерные четырехцепочечные диатела, содержащие область Fc, имеющие E/K-спираль**

[00305] Были получены четыре примерных биспецифических четырехцепочечных диатела, содержащих область Fc, PD-1×LAG-3, имеющих домены, способствующие образованию гетеродимера, с E/K-спиралями (обозначенные «DART A», «DART B», «DART C» и «DART I»). Структура указанных диател, содержащих область Fc, подробно описана ниже. Указанные типичные диатела PD-1×LAG-3 являются иллюстративными и никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

### **1 DART A**

[00306] DART A представляет собой биспецифическое четырехцепочечное диатело, содержащее область Fc, содержащее два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении LAG-3, вариант области Fc IgG4, модифицированный так, чтобы увеличить период полувыведения, и цистеинсодержащие домены, способствующие образованию гетеродимера, с E/K-спиралью. Первая и третья полипептидные цепи DART A содержат, в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL4 МАТ к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 54); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 МАТ к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (E-спираль) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 23)); стабилизированную

шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 13); вариант домена CH2-CH3 IgG4, содержащий замены M252Y/S254T/T256E и лишенный С-концевого остатка (SEQ ID NO: 259); и С-конец.

[00307] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART А представляет собой вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 267:

```
DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSL L HSDX1KTYLNLW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHTFP
YTFGGGTKVE IKGGS GGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAC
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKESKYGPP CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP
KPKDTLX2IX3R X4PEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTPP
PVLDS DGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSL
G
```

в которой X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> и X<sub>4</sub> выбраны независимо, и в которой X<sub>1</sub> представляет собой А или G; X<sub>2</sub> представляет собой Y или M; X<sub>3</sub> представляет собой T или S; и X<sub>4</sub> представляет собой E или T.

[00308] Аминокислотные последовательности первой и третьей полипептидных цепей DART А представляют собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 267, в которой X<sub>1</sub> представляет собой А; X<sub>2</sub> представляет собой Y; X<sub>3</sub> представляет собой T; и X<sub>4</sub> представляет собой E.

[00309] Вторая и четвертая полипептидные цепи DART А содержат в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> VL2 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 153); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> VH1 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 49); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (К-спираль) (KVAASKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 24); и С-конец.

[00310] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART А представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 268):



EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFGSGG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYTFTN  
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL  
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSM DYWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAC  
KEKVAALKEK VAALKEKVAALKE

## 2 DART B

[00311] DART B идентично DART A, за исключением того, что первая и третья полипептидные цепи DART B содержат домен VL из VL3 MAT к чLAG-3 1 (SEQ ID NO: 53), который содержит замену аминокислоты в CDR<sub>L1</sub>. Соответственно, первая и третья полипептидные цепи DART B содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL3 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 53); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (E-спираль) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 23)); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 13); вариант домена CH2-CH3 IgG4, содержащий замены M252Y/S254T/T256E и лишенный C-концевого остатка (SEQ ID NO: 259); и C-конец.

[00312] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART B представляет собой последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 267, в которой X<sub>1</sub> представляет собой G; X<sub>2</sub> представляет собой Y; X<sub>3</sub> представляет собой T; и X<sub>4</sub> представляет собой E.

[00313] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART B представляет собой последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 268.

## 3 DART C

[00314] DART C идентично DART B, за исключением того, что первая и третья полипептидные цепи DART B содержат домен CH2-CH3 IgG4 дикого типа, лишенный C-концевого остатка (SEQ ID NO: 4). Соответственно, первая и третья полипептидные цепи DART C содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL3 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 53); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); промежуточный линкерный пептид (линкер 2:

GGCGGG (SEQ ID NO: 15)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (E-спираль) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 23)); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 13); домен CH2-CH3 IgG4, лишенный С-концевого остатка (SEQ ID NO: 4); и С-конец.

[00315] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART С представляет собой последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 267, в которой X<sub>1</sub> представляет собой G; X<sub>2</sub> представляет собой M; X<sub>3</sub> представляет собой S; и X<sub>4</sub> представляет собой T.

[00316] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART С представляет собой последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 268.

#### 4 DART I

[00317] DART I представляет собой биспецифическое четырехцепочечное диатело, содержащее область Fc, содержащее два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении LAG-3, вариант области Fc IgG4, модифицированный так, чтобы увеличить период полувыведения, и цистеинсодержащие домены, способствующие образованию гетеродимера, с E/K-спиралью. Первая и третья полипептидные цепи DART I содержат в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL1 MAT к чLAG-3 6) (SEQ ID NO: 296); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (E-спираль) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 23)); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 13); вариант домена CH2-CH3 IgG4, содержащий замены M252Y/S254T/T256E и лишенный С-концевого остатка (SEQ ID NO: 259); и С-конец.

[00318] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART I представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 290):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPV RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWFVGG
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYSFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
LRSEDTAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGTLV TVSSGGCGGG EVAACEKEVA
```

ALEKEVAALE KEVAALEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT  
LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY  
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT  
LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS  
DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG

[00319] Вторая и четвертая полипептидные цепи DART I содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> VL2 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 153); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> VH1 MAT к чLAG-3 6) (SEQ ID NO: 294); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (К-спираль) (KVAACKK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 24); и C-конец.

[00320] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART I представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 291):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD  
YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM  
ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TTLTVSSGGC GGGKVAACKK  
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

## **С Примерные четырехцепочечные диатела, содержащие область Fc, имеющие домены CL/CH1**

[00321] Были получены четыре примерных биспецифических четырехцепочечных диатела, содержащих область Fc, PD-1×LAG-3, содержащих домены CL/CH1, и обозначены «DART D», «DART E», «DART J» и «DART I». Структура указанных диател, содержащих область Fc, подробно описана ниже. Указанные примерные диатела PD-1×LAG-3 являются иллюстративными и никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

### **1 DART D**

[00322] DART D представляет собой биспецифическое четырехцепочечное диатело, содержащее область Fc, содержащее два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении LAG-3, домены CL/CH1 и вариант области Fc IgG4, модифицированный так, чтобы увеличить период полувыведения.

Первая и третья полипептидные цепи DART D содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> VL2 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 153); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> VH1 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 49); промежуточный линкерный пептид (линкер 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)); домен CH1 IgG4 (SEQ ID NO: 254); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 13); вариант домена CH2-CH3 IgG4, содержащий замены M252Y/S254T/T256E и лишенный C-концевого остатка (SEQ ID NO: 259); и C-конец.

[00323] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART D представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 269):

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSL GGGSGASTKG
PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTKYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
NWFYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
SVMHEALHNN YTQKSLSLSL G
```

[00324] Вторая и четвертая полипептидные цепи DART D содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL4 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 54); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); промежуточный линкерный пептид (линкер 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)); домен CL каппа-цепи (SEQ ID NO: 8); и C-конец.

[00325] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART D представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 270):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLI HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP  
YTFGGGKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT  
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL GGGSGRTVAA  
PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES  
VTEQDSKDST YSLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG EC

## 2 DART E

[00326] DART E представляет собой другое биспецифическое четырехцепочечное диатело, содержащее область Fc, содержащее два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении LAG-3, домены CL/CH1 и вариант Fc IgG4, модифицированный так, чтобы увеличить период полувыведения. Сайты связывания PD-1 и LAG-3 DART E расположены в обратном порядке в сравнении с DART D.

[00327] Первая и третья полипептидные цепи DART E содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL4 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 54); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); промежуточный линкерный пептид (линкер 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)); домен CH1 IgG4 (SEQ ID NO: 254); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 13); вариант домена CH2-CH3 IgG4, содержащий замены M252Y/S254T/T256E и лишенный C-концевого остатка (SEQ ID NO: 259); и C-конец.

[00328] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART E представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 271):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLI HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP  
YTFGGGKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT  
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL GGGSGASTKG  
PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSL SSVVTVPPSS LGTKYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP  
CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF  
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN

KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS  
DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC  
SVMHEALHNN YTQKSLSLSL G

[00329] Вторая и четвертая полипептидные цепи DART E содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> VL2 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 153); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> VH1 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 49); промежуточный линкерный пептид (линкер 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)); домен CL каппа-цепи (SEQ ID NO: 8); и C-конец.

[00330] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART E представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 272):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN  
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL  
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSL GGGSGRTVAA  
PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES  
VTEQDSKDST YSLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG EC

### 3 DART J

[00331] DART J представляет собой биспецифическое четырехцепочечное диатело, содержащее область Fc, содержащее два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении LAG-3, домены CL/CH1 и вариант Fc IgG4, модифицированный так, чтобы увеличить период полувыведения. Первая и третья полипептидные цепи DART J содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL1 MAT к чLAG-3 6) (SEQ ID NO: 296); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); промежуточный линкерный пептид (линкер 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)); домен CH1 IgG4 (SEQ ID NO: 254); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 13); вариант домена CH2-CH3 IgG4, содержащий замены M252Y/S254T/T256E и лишенный C-концевого остатка (SEQ ID NO: 259); и C-конец.

[00332] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART J представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 292):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS  
ASYRYTGVPV RFSGSGSGTD FTLLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWFTEGG  
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYSFTSYWMN  
WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS  
LRSEDTAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGLV TVSSLGGGSG ASTKGPSVFP  
LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPPTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP  
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVDSQED PEVQFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
SIEKTISKAK GQPREPQVYF LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NWFSCSVMHE  
ALHNHYTQKS LLSLSLG

[00333] Вторая и четвертая полипептидные цепи DART J содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> VL2 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 153); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> VH1 MAT к чLAG-3 6) (SEQ ID NO: 294); промежуточный линкерный пептид (линкер 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)); домен CL каппа-цепи (SEQ ID NO: 8); и C-конец.

[00334] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART J представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 293):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD  
YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM  
ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TLTITVSSLGG GSGRTVAAPS  
VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNFPYREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT  
EQDSKDSSTYS LSSTLTLSKA DYKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

#### 4 DART 1

[00335] DART 1 представляет собой биспецифическое четырехцепочечное диатело, содержащее область Fc, содержащее два сайта связывания, специфичных в отношении

PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении LAG-3, домены CL/CH1, и вариант области Fc IgG1, модифицированный для снижения связывания с FcγR. Первая и третья полипептидные цепи DART 1 содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> VL MAT к PD-1 A) (SEQ ID NO: 65); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> VH1 MAT к LAG-3 A) (SEQ ID NO: 39); промежуточный линкерный пептид (линкер 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)); домен CH1 IgG1 (SEQ ID NO: 10); шарнирную область IgG1 (SEQ ID NO: 32); вариант домена CH2-CH3 IgG1, содержащий замены L234A/L235A и лишенный C-концевого остатка (SEQ ID NO: 5); и C-конец.

[00336] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART 1 представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 284):

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSI SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
GTNLEIKGGG SGGGGQVQLV ESGGGVVQPG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH
WVRQAPGKGL EWVAVIWYDG SKRYYADSVK GRFTISRDN KNTLFLQMNS
LRAEDTAVYY CATNDDYWGQ GTLVTVSSLG GSGASTKGP SVFPLAPSSK
STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSL
SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPPCPAPE
AAGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE
VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
NHYTQKSLSL SPG
```

[00337] Вторая и четвертая полипептидные цепи DART 1 содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL MAT к LAG-3 A) (SEQ ID NO: 40); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH MAT к PD-1 A) (SEQ ID NO: 64); промежуточный линкерный пептид (линкер 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)); домен CL каппа-цепи (SEQ ID NO: 8); и C-конец.



[00338] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART 1 представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 285):

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ QWGAGLLKPS ETLSLTCAVY GGSFSDYYWN
WIRQPPGKGL EWIGEINHNG NTNSNP SLKS RVTLSLDTSK NQFSLKLRV
TAADTAVYYC AFGYSDYEYN WFDPWGQGL VTVSSLGGGS GRTVAAPSVF
IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
DSKDSTYSL S TLTL SKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
```

## **D Примерные пятицепочечные диатела, содержащие область Fc**

[00339] Были получены два примерных биспецифических пятицепочечных диатела, содержащих область Fc, PD-1×LAG-3, содержащих домены CL/CH1 и домены, способствующие образованию гетеродимеров, с E/K-спиралью, и обозначены «DART F» и «DART G». Структура указанных диател, содержащих область Fc, подробно описана ниже. Указанные примерные диатела PD-1×LAG-3 являются иллюстративными и никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

### **1 DART F**

[00340] DART F представляет собой биспецифическое пятицепочечное диатело, содержащее область Fc, содержащее три сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, один сайт связывания, специфичный в отношении LAG-3, домены CL/CH1, вариант области Fc IgG1, несущий выступ/впадину, модифицированный для снижения связывания с FcγR и увеличения периода полувыведения, и домены, способствующие образованию гетеродимера, с E/K-спиралью. Первая полипептидная цепь DART F содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); домен CH1 IgG1 (SEQ ID NO: 10); шарнирную область IgG1 (SEQ ID NO: 32); несущий впадину домен CH2-CH3 IgG1, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K и лишенный C-концевого остатка (SEQ ID NO: 260, в которой X<sub>1</sub> представляет собой A, X<sub>2</sub> представляет собой A; X<sub>3</sub> представляет собой Y, X<sub>4</sub> представляет собой T, X<sub>5</sub> представляет собой E, X<sub>6</sub> представляет собой S, X<sub>7</sub> представляет собой A, X<sub>8</sub> представляет собой V, X<sub>9</sub> представляет собой A, X<sub>10</sub> представляет собой K и X<sub>11</sub> отсутствует); и C-конец.

[00341] Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи DART F представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 273):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY  
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK  
DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL  
DSDGSFFLVS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHAKYTQ KSLSLSPG

[00342] Вторая и пятая полипептидные цепи DART F содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> VL2 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 153), домен CL каппа-цепи (SEQ ID NO: 8) и C-конец.

[00343] Аминокислотная последовательность второй и пятой полипептидной цепи DART F представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 274):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV  
THQGLSSPVT KSFNRGEC

[00344] Третья полипептидная цепь DART F содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); домен CH1 IgG1 (SEQ ID NO: 10); шарнирную область IgG1 (SEQ ID NO: 32); несущий выступ домен CH2-CH3 IgG1, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E и лишенный C-концевого остатка (SEQ ID NO: 260, в которой X<sub>1</sub> представляет собой A, X<sub>2</sub> представляет собой A, X<sub>3</sub> представляет собой Y, X<sub>4</sub> представляет собой T, X<sub>5</sub> представляет собой E, X<sub>6</sub> представляет собой W, X<sub>7</sub> представляет собой L, X<sub>8</sub> представляет собой Y, X<sub>9</sub> представляет собой H, X<sub>10</sub> представляет собой H и X<sub>11</sub> отсутствует); промежуточный линкерный пептид (GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 262)); домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL4 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 54); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO:

15)); домен, способствующий образованию гетеродимера (E-спираль) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 21)); и С-конец.

[00345] Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи DART F представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 275):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY  
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK  
DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG  
GSGGGSGGGD IVMTQTPLSL SVTPGQPASI SCKSSQSLH SDAKTYLNWL  
LQKPGQPPER LIYLVSELDG GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS RVEAEDVGVY  
YCWQGTTHFPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS  
CKASGYSFTS YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVITIT  
VDKSTSTAYM ELSSLRSED AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG  
CGGGEVAALE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK

[00346] Четвертая полипептидная цепь DART F содержит в направлении от N-конца к С-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> VL2 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 153); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> VH1 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 49); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)); домен, способствующий образованию гетеродимера (K-спираль) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 22)); и С-конец.

[00347] Аминокислотная последовательность четвертых полипептидных цепей DART F представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 276):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYTFTN  
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL  
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSM DYWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL  
KEKVAALKEK VAALKEKVAAL LKE

## 2 DART G

[00348] DART G представляет собой биспецифическое пятицепочечное диатело, содержащее область Fc, содержащее два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении LAG-3, домены CL/CH1, вариант области Fc IgG1, несущий выступ/впадину, модифицированный так, чтобы снижать связывание с FcγR и увеличивать период полувыведения, и домены, способствующие образованию гетеродимера, с E/K-спиралью. Первая полипептидная цепь DART G содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> VH1 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 49); домен CH1 IgG1 (SEQ ID NO: 10); шарнирную область IgG1 (SEQ ID NO: 32); несущий впадину домен CH2-CH3 IgG1, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K и лишенный C-концевого остатка (SEQ ID NO: 260, в которой X<sub>1</sub> представляет собой A, X<sub>2</sub> представляет собой A; X<sub>3</sub> представляет собой Y, X<sub>4</sub> представляет собой T, X<sub>5</sub> представляет собой E, X<sub>6</sub> представляет собой S, X<sub>7</sub> представляет собой A, X<sub>8</sub> представляет собой V, X<sub>9</sub> представляет собой A, X<sub>10</sub> представляет собой K и X<sub>11</sub> отсутствует); и C-конец.

[00349] Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи DART G представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 277):

```
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISLKAED TAVYYCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSREE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHAKYT QKSLSLSPG
```

[00350] Вторая и пятая полипептидные цепи DART G содержат в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL4 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 54), домен CL каппа-цепи (SEQ ID NO: 8) и C-конец.

[00351] Аминокислотная последовательность второй и пятой полипептидной цепи DART G представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 278):

```
DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLH HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP
```

YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE  
VTHQGLSSPV TKSFNREGEC

[00352] Третья полипептидная цепь DART G содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> VH1 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 49); домен IgG1 CH1 (SEQ ID NO: 10); шарнирную область IgG1 (SEQ ID NO: 32); несущий выступ домен CH2-CH3 IgG1, содержащий замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E и лишенный C-концевого остатка (SEQ ID NO: 260, в которой X<sub>1</sub> представляет собой A, X<sub>2</sub> представляет собой A, X<sub>3</sub> представляет собой Y, X<sub>4</sub> представляет собой T, X<sub>5</sub> представляет собой E, X<sub>6</sub> представляет собой W, X<sub>7</sub> представляет собой L, X<sub>8</sub> представляет собой Y, X<sub>9</sub> представляет собой H, X<sub>10</sub> представляет собой H и X<sub>11</sub> отсутствует); промежуточный линкерный пептид (GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 262)); домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> VL2 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 153); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)); домен, способствующий образованию гетеродимера (E-спираль) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 21)); и C-конец.

[00353] Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи DART G представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 279):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW  
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISLKAED TAVYYCARES  
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK  
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT  
YICNVNHNKPS NTKVDKRVFP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP  
KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN  
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ  
VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV  
LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT QKSLSLSPGG  
GGSGGGSGGG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF  
QQKPGQPPKL LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY  
FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS  
CKASGYSFTS YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVITIT

VDKSTSTAYM ELSSLRSEDТ AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG  
CGGGEVAALE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK

[00354] Четвертая полипептидная цепь DART G содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> VL2 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 153); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)); домен, способствующий образованию гетеродимера (К-спираль) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 22)); и C-конец.

[00355] Аминокислотная последовательность четвертых полипептидных цепей DART G представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 280):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS  
YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVITIT VDKSTSTAYM  
ELSSLRSEDТ AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAALK  
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

## **Е Примерное трехцепочечное диатело, содержащее область Fc, имеющее E/K-спираль**

[00356] Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены биспецифические трехцепочечные диатела, содержащие область Fc, PD-1×LAG-3, содержащие домены, способствующие образованию гетеродимера, с E/K-спиралью. Было получено примерное биспецифическое трехцепочечное диатело, содержащее область Fc, PD-1×LAG-3, содержащее домены, способствующие образованию гетеродимера, с E/K-спиралью, обозначенное как «DART H». Ниже подробно описана структура указанного диатела, содержащего область Fc. Указанное примерное диатело PD-1×LAG-3 является иллюстративным и никоим образом не ограничивает объем настоящего изобретения.

[00357] DART H представляет собой биспецифическое трехцепочечное диатело, содержащее область Fc, содержащее один сайт связывания, специфичный в отношении PD-1, один сайт связывания, специфичный в отношении LAG-3, вариант несущей выступ/впадину области Fc IgG1, модифицированный для снижения связывания с FcγR, и домены, способствующие образованию гетеродимера, с E/K-спиралью.

[00358] Первая полипептидная цепь DART H содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1

(VL<sub>PD-1</sub> VL2 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 153); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> VH1 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 49); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)); домен, способствующий образованию гетеродимера, (E-спираль) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 21)); промежуточный линкер (спейсер-линкер 3: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 263)); несущий выступ домен CH2-CH3 IgG1, содержащий замены L234A/L235A и содержащий C-концевой остаток лизина (SEQ ID NO: 6); и C-конец.

[00359] Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи DART H представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 281):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFRSGS SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYFTN  
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL  
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL  
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP  
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAIEK TISKAKGQPR  
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL  
PGK

[00360] Вторая полипептидная цепь DART H содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL4 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 54); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)); домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)); домен, способствующий образованию гетеродимера (K-спираль) (KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE (SEQ ID NO: 22)); и C-конец.

[00361] Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи DART H представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 282):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLH HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP  
YTFGGGTKVE IKGSGGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT

SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGKVAAL  
KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

[00362] Третья полипептидная цепь DART H содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; шарнирную область (DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 31), несущий выступ домен CH2-CH3 IgG1, содержащий замены L234A/L235A и содержащий C-концевой остаток лизина (SEQ ID NO: 7) и C-конец.

[00363] Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи DART H представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 283):

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED  
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK  
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG  
NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

## **F Примерное биспецифическое антитело**

[00364] Было получено примерное четырехцепочечное биспецифическое антитело PD-1×LAG-3, обозначенное как «BSAB A». Структура указанного биспецифического антитела подробно описана ниже. Указанное примерное биспецифическое антитело PD-1×LAG-3 является иллюстративным и никоим образом не ограничивает объем настоящего изобретения.

[00365] BSAB A представляет собой биспецифическое антитело, содержащее один сайт связывания, специфичный в отношении PD-1, один сайт связывания, специфичный в отношении LAG-3, вариант Fc IgG1, модифицированный для снижения связывания с FcγR и для содействия комплексообразованию между двумя различными полипептидами тяжелой цепи (см. например, WO 2011/143545).

[00366] Первая полипептидная цепь BSAB A содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VH моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> VH1 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 147); домен CH1 IgG1 (SEQ ID NO: 10); вариант шарнирной области IgG1, содержащий замены D221E/P228E (пронумерованные в соответствии с системой ЕС, описанной в Kabat et al., и выделенные подчеркиванием в SEQ ID NO: 286 ниже); вариант домена CH2-CH3 IgG1, содержащий замены L234A/L235A/L368E (замены выделены подчеркиванием в SEQ ID NO: 286 ниже) и лишенный C-концевого остатка; и C-конец.

[00367] Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи BSAB A представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 286):



QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY  
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SEKTHTCPE CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK  
DTLMISRTP ETCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
YTLPPSREEM TKNQVSLTE VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG

[00368] Вторая полипептидная цепь BSAB содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> VL2 MAT к чPD-1 7) (SEQ ID NO: 153); домен CL каппа-цепи (SEQ ID NO: 8) и C-конец.

[00369] Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи BSAB представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 287):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTLKADY EKHKVYACEV  
THQGLSSPVT KSFNRGEC

[00370] Третья полипептидная цепь BSAB A содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VH моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> VH1 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 49); домен CH1 IgG1 (SEQ ID NO: 10); вариант шарнирной области IgG1, содержащий замены D221R/P228R (замены выделены подчеркиванием в SEQ ID NO: 288 ниже); вариант домена CH2-CH3 IgG1, содержащий замены L234A/L235A/L409R (замены выделены подчеркиванием в SEQ ID NO: 288 ниже) и лишенный C-концевого остатка; и C-конец.

[00371] Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи BSAB A представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 288):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW  
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISLKAED TAVYYCARES  
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK  
DYFPEPVTVS WNSGALTSV HTFPAVLQSS GLYLSVVT VPSSSLGTQT  
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCRKTHTCP RCPAPEAAGG PSVFLFPPKPK  
KDTLMISRTP ETCVVVDVSH HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ  
VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV  
LDSGGSFFLY SR<sub>L</sub>TVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNYT QKSLSLSPG

[00372] Четвертая полипептидная цепь BSAB A содержит в направлении от N-конца к C-концу: N-конец; домен VL моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> VL4 MAT к чLAG-3 1) (SEQ ID NO: 54); домен CL каппа-цепи (SEQ ID NO: 8) и C-конец.

[00373] Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи BSAB A представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 289):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLH HSDAKTYLHW LLQKPGQPPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTDFP  
YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE  
VTHQGLSSPV TKSFNREGC

## IX Эталонные антитела

### A Эталонные антитела к PD-1 человека

[00374] Для того чтобы оценить и описать новые молекулы, связывающие PD-1 человека, согласно настоящему изобретению, использовали следующие эталонные антитела: ниволюмаб (также известное как 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106 и выпущенное на рынок под наименованием OPDIVO<sup>®</sup> компанией Bristol-Myers Squibb), антитело IgG4 человека, обозначенное в настоящем документе как «MAT к PD-1 A», и пембролизумаб (ранее известное как ламбролизумаб, также известное как MK-3475, SCH-900475, и выпущенное на рынок под наименованием KEYTRUDA<sup>®</sup> компанией Merck) гуманизированное антитело IgG4, обозначенное в настоящем документе как «MAT к PD-1 B».

#### 1 Ниволюмаб («MAT к PD-1 A»)

[00375] Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи MAT к PD-1 A содержит аминокислотную последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 64) (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV  
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND  
DYWGQGTLLV TSS

[00376] Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи MAT к PD-1 A содержит аминокислотную последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 65) (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ  
GTKVEIK

## 2 Пембролизумаб («МАТ к PD-1 В»)

[00377] Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи МАТ к PD-1 В содержит аминокислотную последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 66) (остатки CDR<sub>H</sub> выделены подчеркиванием):

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG  
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD  
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

[00378] Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи МАТ к PD-1 В содержит аминокислотную последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 67) (остатки CDR<sub>L</sub> выделены подчеркиванием):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL  
LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL  
TFGGGTKVEIK

## X Способы получения

[00379] Полинуклеотид к PD-1 человека и другие агонисты, антагонисты и модуляторы PD-1 могут быть созданы из полинуклеотидов и/или последовательностей антител к PD-1 1-15 с помощью способов, известных в данной области техники, например, синтетических или рекомбинантных способов. Один из способов получения указанных пептидных агонистов, антагонистов и модуляторов включает химический синтез полипептида с последующей обработкой в условиях окисления, подходящих для получения нативной конформации, т. е. правильных дисульфидных связей. Указанный способ можно осуществлять с использованием методологий, хорошо известных специалистам в данной области техники (см., например, Kelley, R. F. *et al.* (1990) In: GENETIC ENGINEERING PRINCIPLES AND METHODS, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19; Stewart, J.M *et al.* (1984) SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; см. также патенты США №№4105603; 3972859; 3842067; и 3862925).

[00380] Полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть легко получены с использованием твердофазного пептидного синтеза (Merrifield, B. (1986) «*Solid Phase Synthesis*», Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) «*General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids*», Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)

82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) «*Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century*», Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

[00381] Согласно другому варианту реализации полностью человеческие антитела, содержащие один или более CDR из МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1, или тех, которые конкурируют с МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1 за связывание с PD-1 человека или его растворимой формой, можно получить с помощью коммерчески доступных линий мышей, которые были модифицированы для экспрессии специфичных белков иммуноглобулинов человека. Трансгенные животные, которые предназначены для получения более желательного (например, полностью человеческих антител) или более устойчивого иммунного ответа, также могут быть использованы для получения гуманизированных антител или антител человека. Примеры подходящей технологии включают XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Фримонт, Калифорния, США), HUMAB-MOUSE® и TC MOUSE™ (обе технологии от Medarex, Inc., Принстон, Нью-Джерси, США).

[00382] В другом варианте антитела могут быть получены рекомбинантными способами и экспрессированы с использованием любого способа, известного в данной области техники. Антитела могут быть получены рекомбинантным способом, путем сначала выделения антител, полученных от животных-хозяев, получения последовательности гена и затем использования последовательности гена для рекомбинантной экспрессии антитела в клетках-хозяевах (например, клетках линии CHO). Другой способ, который можно применять, представляет собой экспрессию последовательности антитела в растениях (например, табаке) или трансгенном молоке. Были раскрыты подходящие способы рекомбинантной экспрессии антител в растениях или молоке (см., например, Peeters *et al.* (2001) «*Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants*», Vaccine 19:2756; Lonberg, N. *et al.* (1995) «*Human Antibodies From Transgenic Mice*», Int. Rev. Immunol 13:65-93; и Pollock *et al.* (1999) «*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*», J. Immunol Methods 231:147-157). Подходящие способы получения производных антител, например, гуманизированных, одноцепочечных и т. д, известны в данной области техники. В другом варианте антитела могут быть получены рекомбинантными способами с помощью технологии фагового дисплея (см., например, патенты США №№5565332, 5580717, 5733743, 6265150 и Winter,

G. et al. (1994) «*Making Antibodies By Phage Display Technology*», Annu. Rev. Immunol. 12:433-455).

[00383] Антитела или белок, представляющий интерес, могут быть подвергнуты секвенированию с помощью расщепления по Эдману, которое хорошо известно специалистам в данной области техники. Информация о пептиде, полученная на основании данных масс-спектрометрии или расщепления по Эдману, может быть использована для разработки зондов или праймеров, которые используют для клонирования белка, представляющего интерес.

[00384] Альтернативный способ клонирования белка, представляющего интерес, представляет собой «панорамирование» с использованием очищенного PD-1 или его частей для клеток, экспрессирующих представляющее интерес антитело или белок, который содержит один или более CDR из МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1, или антитела, которое конкурирует с МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1 за связывание с PD-1 человека. Процедура «панорамирования» может быть проведена путем получения библиотеки кДНК из тканей или клеток, которые экспрессируют PD-1, гиперэкспрессии кДНК во втором типе клеток и скрининга трансфицированных клеток второго типа для оценки специфического связывания с PD-1 в присутствии или в отсутствие МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1. Подробные описания способов, используемых в клонировании генов млекопитающих, кодирующих белки клеточной поверхности, путем «панорамирования», можно найти в данной области техники (см., например, Aruffo, A. et al. (1987) «*Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System*», Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577 и Stephan, J. et al. (1999) «*Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation*», Endocrinol. 140:5841-5854).

[00385] Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотиды, могут быть введены в клетку-хозяина любым из ряда подходящих способов, включая электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами;

липофекцию; и инфицирование (например, если вектор представляет собой инфекционный агент, такой как вирус коровьей оспы). Выбор векторов или полинуклеотидов для введения часто будет зависеть от особенностей клетки-хозяина.

[00386] Любая клетка-хозяин, способная к гиперэкспрессии гетерологичных ДНК, может быть использована для выделения генов, кодирующих антитело, полипептид или белок, представляющий интерес. Неограничивающие примеры подходящих клеток-хозяев млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, клетки линии COS, HeLa и CHO. Предпочтительно клетки-хозяева экспрессируют кДНК на уровне примерно в 5 раз выше, более предпочтительно в 10 раз выше, еще более предпочтительно в 20 раз выше, чем уровень соответствующего эндогенного антитела или белка, представляющего интерес, если он присутствует, в клетке-хозяине. Скрининг клеток-хозяев для определения специфичного связывания с PD-1 осуществляют с помощью иммунологического количественного исследования или флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS). Клетка, гиперэкспрессирующая антитело или белок, представляющий интерес, может быть идентифицирована.

[00387] В область настоящего изобретения включены полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность антител согласно настоящему изобретению. Полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть получены способами, известными в данной области техники. Полипептиды могут быть получены путем протеолитического или другого типа расщепления антител, рекомбинантными способами (т. е. одиночные или гибридные полипептиды), как описано выше, или с помощью химического синтеза. Полипептиды антител, особенно более короткие полипептиды, содержащие не более приблизительно 50 аминокислот, обычно получают путем химического синтеза. Способы химического синтеза известны в данной области техники и являются коммерчески доступными. Например, полипептид к PD-1 человека может быть получен с помощью автоматического синтезатора полипептидов, используя твердофазный способ.

[00388] В область настоящего изобретения включены варианты антител MAT к PD-1 1, MAT 2 к PD-1, MAT 3 к PD-1, MAT 4 к PD-1, MAT 5 к PD-1, MAT 6 к PD-1, MAT 7 к PD-1, MAT 8 к PD-1, MAT 9 к PD-1, MAT 10 к PD-1, MAT 11 к PD-1, MAT 12 к PD-1, MAT 13 к PD-1, MAT 14 к PD-1 или MAT 15 к PD-1 и их полипептидных фрагментов, которые связываются с PD-1, включая функционально эквивалентные антитела и гибридные полипептиды, которые не оказывают существенного влияния на свойства указанных молекул, а также варианты, которые имеют повышенную или пониженную активность. Модификация полипептидов является стандартным способом в данной

области техники и не нуждается в подробном описании в настоящем документе. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными заменами остатков аминокислот, одной или более делециями или добавлениями аминокислот, которые не оказывают значительного вредного влияния на функциональную активность, или использование химических аналогов. Остатки аминокислот, которые могут быть консервативно замещены друг другом, включают, но не ограничиваются ими: глицин/аланин; серин/треонин; валин/изолейцин/лейцин; аспарагин/глутамин; аспарагиновую кислоту/глутаминовую кислоту; лизин/аргинин; и фенилаланин/тирозин. Подходящие полипептиды также включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также полипептиды с другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование различными сахарами, ацетилирование и фосфорилирование. Предпочтительно замены аминокислот будут консервативными, т.е. замененная аминокислота будет обладать химическими свойствами, сходными с таковыми исходной аминокислоты. Подходящие консервативные замены известны в данной области техники, и примеры были приведены выше. Модификации аминокислот могут варьироваться от изменения или модификации одной или более аминокислот до полной реорганизации области, такой как вариабельный домен. Изменения в вариабельном домене могут изменять аффинность связывания и/или специфичность. Другие способы модификации включают использование методик соединения, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, ферментативные способы, окислительную замену и хелатирование. Модификации могут быть использованы, например, для прикрепления меток для иммунологического количественного исследования, таких как прикрепление радиоактивных фрагментов для радиоиммунологического количественного исследования. Модифицированные полипептиды получают с использованием процедур, традиционных в данной области техники, и могут быть подвергнуты скринингу с использованием стандартных количественных исследований, известных в данной области техники.

[00389] В область настоящего изобретения включены гибридные белки, содержащие один или более полипептидов или антител МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1 согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации согласно настоящему изобретению предложен гибридный полипептид, который содержит легкую цепь, тяжелую цепь или обе легкую и тяжелую цепи. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гибридный полипептид содержит

гетерологичную константную область иммуноглобулина. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гибридный полипептид содержит переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи антитела, вырабатываемого гибридами, депонированными в общедоступных базах. Для целей настоящего изобретения гибридный белок антитела содержит один или более полипептидных доменов, которые специфично связываются с PD-1, и другую аминокислотную последовательность, к которой он не присоединен в нативной молекуле, например, гетерологичную последовательность или гомологичную последовательность из другой области.

## **XI Применение PD-1-связывающих молекул согласно настоящему изобретению**

[00390] В область настоящего изобретения включены композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению (например, антитела к PD-1, биспецифические диатела к PD-1 и т.д.), полипептиды, полученные из указанных молекул, полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие указанные молекулы или полипептиды, и другие агенты, описанные в настоящем документе.

### **A Варианты терапевтического применения**

[00391] Как обсуждалось выше, PD-1 играет важную роль в отрицательной регуляции пролиферации, функции и гомеостаза Т-клеток. Некоторые из PD-1-связывающих молекул согласно настоящему изобретению обладают способностью ингибировать функцию PD-1 и тем самым обращать ингибирование иммунной системы, опосредованное PD-1. В этой связи МАТ к PD-1 1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1, их гуманизированные производные и молекулы, содержащие их PD-1-связывающие фрагменты (например, биспецифические антитела, биспецифические диатела (включая, но не ограничиваясь ими, DART-A, DART-B, DART-C, DART-D, DART-E, DART-F, DART-G, DART-H, DART-I и DART-J) и т.д.), или те, которые конкурируют за связывание с указанными антителами, могут быть использованы для блокирования ингибирования иммунной системы, опосредованного PD-1, и тем самым способствуют активации иммунной системы.

[00392] Указанные биспецифические PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению, которые связываются с PD-1, и другой молекулой, участвующей в регуляции контрольной точки иммунного ответа, которая присутствует на поверхности клетки (например, LAG-3), усиливают иммунную систему, блокируя



ингибирование иммунной системы, опосредованное PD-1 и указанными молекулами контрольной точки иммунного ответа. Соответственно, указанные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно применять для усиления иммунного ответа (например, опосредуемого Т-клетками иммунного ответа) субъекта. В частности, указанные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения любых заболеваний или состояний, связанных с нежелательно подавленной иммунной системой, включая рак и заболевания, которые связаны с присутствием патогена (например, бактериальную, грибковую, вирусную инфекцию или инфекцию простейшими).

[00393] Виды рака, которые можно лечить с использованием указанных PD-1-связывающих молекул согласно настоящему изобретению, включают виды рака, характеризующиеся присутствием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки: опухоли надпочечников, ассоциированного со СПИДом рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака мочевого пузыря, рака костей, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, рака молочной железы, опухолей сонной артерии, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной карциномы клеток почек, светлоклеточной карциномы, рака толстой кишки, колоректального рака, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, экстраклеточной миксоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или желчного протока, рака желудка, гестационного трофобластного заболевания, герминогенной опухоли, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли островковых клеток, саркомы Капоши, рака почек, лейкоза, липомы/доброкачественной липоматозной опухоли, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легких, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринных опухолей, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухоли паращитовидной железы, педиатрического рака, опухоли оболочек периферических нервов, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, постериальной увеальной меланомы, редкого гематологического расстройства, метастатического рака почек, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, карциномы тимуса, тимомы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки.

[00394] В частности, указанные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут быть использованы для лечения колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, глиомы, рака почек, рака молочной железы, множественной миеломы, рака мочевого пузыря, нейробластомы, саркомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичников, рака поджелудочной железы и рака прямой кишки.

[00395] Связанные с патогенами заболевания, которые можно лечить с использованием указанных PD-1-связывающих молекул согласно настоящему изобретению, включают хронические вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные инфекции. Хронические инфекции, которые можно лечить с использованием PD-1-связывающих молекул согласно настоящему изобретению, включают вирус Эпштейна-Барр, вирус гепатита А (HAV); вирус гепатита В (HBV); вирус гепатита С (HCV); вирусы герпеса (например, HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус везикулярного стоматита (VSV), инфекции, вызванные *Bacilli*, *Citrobacter*, *Cholera*, *Diphtheria*, *Enterobacter*, *Gonococci*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Meningococci*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Pneumococci*, бактериями риккетсиями, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Tetanus*, *Aspergillus (fumigatus, niger* и т. д.), *Blastomyces dermatitidis*, *Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis* и т. д.), *Cryptococcus neoformans*, видами рода *Mucorales (mucor, absidia, rhizopus)*, *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Leptospirosis*, *Borrelia burgdorferi*, гельминтными паразитами (анкилостомами, ленточными червями, трематодами, плоскими червями (например, *Giardia lamblia*, *trichinella*, *Dientamoeba Fragilis*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* и *Leishmania donovani*).

[00396] Указанные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно комбинировать с другими противораковыми агентами, в частности, молекулами, которые специфично связываются с раковым антигеном (например, антителами, диателами). Противораковые препараты, которые можно комбинировать с PD-1-связывающими молекулами согласно настоящему изобретению, включают молекулы, которые специфично связываются с еще одним раковым антигеном, включая: 19.9, обнаруженный при раке толстой кишки, в муцинах при раке желудка; 4.2; A33 (антиген колоректальной карциномы, Almquist, Y. 2006, *Nucl Med Biol.* Nov,33(8):991-998); ADAM-9 (публикация патента США 2006/0172350, РСТ публикация WO 06/084075); АН6, обнаруженный при раке желудка; ALCAM (РСТ публикация WO 03/093443); АРО-1 (злокачественный антиген лимфоцитов человека) (Trauth *et al.* (1989) «*Monoclonal*

*Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis*», Science 245:301-304); B1 (Egloff, A.M. et al. 2006, *Cancer Res.* 66(1):6-9); B7-H3 (Collins, M. et al. (2005) «*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*», Genome Biol. 6:223.1-223.7). Chapoval, A. et al. (2001) «*B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- $\gamma$  Production*», Nature Immunol. 2:269–274; Sun, M. et al. (2002) «*Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes*», J. Immunol. 168:6294-6297); BAGE (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84); бета-катенин (Prange W. et al. 2003 *J Pathol.* 201(2):250-9); антигены группы крови ALe<sup>b</sup>/Le<sup>y</sup>, обнаруженные при аденокарциноме толстой кишки; антиген лимфомы Беркитта-38.13, C14, обнаруженный при аденокарциноме толстой кишки; CA125 (антиген карциномы яичников) (Bast, R.C. Jr. et al. 2005 *Int J Gynecol Cancer* 15 Suppl 3:274-81 ; Yu et al. (1991) «*Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants*», Cancer Res. 51(2):468-475); карбоксиаптаидазу М (публикация патента США 2006/0166291); CD5 (Calin, G.A. et al. 2006 *Semin Oncol.* 33(2):167-73; CD19 (Ghetie et al. (1994) «*Anti-CD19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines in vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest*», Blood 83:1329-1336; Troussard, X. et al. 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); CD20 (Reff et al. (1994) «*Depletion Of B Cells in vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20*», Blood 83:435-445; Thomas, D.A. et al. 2006 *Hematol Oncol Clin North Am.* 20(5):1125-36); CD22 (Kreitman, R.J. 2006 *AAPS J.* 18;8(3):E532-51); CD23 (Rosati, S. et al. 2005 *Curr Top Microbiol Immunol.* 5;294:91-107); CD25 (Troussard, X. et al. 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); CD27 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD28 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD33 (Sgouros et al. (1993) «*Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody M195 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia*», J. Nucl. Med. 34:422-430); CD36 (Ge, Y. 2005 *Lab Hematol.* 11(1):31-7); CD40/CD154 (Messmer, D. et al. 2005 *Ann N Y Acad Sci.* 1062:51-60); CD45 (Jurcic, J.G. 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5):339-46); CD56 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD46 (патент США №7148038; РСТ публикация WO 03/032814); CD52 (Eketorp, S.S. et al. (2014) «*Alemtuzumab (Anti-CD52 Monoclonal Antibody) As Single-Agent Therapy In Patients With Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL)-A Single Region Experience On Consecutive Patients*», Ann Hematol. 93(10):1725-1733; Suresh, T. et al. (2014) «*New Antibody Approaches To Lymphoma Therapy*», J. Hematol. Oncol. 7:58; Hoelzer, D. (2013) «*Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia*», Curr. Opin. Oncol. 25(6):701-706); CD56 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD79a/CD79b (Troussard, X. et al. 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48; Chu, P.G. et al. 2001 *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 9(2):97-106); CD103 (Troussard, X. et al. 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); CD317 (Kawai, S. et al. (2008)

«*Interferon- $\alpha$  Enhances CD317 Expression And The Antitumor Activity Of Anti-CD317 Monoclonal Antibody In Renal Cell Carcinoma Xenograft Models*», *Cancer Science* 99(12):2461-2466; Wang, W. et al. (2009) *HM1.24 (CD317) Is A Novel Target Against Lung Cancer For Immunotherapy Using Anti-HM1.24 Antibody*», *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58(6):967-976; Wang, W. et al. (2009) «*Chimeric And Humanized Anti-HM1.24 Antibodies Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Against Lung Cancer Cells. Lung Cancer*», 63(1):23-31; Sayeed, A. et al. (2013) «*Aberrant Regulation Of The BST2 (Tetherin) Promoter Enhances Cell Proliferation And Apoptosis Evasion In High Grade Breast Cancer Cells*», *PLoS ONE* 8(6):e67191, pp. 1-10); CDK4 (Lee, Y.M. et al. 2006 *Cell Cycle* 5(18):2110-4); CEA (карциноэмбриональный антиген; Foon et al. (1995) «*Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotypic Antibody Vaccine*», *J. Clin. Invest.* 96(1):334-42); Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. et al. 2005 *Rev Invest Clin.* 57(6):814-9); CEACAM9/CEACAM6 (Zheng, C. et al. (2011) «*A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity*», *PLoS One* 6(6):e21146, pp. 1-11); CO17-1A (Ragnhammar et al. (1993) «*Effect Of Monoclonal Antibody 17-1A And GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma - Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced*», *Int. J. Cancer* 53:751-758); CO-43 (антиген группы крови Le<sup>b</sup>); CO-514 (антиген группы крови Le<sup>a</sup>), обнаруженный при аденокарциноме; CTA-1; CTLA-4 (Peggs, K.S. et al. 2006 *Curr Opin Immunol.* 18(2):206-13); цитокератин 8 (PCT публикация WO 03/024191); D1.1; D<sub>156-22</sub>; DR5 (Abdulghani, J. et al. (2010) «*TRAIL Receptor Signaling And Therapeutics*», *Expert Opin. Ther. Targets* 14(10):1091-1108; Andera, L. (2009) «*Signaling Activated By The Death Receptors Of The TNFR Family*», *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* 153(3):173-180; Carlo-Stella, C. et al. (2007) «*Targeting TRAIL Agonistic Receptors for Cancer Therapy*», *Clin. Cancer* 13(8):2313-2317; Chaudhari, B.R. et al. (2006) «*Following the TRAIL to Apoptosis*», *Immunologic Res.* 35(3):249-262); ряд E<sub>1</sub> (группа крови B), обнаруженный при раке поджелудочной железы; EGFR (рецептор эпидермального фактора роста, Adenis, A. et al. 2003 *Bull Cancer.* 90 Spec No:S228-32); эфрин (и, в частности, EphA2 (патент США 7569672, PCT публикация WO 06/084226), Erb (ErbB1, ErbB3, ErbB4, Zhou, H. et al. 2002 *Oncogene* 21(57):8732-8740; Rimon, E. et al. 2004 *Int J Oncol.* 24(5):1325-1338); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. et al. 2006 *Int J Cancer.* 118(1):123-128); GD2/GD3/GM2 (Livingston, P.O. et al. 2005 *Cancer Immunol Immunother.* 54(10):1018-1025); ганглиозид GD2 (G<sub>D2</sub>; Saleh et al. (1993) «*Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen*», *J. Immunol.*, 151, 3390-3398); ганглиозид GD3 (G<sub>D3</sub>; Shitara et al. (1993) «*A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3)*

*Antibody With Enhanced Antitumor Activities*», *Cancer Immunol. Immunother.* 36:373-380); ганглиозид GM2 (G<sub>M2</sub>; Livingston *et al.* (1994) «*Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside*», *J. Clin. Oncol.* 12:1036-1044); ганглиозид GM3 (G<sub>M3</sub>; Hoon *et al.* (1993) «*Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers*», *Cancer Res.* 53:5244-5250); GICA 19-9 (Herlyn *et al.* (1982) «*Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma*», *J. Clin. Immunol.* 2:135-140); gp100 (Lotem, M. *et al.* 2006 *J Immunother.* 29(6):616-27); Gp37 (Т-клеточный антиген лейкоза человека, Bhattacharya-Chatterjee *et al.* (1988) «*Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Ab1, Ab2, and Ab3)*», *J. Immunol.* 141:1398-1403); gp75 (антиген меланомы; Vijayasardahl *et al.* (1990) «*The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product*», *J. Exp. Med.* 171(4):1375-1380); gpA33 (Heath, J.K. *et al.* (1997) «*The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily*», *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 94(2):469-474; Ritter, G. *et al.* (1997) «*Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium*», *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236(3):682-686; Wong, N.A. *et al.* (2006) «*EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia*», *J. Clin. Pathol.* 59(3):260-263); антиген HER2 (HER2/neu, p185<sup>HER2</sup>; Kumar, Pal S *et al.* 2006 *Semin Oncol.* 33(4):386-91); HMFG (антиген глобулы молочного жира человека, WO1995015171); папилломавирус-Е6 человека/папилломавирус-Е7 человека (DiMaio, D. *et al.* 2006 *Adv Virus Res.* 66:125-59); HMW-МАО (высокомолекулярный антиген меланомы, Natali *et al.* (1987) «*Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance*», *Cancer* 59:55-63; Mittelman *et al.* (1990) «*Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies*», *J. Clin. Invest.* 86:2136-2144); антиген I (дифференцировочный антиген, Feizi (1985) «*Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens*», *Nature* 314:53-57); IL13R $\alpha$ 2 (PCT публикация WO 2008/146911; Brown, C.E. *et al.* (2013) «*Glioma IL13R $\alpha$ 2 Is Associated With Mesenchymal Signature Gene Expression And Poor Patient Prognosis*», *PLoS One.* 18;8(10):e77769; Barderas, R. *et al.* (2012) «*High Expression Of IL-13 Receptor A2 In Colorectal Cancer Is*

*Associated With Invasion, Liver Metastasis, And Poor Prognosis*», *Cancer Res.* 72(11):2780-2790; Kasaian, M.T. *et al.* (2011) «*IL-13 Antibodies Influence IL-13 Clearance In Humans By Modulating Scavenger Activity Of IL-13Ra2*», *J. Immunol.* 187(1):561-569; Bozinov, O. *et al.* (2010) «*Decreasing Expression Of The Interleukin-13 Receptor IL-13Ralpha2 In Treated Recurrent Malignant Gliomas*», *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 50(8):617-621; Fujisawa, T. *et al.* (2009) «*A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis*», *Cancer Res.* 69(22):8678-8685); интегрин  $\beta 6$  (РСТ публикация WO 03/087340); JAM-3 (РСТ публикация WO 06/084078); KID3 (РСТ публикация WO 05/028498); KID31 (РСТ публикация WO 06/076584); общий антиген карциномы KS 1/4 Hellström *et al.* (1986) «*Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma*», *Cancer Res.* 46:3917-3923); LEA; LUCA-2 (публикации патентов США 2006/0172349; РСТ публикация WO 06/083852); M1:22:25:8; M18; M39; MAGE (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84); MART (Kounalakis, N. *et al.* 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5):377-82; мезотелин (Chang K, and Pastan I. 1996 «*Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers*», *Proc Natl Acad Sci USA* 93:136–40), MUC-1 (Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46); MUM-1 (Castelli, C. *et al.* 2000 *J Cell Physiol.* 182(3):323-31); Myl; N-ацетилглюкозаминилтрансферазу (Dennis, J.W. 1999 *Biochim Biophys Acta.* 6;1473(1):21-34); неогликопротеин; NS-10, обнаруженный при аденокарциномах; OFA-1; OFA-2; онкостатин М (рецептор онкостатина бета, патент США №7572896, РСТ публикация WO 06/084092); p15 (Gil, J. *et al.* 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(9):667-77); p97 (ассоциированный с меланомой антиген; Estin *et al.* (1989) «*Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97*», *J. Natl. Cancer Instit.* 81(6):445-454); PEM (полиморфный эпителиальный муцин, Hilkens *et al.* (1992) «*Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property*», *Trends in Biochem. Sci.* 17:359-363); PEМА (антиген полиморфного эпителиального муцина); PIPA (патент США №7405061, РСТ публикация WO 04/043239); PSA (антиген предстательной железы, Henttu *et al.* (1989) «*cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes*», *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10(2):903-910; Israeli *et al.* (1993) «*Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen*», *Cancer Res.* 53:227-230; Cracco, С.М. *et al.* 2005 *Minerva Urol Nefrol.* 57(4):301-11); PSMA (специфичный для простаты мембранный антиген, Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-180); простатическая кислая фосфатаза (Tailor *et al.* (1990) «*Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone*», *Nucl. Acids Res.*

18(16):4928); R<sub>24</sub>, обнаруженный при меланоме; ROR1 (патент США №5843749); сфинголипиды; SSEA-1; SSEA-3; SSEA-4; sTn (Holmberg, L.A. 2001 *Expert Opin Biol Ther.* 1(5):881-91); Т-клеточный рецептор, полученный из кожной Т-клеточной лимфомы (см. Edelson (1998) «*Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy*», *Cancer J Sci Am.* 4:62-71); Т<sub>5A7</sub>, обнаруженный в миелоидных клетках; TAG-72 (Yokota *et al.* (1992) «*Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms*», *Cancer Res.* 52:3402-3408); TL5 (группа крови А); рецептор TNF (рецептор TNF- $\alpha$ , рецептор TNF- $\beta$ ; рецептор TNF- $\gamma$  (van Horssen, R. *et al.* 2006 *Oncologist.* 11(4):397-408; Gardnerova, M. *et al.* 2000 *Curr Drug Targets.* 1(4):327-64); TRA-1-85 (группа крови Н), рецептор трансферрина (патент США №7572895, РСТ публикация WO 05/121179), 5T4 (TPBG, гликопротеин трофобласта; Boghaert, E.R. *et al.* (2008) «*The Oncofetal Protein, 5T4, Is A Suitable Target For Antibody-Guided Anti-Cancer Chemotherapy With Calicheamicin*», *Int. J. Oncol.* 32(1):221-234; Eisen, T. *et al.* (2014) «*Naptumomab Estafenatox: Targeted Immunotherapy with a Novel Immunotoxin*», *Curr. Oncol. Rep.* 16:370, pp. 1-6); TSTA (опухолеспецифичный трансплантационный антиген), например, вирусно-индуцированные опухолевые антигены, включая Т-антиген ДНК-содержащих опухолевых вирусов и антигены оболочки РНК-содержащих опухолевых вирусов, онкофетальный антиген-альфа-фетопротеин, такой как СЕА толстой кишки, онкофетальный антиген опухоли мочевого пузыря (Hellström *et al.* (1985) «*Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas*», *Cancer. Res.* 45:2210-2188); VEGF (Pietrantonio, F. *et al.* (2015) «*Bevacizumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy For Colorectal Cancer Liver Metastases: Pitfalls And Helpful Tricks In A Review For Clinicians*», *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 95(3):272-281; Grabowski, J.P. (2015) «*Current Management Of Ovarian Cancer*», *Minerva Med.* 106(3):151-156; Field, K.M. (2015) «*Bevacizumab And Glioblastoma: Scientific Review, Newly Reported Updates, And Ongoing Controversies*», *Cancer* 121(7):997-1007; Suh, D.H. *et al.* (2015) «*Major Clinical Research Advances In Gynecologic Cancer In 2014*», *J. Gynecol. Oncol.* 26(2):156-167; Liu, K.J. *et al.* (2015) «*Bevacizumab In Combination With Anticancer Drugs For Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer*», *Tumour Biol.* 36(3):1323-1327; Di Bartolomeo, M. *et al.* (2015) «*Bevacizumab treatment in the elderly patient with metastatic colorectal cancer*», *Clin. Interv. Aging* 10:127-133); рецептор VEGF (O'Dwyer. P.J. 2006 *Oncologist.* 11(9):992-998); VEP8; VEP9; VIM-D5; и гаптен Y, Le<sup>y</sup>, обнаруженный в клетках эмбриональной карциномы.

[00397] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению используют в комбинации с одной или более молекулами, которые специфично связываются с 5T4,

B7H3, CD19, CD20, CD51, CD123, DR5, EGFR, EpCam, GD2, gpA33, HER2, ROR-1, TAG-72, антителом к VEGF-A и/или VEGFR2.

[00398] Указанные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно комбинировать с иммуногенным агентом, таким как опухолевая вакцина. Подходящие вакцины могут содержать очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), аутологичные или аллогенные опухолевые клетки. Было описано несколько стратегий, касающихся опухолевых вакцин (см., например, Palena, C., *et al.*, (2006) «*Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies*», Adv. Cancer Res. 95, 115-145; Mellman, I., *et al.* (2011) «*Cancer immunotherapy comes of age*», Nature 480, 480–489; Zhang, X. M. *et al.* (2008) «*The anti-tumor immune response induced by a combination of MAGE-3/MAGE-n-derived peptides*», Oncol. Rep. 20, 245–252; Disis, M. L. *et al.* (2002) «*Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines*», J. Clin. Oncol. 20, 2624–2632; Vermeij, R. *et al.* (2012) «*Potentiation of a p53-SLP vaccine by cyclophosphamide in ovarian cancer: a single-arm phase II study.*» Int. J. Cancer 131, E670–E680). Указанные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно комбинировать с химиотерапевтическими схемами. В этих случаях существует возможность снижения дозы вводимого химиотерапевтического реагента (Mokyr *et al.* (1998) Cancer Research 58: 5301-5304).

[00399] Указанные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно комбинировать с другими иммуностимулирующими молекулами, такими как антитела, которые активируют восприимчивость иммунной системы хозяина, чтобы обеспечить повышенные уровни активации Т-клеток. В частности, было показано, что антитела к PD-1, антитела к PD-L1 и/или антитела к CTLA-4 активируют иммунную систему (см., например, del Rio, M-L. *et al.* (2005) «*Antibody-Mediated Signaling Through PD-1 Costimulates T Cells And Enhances CD28-Dependent Proliferation*», Eur. J. Immunol 35:3545-3560; Barber, D. L. *et al.* (2006) «*Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*», Nature 439, 682–687; Iwai, Y. *et al.* (2002) «*Involvement Of PD-L1 On Tumor Cells In The Escape From Host Immune System And Tumor Immunotherapy By PD-L1 Blockade*», Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 12293–12297; Leach, D. R., *et al.*, (1996) «*Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade*», Science 271, 1734-1736). Дополнительные иммуностимулирующие молекулы, которые можно комбинировать с PD-1-связывающими молекулами согласно настоящему изобретению, включают антитела к молекулам на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию дендритных клеток (ДК) и представление антигена, антитела к CD40, способные заменить



активность хелперных Т-клеток, и активирующие антитела к костимулирующим молекулам Т-клеток, таким как PD-L1, CTLA-4, OX-40 4-1BB и ICOS (см., например, Ito *et al.* (2000) «*Effective Priming Of Cytotoxic T Lymphocyte Precursors By Subcutaneous Administration Of Peptide Antigens In Liposomes Accompanied By Anti-CD40 And Anti-CTLA-4 Antibodies*», *Immunobiology* 201:527-40; патент США №5811097; Weinberg *et al.* (2000) «*Engagement of the OX-40 Receptor in vivo Enhances Antitumor Immunity*», *Immunol* 164:2160-2169; Melero *et al.* (1997) «*Monoclonal Antibodies Against The 4-1BB T-Cell Activation Molecule Eradicate Established Tumors*», *Nature Medicine* 3: 682-685; Hutloff *et al.* (1999) «*ICOS Is An Inducible T-Cell Co-Stimulator Structurally And Functionally Related To CD28*», *Nature* 397: 263-266; и Moran, A.E. *et al.* (2013) «*The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 As Targets For Cancer Immunotherapy*», *Curr Opin Immunol.* 2013 Apr; 25(2): 10.1016/j.coi.2013.01.004), и/или стимулирующие химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие антигенсвязывающий домен, направленный к антигену заболевания, гибридный с одним или более внутриклеточными сигнальными доменами из различных костимулирующих белковых рецепторов (например, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40 и т. д.), которые служат для стимуляции Т-клеток при связывании антигена (см., например, Tettamanti, S. *et al.* (2013) «*Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor*», *Br. J. Haematol.* 161:389-401; Gill, S. *et al.* (2014) «*Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells*», *Blood* 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. *et al.* (2013) «*T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia*», *Blood* 122:3138-3148; Pizzitola, I. *et al.* (2014) «*Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo*», *Leukemia* doi:10.1038/leu.2014.62).

[00400] Указанные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно комбинировать с ингибирующим химерным антигенным рецептором (iCAR) для перенаправления нацеленных иммунотерапевтических ответов. iCAR содержит антигенсвязывающий домен, направленный к антигену заболевания, гибридный с одним или более внутриклеточными сигнальными доменами из различных ингибирующих белковых рецепторов (например, CTLA-4, PD-1 и т. д.), которые служат для ограничения ответов Т-клеток при связывании с антигеном (см., например, Fedorov V.D. (2013) «*PD-1- and CTLA-4-Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses*», *Sci. Transl. Med.* 5:215ra172 doi:10.1126/scitranslmed.3006597.

[00401] В частности, указанные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению используют в комбинации с антителом к CD137, антителом к CTLA-4, антителом к OX40, антителом к LAG-3, антителом к PD-L1, антителом к TIGIT, антителом к TIM-3 и/или противораковой вакциной.

## **В Диагностическая и лечебно-диагностическая полезность**

[00402] Некоторые из PD-1-связывающих молекул согласно настоящему изобретению не способны или проявляют слабую способность блокировать связывание PD-1 с лигандом PD-1L. В этой связи антитела МАТ 2 к PD-1 и МАТ 4 к PD-1, их гуманизированные производные, а также молекулы, содержащие их PD-1-связывающие фрагменты (например, биспецифические диатела, и т.д.), или те, которые конкурируют за связывание с указанными антителами, могут быть помечены детектируемой меткой (например, с использованием радиоактивных, ферментативных, флуоресцентных, хемилюминесцентных, парамагнитных, диамагнитных или других меченых фрагментов) и используются для детектирования PD-1 в образцах или визуализации PD-1 на клетках. Поскольку указанные молекулы не влияют на биологическую активность PD-1, они особенно полезны в способах определения степени, местоположения и изменения экспрессии PD-1 у субъектов (например, у субъектов, которых лечат от рака, связанного с экспрессией или нацеленным воздействием на PD-1).

## **ХII Фармацевтические композиции**

[00403] Композиции согласно настоящему изобретению включают нерасфасованные лекарственные композиции, пригодные для изготовления фармацевтических композиций (например, неочищенных или нестерильных композиций) и фармацевтических композиций (т.е., композиций, которые подходят для введения субъекту или пациенту), которые могут быть использованы в приготовлении стандартных лекарственных форм. Подходящие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество PD-1-связывающих молекул согласно настоящему изобретению или комбинацию подходящих агентов и фармацевтически приемлемого носителя. Предпочтительно композиции согласно настоящему изобретению содержат профилактически или терапевтически эффективное количество PD-1-связывающих молекул согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В область настоящего изобретения в частности включены подходящие фармацевтические композиции, в которых PD-1-связывающая молекула представляет собой: МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1; гуманизированное МАТ к PD-1 1; МАТ 2 к

PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1; PD-1-связывающий фрагмент любого указанного антитела; или в которых PD-1-связывающая молекула представляет собой биспецифическое диатело к PD-1- (например, биспецифическое диатело PD-1×LAG-3). В область настоящего изобретения включены в частности молекулы, которые содержат 3 CDR<sub>L</sub> и 3 CDR<sub>H</sub> из МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1; гуманизированного МАТ к PD-1 1; МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1.

[00404] В область настоящего изобретения также включены такие фармацевтические композиции, которые дополнительно содержат второе терапевтическое антитело (например, специфичное для опухолей моноклональное антитело), которое является специфичным в отношении конкретного ракового антигена, и фармацевтически приемлемый носитель.

[00405] Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для использования у животных и, более конкретно, у человека. Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полному и неполному), вспомогательному веществу или носителю, с которым вводят лекарственное соединение. Подходящими фармацевтическими носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтепродуктов, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Физиологические солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т. п. Композиция, если необходимо, также может содержать

незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферных агентов для поддержания pH. Подходящие композиции могут быть в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, композиций с замедленным высвобождением и т. п.

[00406] Обычно ингредиенты композиций согласно настоящему изобретению поставляют по отдельности или смешивают с получением стандартной дозированной формы, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или концентрата, не содержащего воды, в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. В том случае, если композиция должна быть введена путем инфузии, она может быть распределена с инфузионной бутылкой, содержащей стерильную фармацевтическую воду или физиологический раствор. В том случае, если композицию вводят путем инъекции, может быть обеспечена ампула стерильной воды для инъекций или физиологического раствора так, что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

[00407] Композиции согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются ими, соли, образованные с анионами, такими как анионы, полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т. д., и те, которые образованы катионами, такими как катионы, полученные из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т. д.

[00408] Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных PD-1-связывающей молекулой согласно настоящему изобретению (и более предпочтительно МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1; гуманизированным МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1, PD-1-связывающим фрагментом любого из указанных антител, или PD-1-связывающей молекулой, которая представляет собой биспецифическое диатело к PD-1 (например, биспецифическое диатело PD-1×LAG-3)). В область настоящего изобретения в частности включены молекулы, которые содержат 3 CDR<sub>L</sub> и 3 CDR<sub>H</sub>1 из МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к

PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1, по отдельности или с подходящим фармацевтически приемлемым носителем. Помимо этого один или более других профилактических или терапевтических агентов, пригодных для лечения заболевания, также могут быть включены в фармацевтический пакет или набор. Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению. Уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, которое отражает одобрение указанным агентством производства, применения или продажи для введения человеку, может быть необязательно прикреплено к указанному контейнеру (контейнерам).

[00409] Согласно настоящему изобретению также предложены наборы, которые можно применять в вышеуказанных способах. Набор может содержать любую из PD-1-связывающих молекул согласно настоящему изобретению. Набор может дополнительно содержать один или более других профилактических и/или терапевтических агентов, пригодных для лечения рака, в одном или более контейнерах; и/или набор может дополнительно содержать одно или более цитотоксических антител, которые связываются с одним или более раковыми антигенами, ассоциированными с раком. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения другой профилактический или терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения профилактический или терапевтический агент представляет собой биологическое или гормональное терапевтическое средство.

### **XIII Способы введения**

[00410] Композиции согласно настоящему изобретению могут быть обеспечены для лечения, профилактики и улучшения одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или инфекцией, путем введения субъекту эффективного количества гибридного белка или конъюгированной молекулы согласно настоящему изобретению, или фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок или конъюгированную молекулу согласно настоящему изобретению. Согласно предпочтительному аспекту указанные композиции по существу очищены (т.е. по существу не содержат вещества, которые ограничивают их действие или вызывают нежелательные побочные эффекты). Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения субъект представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, такое как млекопитающее, не относящееся к приматам (например,

бычьих, лошадиных, кошачьих, собачьих, грызунов и т. д.), или примата (например, обезьяну, такую как яванская макака, человека и т. д.). Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения субъект является человеком.

[00411] Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения композиций согласно настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицах, микрокапсулах, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать антитело или гибридный белок, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu *et al.* (1987) «*Receptor-Mediated in vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System*», J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты как части ретровирусного или другого вектора и т. д.

[00412] Способы введения молекулы согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, парентеральное введение (например, внутрикожное, внутримышечное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и через слизистые оболочки (например, интраназальный и пероральный пути). Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным. Помимо этого также можно применять легочное введение, например, с использованием ингалятора или распылителя и состава с аэрозольным агентом. См., например, патенты США №№6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540; и 4880078; и РСТ публикации WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; и WO 99/66903, которые все полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

[00413] Согласно настоящему изобретению также предложены PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению, упакованные в герметично закрытый контейнер, такой как ампула или саше, с указанием количества молекулы. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанные молекулы поставляются в виде сухого стерилизованного лиофилизованного порошка или концентрата, не содержащего воды, в герметично закрытом контейнере и могут быть восстановлены, например, с использованием воды или физиологического раствора до соответствующей концентрации для введения субъекту. Предпочтительно PD-1-связывающие молекулы

согласно настоящему изобретению поставляют в виде сухого стерильного лиофилизованного порошка в герметично закрытом контейнере.

[00414] Лиофилизованные PD-1-связывающие молекулы согласно настоящему изобретению следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в их первоначальном контейнере, и молекулы должны быть введены в течение 12 часов, предпочтительно в течение 6 часов, в течение 5 часов, в течение 3 часов или в течение 1 часа после восстановления. В другом варианте реализации указанные молекулы поставляют в жидкой форме в герметично закрытом контейнере с указанием количества и концентрации молекулы, гибридного белка или конъюгированной молекулы. Предпочтительно указанные PD-1-связывающие молекулы, если они обеспечены в жидкой форме, поставляют в герметично закрытом контейнере.

[00415] Количество композиции согласно настоящему изобретению, которая будет эффективной при лечении, предотвращении или улучшении одного или более симптомов, связанных с расстройством, может быть определена с помощью стандартных клинических методик. Точная доза, которая будет применена в составе, также будет зависеть от способа введения и от тяжести состояния, и должна быть определена в соответствии с решением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых зависимости ответа от дозы, полученных из испытательных систем в условиях *in vitro* или животных моделей.

[00416] В настоящей заявке термин «эффективное количество» фармацевтической композиции в одном варианте реализации представляет собой количество, достаточное для получения благоприятных или желательных результатов, включая, но не ограничиваясь ими, клинические результаты, такие как уменьшение симптомов, возникающих в результате заболевания, ослабление симптома инфекции (например, вирусной нагрузки, лихорадки, боли, сепсиса и т. д.) или симптома рака (например, пролиферации раковых клеток, присутствия опухоли, метастаз опухоли и т. д.), повышая тем самым качество жизни индивидуумов, страдающих указанным заболеванием, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, усиление действия другого лекарственного средства, например, путем нацеленного воздействия и/или интернализации, замедление прогрессирования заболевания и/или продление периода выживания индивидуумов.

[00417] Эффективное количество можно вводить с помощью одного или более введений. Для целей настоящего изобретения эффективное количество лекарственного препарата, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для снижения пролиферации (или эффекта) присутствующего

вируса и для уменьшения и/или замедления развития вирусного заболевания, прямо или косвенно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эффективное количество лекарственного препарата, соединения или фармацевтической композиции может быть, но необязательно, достигнуто в комбинации с другим лекарственным препаратом, соединением или фармацевтической композицией. Соответственно, «эффективное количество» может быть рассмотрено применительно к введению одного или более химиотерапевтических агентов, и один агент можно рассматривать как введенный в эффективном количестве, если, в комбинации с одним или более другими агентами, достигнут или может быть достигнут желательный результат. Несмотря на то, что индивидуальные потребности различаются, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств каждого компонента находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники.

[00418] Для PD-1-связывающих молекул, включенных в область настоящего изобретения, дозировка, вводимая пациенту, предпочтительно определена на основании массы тела (кг) субъекта-реципиента. Для PD-1-связывающих молекул, включенных в область настоящего изобретения, вводимая пациенту дозировка, как правило, составляет по меньшей мере приблизительно 0,01 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,05 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,1 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,2 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,5 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 1 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 2 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 20 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,1 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 1 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 3 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 30 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 75 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 100 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 125 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 150 мг/кг или более массы тела субъекта.

[00419] Дозировка и частота введения PD-1-связывающей молекулы согласно настоящему изобретению может быть снижена или изменена путем усиления поглощения и проникновения молекулы в ткани посредством модификаций, таких как, например, липидирование.

[00420] Дозировка PD-1-связывающей молекулы согласно настоящему изобретению, вводимая пациенту, может быть рассчитана для применения в качестве монотерапии. В другом варианте, молекула может быть использована в комбинации с другими



терапевтическими композициями, и вводимая пациенту дозировка является более низкой, чем при введении указанных молекул в виде монотерапии.

[00421] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить локально в область, нуждающуюся в лечении; такое введение может быть достигнуто, например, но не ограничиваясь ими, путем местной инфузии, путем инъекции или с помощью имплантата, причем указанный имплантат представляет собой пористый, непористый или желатинообразный материал, включая мембраны, такие как силастические мембраны, или волокна. Предпочтительно при введении молекулы согласно настоящему изобретению следует проявлять осторожность при использовании материалов, которые не поглощают молекулу.

[00422] Композиции согласно настоящему изобретению могут быть доставлены в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer (1990) «*New Methods Of Drug Delivery*», Science 249:1527-1533); Treat *et al.*, в LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 3 17-327).

[00423] Композиции согласно настоящему изобретению могут быть доставлены в системе с контролируемым высвобождением или в системе с замедленным высвобождением. Любая методика, известная специалисту в данной области техники, может быть использована для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих одну или более PD-1-связывающих молекул согласно настоящему изобретению. См., например, патент США №4526938; PCT публикацию WO 91/05548; PCT публикацию WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) «*Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel*», Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) «*Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions*», PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) «*Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application*», Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; и Lam *et al.* (1997) «*Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery*», Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, которые все полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения в системе с контролируемым высвобождением может быть использован насос (см. Langer, *выше*; Sefton, (1987) «*Implantable Pumps*», CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald *et al.* (1980) «*Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis*», Surgery 88:507-516; и Saudek *et al.* (1989) «*A Preliminary*

*Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery*», N. Engl. J. Med. 321:574-579). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полимерные материалы могут быть использованы для достижения контролируемого высвобождения молекул (см., например, MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy *et al.* (1985) «*Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate*», Science 228:190-192; During *et al.* (1989) «*Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: in vivo Characterization*», Ann. Neurol. 25:351-356; Howard *et al.* (1989) «*Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits*», J. Neurosurg. 7(1):105-112); патент США №5679377; патент США №5916597; патент США №5912015; патент США №5989463; патент США №5123232; PCT публикацию WO 99/15154; и PCT публикацию WO 99/20253). Примеры полимеров, используемых в препаратах с замедленным высвобождением, включают, но не ограничиваются ими, поли-2-гидроксиэтилметакрилат, полиметилметакрилат, полиакриловую кислоту, сополимер этилена и винилацетата, полиметакриловую кислоту, полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли-N-винилпирролидон, поливиниловый спирт, полиакриламид, полиэтиленгликоль, полилактиды (PLA), сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) и полиортоэферы. Система с контролируемым высвобождением может быть размещена вблизи терапевтической мишени (например, легких), в результате этого необходима лишь доля системной дозы (см., например, Goodson, в MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Полимерные композиции, которые можно применять в качестве имплантатов с контролируемым высвобождением, могут быть использованы в соответствии с Dunn *et al.* (см. патент США №5945155). Данный конкретный способ основан на терапевтическом эффекте контролируемого высвобождения биоактивного материала из полимерной системы в условиях *in situ*. Имплантация обычно может происходить в любом месте организма пациента, нуждающегося в терапевтическом лечении. Можно использовать неполимерную систему замедленной доставки, в которой неполимерный имплантат в организме субъекта используется в качестве системы доставки лекарственного препарата. При имплантации в организме органический растворитель имплантата будет распределяться, диспергироваться или выщелачиваться из композиции в окружающую тканевую жидкость, и неполимерный материал будет постепенно коагулировать или осаждаться с образованием твердой микропористой матрицы (см. патент США №5888533).

[00424] Системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (1990, «*New Methods Of Drug Delivery*», Science 249:1527-1533). Любая методика, известная специалисту в данной области техники, может быть использована для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих один или более терапевтических агентов согласно настоящему изобретению. См., например, патент США №4526938; международные публикации WO 91/05548 и WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) «*Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel*», Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) «*Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions*», PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) «*Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application*», Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; и Lam *et al.* (1997) «*Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery*», Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, которые все полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

[00425] Если композиция согласно настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую PD-1-связывающую молекулу согласно настоящему изобретению, то нуклеиновую кислоту можно вводить в условиях *in vivo*, чтобы стимулировать экспрессию PD-1-связывающей молекулы, которую она кодирует, путем конструирования ее как части соответствующего вектора экспрессии нуклеиновой кислоты и путем введения так, чтобы указанный вектор стал внутриклеточным, например, с использованием ретровирусного вектора (см. патент США №4980286) или путем прямой инъекции, или с использованием бомбардировки микрочастицами (например, генной пушки; Biolistic, Dupont), или путем покрытия липидами, или поверхностными рецепторами клеток или трансфецирующими агентами, или путем введения указанного вектора, соединенного с гомеобоксоподобным пептидом, который, как известно, проникает в ядро (см., например, Joliot *et al.* (1991) «*Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis*», Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868), и т.д. В другом варианте, нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и встроена в ДНК клетки-хозяина для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

[00426] Лечение субъекта с использованием терапевтически или профилактически эффективного количества PD-1-связывающей молекулы согласно настоящему изобретению может включать однократную обработку или предпочтительно может включать серию обработок. В предпочтительном примере субъекта лечат с использованием указанного диатела один раз в неделю в течение от 1 до 10 недель, предпочтительно от 2 до 8 недель, более предпочтительно от 3 до 7 недель и еще более

предпочтительно в течение приблизительно 4, 5 или 6 недель. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить один раз в сутки, два раза в сутки или три раза в сутки. В другом варианте фармацевтические композиции можно вводить один раз в неделю, два раза в неделю, раз в две недели, один раз в месяц, один раз каждые шесть недель, один раз в два месяца, два раза в год или один раз в год. Также будет понятно, что эффективная дозировка молекул, используемых для лечения, может увеличиваться или уменьшаться в ходе конкретного лечения.

### **Примеры**

[00427] Следующие примеры иллюстрируют различные способы для композиций в диагностических или лечебных способах согласно настоящему изобретению. Примеры приведены в иллюстративных целях и никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

### **Пример 1**

#### **Характеристика моноклональных антител к PD-1 человека**

[00428] Пятнадцать мышинных моноклональных антител, способных специфично связываться как с PD-1 человека, так и с PD-1 яванских макак, выделяли и обозначали «МАТ к PD-1 1», «МАТ 2 к PD-1», «МАТ 3 к PD-1», «МАТ 4 к PD-1», «МАТ 5 к PD-1», «МАТ 6 к PD-1», «МАТ 7 к PD-1», «МАТ 8 к PD-1», «МАТ 9 к PD-1», «МАТ 10 к PD-1», «МАТ 11 к PD-1», «МАТ 12 к PD-1», «МАТ 13 к PD-1», «МАТ 14 к PD-1» и «МАТ 15 к PD-1». Было обнаружено, что CDR указанных антител отличаются и представлены выше. Связывание с внеклеточным доменом PD-1 человека и яванских макак оценивали следующим образом: 96-луночные планшеты с плоским дном Maxi-Sorb<sup>®</sup> покрывали растворимым PD-1 человека или PD-1 яванских макак (внеклеточный домен PD-1 человека, гибридный с полигистидиновой меткой (shPD-1 His) или областью Fc человека (shPD-1 hFc), или внеклеточный домен PD-1 яванских макак, гибридный с областью Fc человека (scyno-PD1 Fc)), каждый в концентрации 0,5 или 1 мкг/мл, планшеты промывали и инкубировали с одним из выделенных антител к PD-1, МАТ к PD-1 1-15. Для проведения данных исследований антитела к PD-1 использовали в концентрации 3, 1,0, 0,3333, 0,1111, 0,0370, 0,0123 или 0,0041 мкг/мл (трехкратные последовательные разведения). Количество антитела, связывающегося с иммобилизованным PD-1 (человека или яванских макак), оценивали с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена (ПХ) вторичного антитела козы к IgG мыши. Все образцы исследовали на считывателе для планшетов (Victor 2 Wallac, Perkin Elmers). Типичные кривые связывания для растворимого PD-1 человека и растворимого PD-1 яванских макак представлены на Фигуре 7А-7D и Фигуре 8А-8С, соответственно.

[00429] Результаты проведенных исследований связывания (Фигуры 7А-7D и Фигуры 8А-8С) свидетельствуют о том, что все антитела к PD-1, МАТ к PD-1 1-15, связываются как с растворимым PD-1 человека, так и с растворимым PD-1 яванских макаков.

[00430] Чтобы дополнительно охарактеризовать мышиные антитела к PD-1, их способность блокировать связывание растворимого PD-L1 человека с растворимым PD-1 человека оценивали в двух разных количественных исследованиях. В одном количественном исследовании оценивали способность антител блокировать связывание PD-1 человека с PD-L1, иммобилизованным на поверхности. Для проведения данного количественного исследования каждое из антител к PD-1, МАТ к PD-1 1-15, или контрольное антитело к PD-1 (МАТ к PD-1 А) смешивали с гибридным белком shPD-1 His (в концентрации 2,5 мкг/мл) и отдельно инкубировали с меченым биотином растворимым PD-L1 человека (внеклеточный домен PD-L1, гибридный с Fc человека (sPD-L1)), в концентрации 1 мкг/мл, иммобилизованным на планшете, покрытом стрептавидином. Для проведения данных исследований антитела к PD-1 использовали в концентрации 10, 5, 0, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 или 0,1563 мкг/мл (двукратные последовательные разведения). Количество shPD-1 His, связанного с иммобилизованным sPD-L1, оценивали с помощью His-метки с использованием вторичного антитела к His-метке, конъюгированного с ПХ. Все образцы исследовали на считывателе для планшетов (Victor 2 Wallac, Perkin Elmers). Результаты данного эксперимента представлены на Фигуре 9А-9D.

[00431] Результаты проведенных количественных исследований ингибирования (Фигуры 9А-9D) свидетельствуют о том, что антитела к PD-1, МАТ к PD-1 1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 8 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1, были способны блокировать связывание растворимого PD-L1 человека с растворимым PD-1 человека в разной степени, в то время как МАТ 2 к PD-1 и МАТ 4 к PD-1 проявили незначительную или отсутствующую блокирующую активность в данном формате количественных исследований.

[00432] Во втором количественном исследовании оценивали способность мышиных антител к PD-1, МАТ к PD-1 1-15, блокировать связывание лиганда PD-1 (т.е. PD-L1 человека или PD-L2 человека) с PD-1, экспрессированным на поверхности клеток линии NSO. Для проведения данного количественного исследования каждое из антител к PD-1, МАТ к PD-1 1-15, или контрольное антитело к PD-1 (МАТ к PD-1 А или МАТ к PD-1 В) отдельно смешивали с биотинилированным растворимым PD-L1 человека (гибридный белок shPD-L1) или биотинилированным растворимым гибридным белком PD-L2-muIgFc

человека (shPD-L2; Ancell, каталожный номер 573-030), каждый в концентрации 0,1 мкг/исследование, и инкубировали с клетками линии NSO, экспрессирующими PD-1 человека (~250000 клеток/лунку) в блокирующем буфере (FACS + 10% сывороточного альбумина человека). Для проведения данных исследований антитела к PD-1 использовали в концентрации 4,0, 1,0,  $2,5 \times 10^{-1}$ ,  $6,25 \times 10^{-2}$ ,  $1,56 \times 10^{-2}$ ,  $3,90 \times 10^{-3}$ ,  $9,76 \times 10^{-4}$ ,  $2,4 \times 10^{-4}$ ,  $0,6 \times 10^{-4}$  мкг/исследование (четырёхкратные последовательные разведения). Количество shPD-L1 (или shPD-L2), связанного с поверхностью клеток линии NSO, определяли с использованием конъюгированного с фикоэритрином вторичного антитела, связанного со стрептавидином, с помощью FACS. Определяли значения ИК<sub>50</sub> для ингибирования связывания PD-1/PD-L1, и среднее значение выборки ( $\bar{x}$ ) по меньшей мере двух экспериментов (за исключением тех случаев, когда это указано) представлено в таблице 6.

<b>Таблица 6</b>			
<b>Антитело к PD-1</b>	<b>ИК<sub>50</sub></b> <b>(мкг/исследование)</b>	<b>Антитело к PD-1</b>	<b>ИК<sub>50</sub></b> <b>(мкг/исследование)</b>
МАТ к PD-1 А	0,0044	МАТ 8 к PD-1	0,6611‡
МАТ к PD-1 В	0,0064	МАТ 9 к PD-1	0,0154
МАТ к PD-1 1	0,0048	МАТ 10 к PD-1	0,0057
МАТ 2 к PD-1	0,0110	МАТ 11 к PD-1	0,0259‡
МАТ 3 к PD-1	0,0361‡	МАТ 12 к PD-1	0,0238‡
МАТ 4 к PD-1	0,0156‡	МАТ 13 к PD-1	0,0117
МАТ 5 к PD-1	0,0039	МАТ 14 к PD-1	0,0149‡
МАТ 6 к PD-1	0,0051	МАТ 15 к PD-1	0,0060
МАТ 7 к PD-1	0,0024		

‡Результаты одного эксперимента.

[00433] Результаты количественных исследований ингибирования shPD-L1 (таблица 6) свидетельствуют о том, что антитела к PD-1, МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 11 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1, МАТ 14 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1, были способны блокировать связывание PD-L1 человека с PD-1 человека, экспрессируемым на поверхности клеток линии NSO. В частности, МАТ к PD-1 1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 10 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1 блокировали связывание shPD-L1 аналогично или более эффективно, чем эталонные антитела к PD-1 (МАТ к PD-1 А, МАТ к PD-1 В), тогда как МАТ 8 к PD-1 по существу не оказывало блокирующего действия в данном формате количественных исследований. Оба МАТ 2 к

PD-1 и МАТ 4 к PD-1 были способны блокировать связывание PD-1/PD-L1 в данном формате количественных исследований.

[00434] Аналогичным образом, антитела к PD-1, МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 3 к PD-1, МАТ 4 к PD-1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 10 к PD-1, МАТ 12 к PD-1, МАТ 13 к PD-1 и МАТ 14 к PD-1, были способны блокировать связывание PD-L2 человека с PD-1 человека, экспрессируемым на поверхности клеток линии NSO, тогда как МАТ 8 к PD-1 по существу не оказывало блокирующего действия в данном формате количественных исследований. В частности, МАТ к PD-1 1, МАТ 5 к PD-1, МАТ 6 к PD-1, МАТ 7 к PD-1 и МАТ 10 к PD-1 блокировали связывание shPD-L2 аналогично или более эффективно, чем эталонные антитела к PD-1 (МАТ к PD-1 А, МАТ к PD-1 В). Антитела к PD-1, МАТ 11 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1, не испытывали в данном количественном исследовании. Ниже приведены результаты для нескольких гуманизированных антител к PD-1, включая МАТ к чPD-1 15.

### **Пример 2**

#### **Гуманизация и дальнейшая характеристика**

[00435] Вариабельные домены антител к PD-1, МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1, гуманизировали, в тех случаях, когда были идентифицированы антигенные эпитопы, антитела дополнительно деиммунизировали для получения готовых гуманизированных вариабельных доменов. Гуманизация МАТ к PD-1 1, МАТ 2 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1 позволила получить один гуманизированный домен VH и один гуманизированный домен VL для каждого антитела, обозначенные в настоящем документе как «VH1 МАТ к чPD-1 1» и «VL1 МАТ к чPD-1 1»; «VH1 МАТ к чPD-1 2» и «VL1 МАТ к чPD-1 2»; и «VH1 МАТ к чPD-1 15» и «VL1 МАТ к чPD-1 15». Гуманизация МАТ 7 к PD-1 позволила получить два гуманизированных домена VH, обозначенных в настоящем документе как «VH1 МАТ к чPD-1 7» и «VH2 МАТ к чPD-1 7», и три гуманизированных домена VL, обозначенных в настоящем документе как «VL1 МАТ к чPD-1 1», «VL2 МАТ к чPD-1 7» и «VL3 МАТ к чPD-1 7». Гуманизация МАТ 9 к PD-1 позволила получить два гуманизированных домена VH, обозначенных в настоящем документе как «VH1 МАТ к чPD-1 9» и «VH2 МАТ к чPD-1 9» и два гуманизированных домена VL, обозначенных в настоящем документе как «VL1 МАТ к чPD-1 9» и «VL2 МАТ к чPD-1 1». В тех случаях, когда было получено несколько гуманизированных вариабельных доменов, гуманизированные вариабельные домены тяжелой и легкой цепей конкретного антитела к PD-1 (например, МАТ 7 к PD-1) можно применять в любой комбинации, и конкретные комбинации гуманизированных цепей упоминаются со ссылкой на определенные домены VH/VL, например, гуманизированное

антитело, содержащее VH1 МАТ к чPD-1 7 и VL2 МАТ к чPD-1 7, в частности называется «МАТ к чPD-1 7 (1.2)». Гуманизированные полноразмерные антитела получали с помощью константной области IgG1 человека, содержащей замены L234A/L235A (IgG1 (AA)), или константной области IgG4 человека, содержащей замену S228P (IgG4 (P)).

[00436] Полноразмерные тяжелые цепи гуманизированного антитела IgG1 конструировали следующим образом: С-конец гуманизированного домена VH гибридизовали с N-концом константной области IgG1 человека, содержащей вариант домена CH2-CH3 (содержащий замены L234A/L235A (AA)) и лишенной С-концевого остатка лизина (SEQ ID NO: 255):

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDRVEP
KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
```

[00437] В SEQ ID NO: 255 остатки аминокислот 1-98 соответствуют домену CH1 IgG1 (SEQ ID NO: 10), остатки аминокислот 99-113 соответствуют шарнирной области IgG1 (SEQ ID NO: 32) и остатки аминокислот 114-329 соответствуют домену CH2-CH3 IgG1, содержащему замены L234A/L235A (выделены подчеркиванием) (SEQ ID NO: 5), но лишенному С-концевого остатка лизина.

[00438] Аминокислотная последовательность тяжелой цепи примерного гуманизированного антитела ((МАТ к чPD-1 7 (1.2)), содержащего константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую мутацию L234A/L235A и лишенную С-концевого остатка лизина, представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 265):

```
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPQAVLQSSG LYSLSVTVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLMISRTPV ETCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG
```



[00439] В SEQ ID NO: 265 остатки аминокислот 1-119 соответствуют домену VH из VH1 МАТ к чPD-1 7 (SEQ ID NO: 147), остатки аминокислот 120-217 соответствуют домену CH1 IgG1 (SEQ ID NO: 10), остатки аминокислот 218-232 соответствуют шарнирной области IgG1 (SEQ ID NO: 32) и остатки аминокислот 233-448 соответствуют домену CH2-CH3 IgG1, содержащему замены L234A/L235A (выделены подчеркиванием) (SEQ ID NO: 5) и лишенному С-концевого остатка лизина.

[00440] Полноразмерные тяжелые цепи гуманизированного антитела IgG4 конструировали следующим образом: С-конец гуманизированного домена VH гибридизовали с N-концом константной области IgG4 человека, содержащей стабилизированную шарнирную область (содержащую замену S228P) и лишенную С-концевого остатка лизина (SEQ ID NO: 256):

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG
```

[00441] В SEQ ID NO: 256 остатки аминокислот 1-98 соответствуют домену CH1 IgG4 (SEQ ID NO: 254), остатки аминокислот 99-110 соответствуют стабилизированной шарнирной области IgG4, содержащей замены S228P (выделены подчеркиванием) (SEQ ID NO: 13) и остатки аминокислот 111-326 соответствуют домену CH2-CH3 IgG4 (SEQ ID NO: 4), лишенному С-концевого остатка лизина.

[00442] Аминокислотная последовательность тяжелой цепи примерного гуманизированного антитела ((МАТ к чPD-1 7 (1.2)), содержащего константную область тяжелой цепи IgG4, содержащую стабилизированную шарнирную область с мутацией S228P и лишенную С-концевого остатка лизина, представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 266):

```
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPQAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGKTKY
TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPPCPA PEFLGGPSVF LFPKPKDTL
MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKGLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL
```

PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS  
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSLG

[00443] В SEQ ID NO: 266 остатки аминокислот 1-119 соответствуют домену VH из VH1 MAT к чPD-1 7 (SEQ ID NO: 147), остатки аминокислот 120-217 соответствуют домену CH1 IgG4 (SEQ ID NO: 254), остатки аминокислот 218-229 соответствуют стабилизированной шарнирной области IgG4, содержащей замену S228P (выделена подчеркиванием) (SEQ ID NO: 13), и остатки аминокислот 230-445 соответствуют домену CH2-CH3 IgG4 (SEQ ID NO: 4), лишенному С-концевого остатка лизина.

[00444] Полноразмерные гуманизированные легкие цепи конструировали следующим образом: С-конец гуманизированного домена VL гибридизовали с N-концом легкой каппа-цепи человека (SEQ ID NO: 8). Аналогичную легкую цепь спаривали с тяжелыми цепями IgG1 (AA) и IgG4 (P).

[00445] Аминокислотная последовательность легкой цепи примерного гуманизированного антитела к PD-1 (MAT к чPD-1 7 (1.2)), содержащего константную область каппа-цепи, представляет собой последовательность, приведенную ниже (SEQ ID NO: 264):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV  
THQGLSSPVT KSFNRGEC

[00446] В SEQ ID NO: 264 остатки аминокислот 1-111 соответствуют домену VL VL2 MAT к чPD-1 7 (SEQ ID NO: 151), и остатки аминокислот 112-218 соответствуют константной области легкой каппа-цепи (SEQ ID NO: 8).

[00447] Антитела к PD-1, содержащие альтернативные константные области, например, модифицированные области Fc, могут быть легко получены путем включения различных константных областей и/или путем введения одной или более аминокислотных замен, добавлений или делеций. Например, если желательным является использование биспецифического антитела, то для облегчения гетеродимеризации используют несущие выступ и впадину домены CH2-CH3. Химерные антитела к PD-1, содержащие мышинные переменные домены и константные области человека, получали, как описано выше.

[00448] Гуманизированные антитела (IgG1 (AA) и/или IgG4 (P)) испытывали для оценки активности связывания и блокирования, как описано выше. Связывание с PD-1 человека (shPD-1 His и shPD-1 hFc) и PD-1 яванских макаков (shPD-L1 hFc) гуманизированных антител было сопоставимо со связыванием соответствующего

мышинного антитела. Помимо этого гуманизированные антитела сохраняли способность блокировать связывание PD-L1 человека с PD-1 человека в исследовании методом ИФА.

[00449] Кинетику связывания мышинных антител МАТ 2 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1, МАТ 15 к PD-1, гуманизированных антител МАТ к чPD-1 2, МАТ к чPD-1 7 (1.2), МАТ к чPD-1 9 (1.1), МАТ к чPD-1 15 и контрольных антител к PD-1, МАТ к PD-1 А и МАТ к PD-1 В, исследовали с использованием анализа Вiasore. Антитела к PD-1 захватывали на иммобилизованном белке А и инкубировали с His-меченым растворимым PD-1 человека (shPD-1-His) или растворимым гибридным белком PD-1 Fc человека-яванских макак (scyno PD-1 hFc), расщепленным для удаления участка Fc, и кинетику связывания определяли с помощью анализа Вiasore. В дополнительных исследованиях антитела к PD-1, МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG1 (AA), МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P), МАТ к чPD-1 9 (1.1) IgG1 (AA), МАТ к чPD-1 9 (1.1) IgG4 (P), МАТ к PD-1 А IgG1 (AA), МАТ к PD-1 А IgG4 (P), МАТ к PD-1 В IgG1 (AA) и МАТ к PD-1 В IgG4 (P), захватывали на иммобилизованном козьем F(ab)<sub>2</sub> к Fc человека, и кинетику связывания определяли с помощью анализа Вiasore, как описано выше. Рассчитанные значения k<sub>a</sub>, k<sub>d</sub> и KD из данных исследований представлены в таблице 7.

Таблица 7						
Захват белком А						
Антитело к PD-1	Человек <sup>a</sup>			Яванская макака <sup>b</sup>		
	k <sub>a</sub> (×10 <sup>4</sup> )	k <sub>d</sub> (×10 <sup>-4</sup> )	KD (нМ)	k <sub>a</sub> (×10 <sup>4</sup> )	k <sub>d</sub> (×10 <sup>-4</sup> )	KD (нМ)
МАТ к PD-1 А	60	18	3	14	9,6	6,9
МАТ к PD-1 В	140	35	2,5	37	12	3,2
МАТ 7 к PD-1	21	2,8	1,3	17	6	3,5
МАТ к чPD-1 7(1.2)	110	4,3	0,39	37	6,4	1,7
МАТ 9 к PD-1	4,3	4,2	9,8	2,2	16	72,7
МАТ к чPD-1 9(1.1)	1,8	6,5	36,1	1,5	11	73,3
МАТ 15 к PD-1	4,5	1,3	2,9	2,7	11	40,7
МАТ к чPD-1 15	2,4	3,2	13,3	2,3	18	78,3
МАТ 2 к PD-1	5,5	5,6	10,2	4,2	6,0	14,3
МАТ к чPD-1 2	3,2	1,6	5,0	2,3	3,9	17

Захват козьим фрагментом F(ab) <sub>2</sub> к Fc человека							
МАТ к PD-1 А IgG1 (AA)	13	8,4	6,5		8,1	4,5	5,6
МАТ к PD-1 А IgG4 (P)	13	7,9	6,1		8,4	5,0	6,0
МАТ к PD-1 В IgG1 (AA)	25	28	11,2		20	6,4	3,2
МАТ к PD-1 В IgG4 (P)	26	25	9,6		20	7,9	4,0
МАТ к чPD- 1 7(1.2) IgG1 (AA)	25	3,8	1,5		16	7,8	4,9
МАТ к чPD- 1 7(1.2) IgG4 (P)	27	4,1	1,5		17	7,8	4,6
МАТ к чPD- 1 9(1.1) IgG1 (AA)	5,6	6,1	10,9		5,6	5,2	9,3
МАТ к чPD- 1 9(1.1) IgG4 (P)	6,1	5,8	9,5		4,9	7,4	15,1

<sup>a</sup>Меченый полигистидиновой меткой растворимый PD-1 человека (shPD-1 His).

<sup>b</sup>Расщепленный растворимый PD-1 яванских макак (scyno PD-1 hFc).

[00450] Результаты свидетельствуют о том, что МАТ 7 к PD-1 и гуманизированное МАТ к чPD-1 7 (1.2) демонстрируют лучшую кинетику связывания по сравнению с эталонными антителами к PD-1, МАТ к PD-1 А и МАТ к PD-1 В. Показатели кинетики связывания МАТ 2 к PD-1 и МАТ к чPD-1 2 приблизительно в два раза превышают аналогичные показатели для эталонных антител к PD-1, в то время как показатели кинетики связывания МАТ 9 к PD-1, МАТ к чPD-1 9 (1.1), МАТ 15 к PD-1 и МАТ к чPD-1 15 приблизительно в 2-6 раза превышают аналогичные показатели для эталонных антител к PD-1.

[00451] Была изучена тканевая специфичность антитела к PD-1 человека, МАТ к чPD-1 7. Нормальную ткань подвергали воздействию МАТ 7 к PD-1 или антитела для контроля изотипа (0,313 мкг/мл), и визуализировали степень окрашивания. Bloxall™ использовали для блокирования эндогенных ферментов, чтобы уменьшить неспецифичное окрашивание муцина в ткани толстой кишки. Как показано на Фигуре 10А, панели i-xii, МАТ 7 к PD-1 и антитело для контроля изотипа не были способны помечать клетки

нормальной толстой кишки, печени, легких, поджелудочной железы, почек и ткани сердца. Помимо этого МАТ 7 к PD-1 и антитело для контроля изотипа не были способны окрашивать нормальную кожу (Фигура 10В, панели i-ii). Напротив, было обнаружено, что МАТ 7 к PD-1 интенсивно окрашивает лимфоциты, присутствующие в нормальной ткани миндалин, и трансфецированные PDCD1 клетки линии NSO, экспрессирующие PD-1 (Фигура 10В, панели iii и v), в то время как антитело для контроля изотипа не было способно окрашивать клетки обоих указанных типов (Фигура 10В, панели iv и vi). Соответственно, результаты, представленные на Фигурах 10А-10В, указывают на то, что МАТ 7 к PD-1 способно специфично связываться с лимфоцитами и клетками, экспрессирующими PD-1.

[00452] Исследовали профили насыщения связывания МАТ к чPD-1 2 IgG1 (AA), МАТ к чPD-1 7(1.1) IgG1 (AA), МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG1, (AA), МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P), МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG1 (AA), МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG4 (P), МАТ к чPD-1 15 IgG1 (AA) и эталонных антител к PD-1 МАТ к PD-1 А и МАТ к PD-1 В. В общих чертах, каждое из антител к PD-1, МАТ к PD-1 1-15 или эталонных антител к PD-1 (МАТ к PD-1 А и МАТ к PD-1 В) смешивали с клетками линии NSO, экспрессирующими PD-1 человека (~250000 клеток/лунку) в блокирующем буфере (FACS + 10% сывороточного альбумина человека). Для проведения данных исследований антитела к PD-1 использовали в концентрации 50, 12,5, 3,13,  $2,0 \times 10^{-1}$ ,  $4,9 \times 10^{-2}$ ,  $1,2 \times 10^{-2}$ ,  $3,0 \times 10^{-3}$ ,  $1,9 \times 10^{-4}$ ,  $7,6 \times 10^{-4}$ ,  $4,75 \times 10^{-5}$  или  $1,19 \times 10^{-5}$  мкг/исследование (четырёхкратные последовательные разведения). Количество антитела, связанного с поверхностью клеток линии NSO, определяли с использованием конъюгированного с APC вторичного козьего антитела к Ig человека методом FACS. Типичные кривые насыщения представлены на Фигуре 11. Определяли значения ЭК<sub>50</sub> и ЭК<sub>90</sub>, и среднее значение выборки (SM) и стандартное отклонение (SD,  $\sigma$ ) четырех отдельных экспериментов приведены в таблице 8.

<b>Таблица 8</b>				
	<b>Насыщение связывания</b>			
	<b>ЭК<sub>50</sub> (мкг/исследование)</b>		<b>ЭК<sub>90</sub> (мкг/ исследование)</b>	
	<b>SM</b>	<b>SD <math>\sigma</math></b>	<b>SM</b>	<b>SD <math>\sigma</math></b>
Антитело к PD-1				
МАТ к PD-1 А IgG1 (AA)	0,1991	0,1309	1,4528	0,8040
МАТ к PD-1 А IgG4 (P)	0,1581	0,1161	1,5464	1,7690
МАТ к PD-1 В IgG1 (AA)	0,1347	0,0681	1,3917	0,9573
МАТ к PD-1 В IgG4 (P)	0,1398	0,0951	1,1619	1,2681

МАТ к чPD-1 2 IgG1 (AA)	0,4431	0,1997	2,4374	1,2637
МАТ к чPD-1 7(1.1) IgG1 (AA)	0,1069	0,0500	0,9102	0,5476
МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG1 (AA)	0,1872	0,1553	0,6810	0,3226
МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P)	0,1376	0,0926	0,6609	0,3437
МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG1 (AA)	0,3123	0,2291	1,6486	0,9117
МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG4 (P)	0,5128	0,2228	3,0563	0,9437
МАТ к чPD-1 15 IgG1 (AA)	0,2927	0,1333	2,0640	0,6096

[00453] Исследования насыщения связывания демонстрируют, что гуманизированные варианты МАТ 2 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1 имеют благоприятный профиль для связывания с поверхностным PD-1. В частности, гуманизированные МАТ 7 к PD-1 (МАТ к чPD-1 7 (1.1) и МАТ к чPD-1 7 (1.2), содержащие область Fc IgG1 (AA) или IgG4 (P), имеют самые низкие значения ЭК<sub>90</sub> из всех исследованных антител.

[00454] Чтобы дополнительно охарактеризовать гуманизированные антитела к PD-1, МАТ к чPD-1 2 IgG1 (AA), МАТ к чPD-1 7(1.1) IgG1 (AA), МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG1, (AA), МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P), МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG1 (AA), МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG4 (P) и МАТ к чPD-1 15 IgG1 (AA), исследовали их способность блокировать связывание PD-L1 человека (shPD-L1) и PD-L2 человека (shPD-L2) с PD-1, экспрессируемым на поверхности клеток линии NSO. Указанные количественные исследования выполняли, как описано выше. Типичные кривые ингибирования связывания sPD-L1 и sPD-L2 с PD-1, экспрессированным в клетках линии NSO, представлены на Фигурах 12А и 12В, соответственно. Определяли значения ИК<sub>50</sub> и ИК<sub>90</sub>, и среднее значение выборки (SM) и стандартное отклонение (SD,  $\sigma$ ) трех отдельных экспериментов приведены в таблице 9.

	sPD-L1				sPD-L2			
	ИК <sub>50</sub>		ИК <sub>90</sub>		ИК <sub>50</sub>		ИК <sub>90</sub>	
	(мкг/исследование)	(мкг/исследование)	(мкг/исследование)	(мкг/исследование)	(мкг/исследование)	(мкг/исследование)	(мкг/исследование)	
Антитело к PD-1	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$
МАТ к PD-1 А IgG1 (AA)	0,0203	0,0089	0,2985	0,3279	0,0414	0,0124	0,1601	0,066
МАТ к PD-1 А	0,0156	0,0096	0,0776	0,0208	0,0280	0,0070	0,1594	0,1153

IgG4 (P)								
MAT к PD-1 B IgG1 (AA)	0,0148	0,0008	0,1034	0,0100	0,0280	0,0059	0,1190	0,060
MAT к PD-1 B IgG4 (P)	0,0143	0,0013	0,0798	0,0239	0,0280	0,0055	0,0924	0,0065
MAT к чPD-1 2 IgG1 (AA)	0,0578	0,0124	0,2480	0,050	0,1294	0,0143	0,3813	0,0656
MAT к чPD- 1 7(1.1) IgG1 (AA)	0,0166	0,0032	0,0674	0,0041	0,0283	0,0147	0,0886	0,0166
MAT к чPD- 1 7(1.2) IgG1 (AA)	0,0118	0,0027	0,0678	0,0031	0,0212	0,0031	0,0672	0,0043
MAT к чPD- 1 7(1.2) IgG4 (P)	0,0103	0,0023	0,0520	0,0033	0,0213	0,0019	0,0616	0,0063
MAT к чPD- 1 9(1.1) IgG1 (AA)	0,0593	0,0036	0,3238	0,0508	0,4002	0,5000	0,4573	0,1805
MAT к чPD- 1 9(1.1) IgG4 (P)	0,0460	0,0118	0,2461	0,0513	0,1105	0,0146	0,2914	0,0526
MAT к чPD- 1 15 IgG1 (AA)	0,0440	0,0092	0,2068	0,035	0,0945	0,0022	0,3093	0,0588

[00455] Исследования ингибирования связывания лигандов демонстрируют, что гуманизированные варианты MAT 2 к PD-1, MAT 7 к PD-1, MAT 9 к PD-1 и MAT 15 к PD-1 способны ингибировать связывание sPD-L1 и sPD-L2 с PD-1 на поверхности клетки. В частности, гуманизированные MAT 7 к PD-1 (MAT к чPD-1 7 (1.1) и MAT к чPD-1 7 (1.2)) имеют самые низкие значения ИК<sub>90</sub> из всех исследованных антител.

### Пример 3

#### Блокирование контрольной точки PD-1/PD-L1 гуманизированными антителами к PD-1 человека

[00456] Способность MAT к чPD-1 2 IgG1 (AA), MAT к чPD-1 7(1.1) IgG1 (AA), MAT к чPD-1 7(1.2) IgG1, (AA), MAT к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P), MAT к чPD-1 9(1.1) IgG1 (AA), MAT к чPD-1 9(1.1) IgG4 (P), MAT к чPD-1 15 IgG1 (AA) и эталонных антител к PD-1, MAT к PD-1 A и MAT к PD-1 B, выступать антагонистами оси PD-1/PD-L1 (т.е. блокировать взаимодействие PD-1/PD-L1 и предотвращать подавление ответов Т-клеток), исследовали в количественном исследовании с использованием репортера люциферазы

Jurkat-luc-NFAT/CHO-PD-L1. В общих чертах, клетки линии CHO, экспрессирующие PD-L1 (CHO/PD-L1), высевали в плотности 40000/лунку в 100 мкл культуральной среды (RPMI + 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) + 100 мкг/мл гигромицина В + 100 мкг/мл G418) и инкубировали в течение ночи. На следующий день среды удаляли, и в каждую лунку вносили клетки Jurkat MNFAT-luc2/PD-1 (Promega) в плотности 50000 клеток/лунку в 40 мкл буфера для анализа (RPMI + 2% ФБС) и антитела к PD-1, МАТ к PD-1 1-15, или эталонные антитела к PD-1 (МАТ к PD-1 А и МАТ к PD-1 В) (0-25 мкг/мл, восемь последовательных разведений в 2,5 раза в буфере для анализа), инкубировали в течение 6 часов при 37 °С с дополнительной инкубацией в течение 5-10 мин при температуре окружающей среды. Затем в каждую лунку добавляли по 80 мкл субстрата BioGlo (Promega), и планшет инкубировали еще в течение 5-10 минут при температуре окружающей среды, интенсивность люминесценции измеряли в считывателе для планшетов Victor. Типичные кривые насыщения представлены на Фигуре 13. Определяли значения ЭК<sub>50</sub> и ЭК<sub>90</sub>, и среднее значение выборки (SM) и стандартное отклонение (SD, σ) четырех отдельных экспериментов приведены в таблице 10.

<b>Таблица 10</b>				
<b>Антитело к PD-1</b>	<b>Сигнал репортера</b>			
	<b>ЭК<sub>50</sub> (мкг/исследование)</b>		<b>ЭК<sub>90</sub> (мкг/исследование)</b>	
	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>
МАТ к PD-1 А IgG1 (AA)	0,2549	0,0480	2,4474	1,2228
МАТ к PD-1 А IgG4 (P)	0,2049	0,0719	2,5535	1,2139
МАТ к PD-1 В IgG1 (AA)	0,2119	0,1781	2,2036	2,0118
МАТ к PD-1 В IgG4 (P)	0,1142	0,0323	0,9418	0,2863
МАТ к чPD-1 2 IgG1 (AA)	0,3539	0,0983	3,8975	2,0054
МАТ к чPD-1 7(1.1) IgG1 (AA)	0,1080	0,0386	1,1992	0,5103
МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG1 (AA)	0,0944	0,0153	0,6452	0,2615
МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P)	0,0965	0,0169	0,6885	0,01858
МАТ к чPD-1 9 IgG1 (AA)	0,2835	0,0530	2,9968	0,8866
МАТ к чPD-1 9 IgG4 (P)	0,3154	0,0872	5,0940	4,0496
МАТ к чPD-1 15 IgG1 (AA)	0,2585	0,0592	3,3138	1,0532

[00457] Исследования интенсивности сигналов репортера демонстрируют, что гуманизированные варианты МАТ 2 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1 и МАТ 15 к PD-



1 могут блокировать ось PD-1/PD-L1 и будут предотвращать подавление ответов Т-клеток. В частности, гуманизованное МАТ 7 к PD-1 (МАТ к чPD-1 7 (1.1) и МАТ к чPD-1 7 (1.2), содержащее область Fc IgG1 (AA) или IgG4 (P), имеет самые низкие значения ЭК<sub>50</sub>/ЭК<sub>90</sub>.

#### Пример 4

##### Функциональная активность антител к PD-1 человека

[00458] Энтеротоксин типа В *Staphylococcus aureus* (SEB) представляет собой микробный суперантиген, способный активировать значительную долю Т-клеток (5-30%) у SEB-чувствительных доноров. SEB связывается с ГКГС II вне борозды связывания пептидов и, следовательно, зависит от ГКГС II, но неограничен и опосредован TCR. SEB-стимуляция Т-клеток приводит к пролиферации олигоклональных Т-клеток и выработке цитокинов (хотя может наблюдаться изменчивость ответов доноров, и некоторые доноры не будут отвечать на SEB). В течение 48 часов SEB-стимуляции МКПК активируют PD-1 и LAG-3 с последующим усилением, которое наблюдается на 5-й день после высадки вторичной культуры в 96-луночный планшет с SEB-стимуляцией. Активация белков контрольной точки иммунного ответа PD-1 и LAG-3 после SEB-стимуляции МКПК ограничивает выделение цитокинов при повторной стимуляции. Была исследована способность антител к PD-1 по отдельности и в комбинации с антителами к LAG-3 усиливать высвобождение цитокинов посредством ингибирования контрольной точки.

[00459] В общих чертах, МКПК очищали из цельной крови, полученной от здоровых доноров, подписавших форму информированного согласия (Biological Specialty Corporation), с использованием способа центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) в соответствии с инструкциями изготовителя, и Т-клетки затем очищали, используя набор для выделения Т-клеток человека Dynabeads® Untouched™ (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенные МКПК культивировали в средах RPMI + 10% инактивированной нагреванием ФБС + 1% пенициллина/стрептомицина в объемных колбах Т-25 в течение 2-3 дней по отдельности или с SEB (Sigma-Aldrich) в концентрации 0,1 нг/мл (первичная стимуляция). В конце первого раунда SEB-стимуляции МКПК дважды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и сразу же высевали в 96-луночные планшеты для культивирования ткани в концентрации  $1-5 \times 10^5$  клеток/лунку только в среды, среды с контрольным антителом или антителом к PD-1, среды с SEB в концентрации 0,1 нг/мл (вторичная стимуляция) и без антител или среды с SEB и контрольным IgG или антителом к PD-1, с добавлением или без антитела к LAG-3, и культивировали в течение еще 2-3 дней. В конце второй стимуляции супернатанты собирали для измерения секреции цитокинов с использованием

наборов для ИФА DuoSet для измерения ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-10 и ИЛ-4 человека (R&D Systems) в соответствии с инструкциями производителя.

[00460] Исследовали способность МАТ 2 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1, по отдельности или в комбинации с уникальным МАТ к LAG-3 1, усиливать высвобождение цитокинов посредством ингибирования контрольной точки. Данные исследования также включали использование одного или более из следующих эталонных антител к PD-1: МАТ к PD-1 А; МАТ к PD-1 В; и МАТ к LAG-3 А, по отдельности или в комбинации. На Фигуре 14 представлены профили секреции ИФН- $\gamma$  из SEB-стимулированных (0,1 нг/мл) МКПК от типичного донора, имеющего надлежащий ответ (D: 38941), обработанных: контролем без антитела; антителом для контроля изотипа; МАТ 7 к PD-1 и/или МАТ к LAG-3 7; МАТ 9 к PD-1 и/или МАТ к LAG-3 1; МАТ 15 к PD-1 и/или МАТ к LAG-3 1; МАТ 2 к PD-1 и/или МАТ к LAG-3 1; или эталонными антителами к PD-1, МАТ к PD-1 В и/или МАТ к LAG-3 А (антитела использовали в концентрации 10 мкг/мл).

[00461] В дополнительных исследованиях оценивали способность гуманизированных вариантов МАТ 2 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1 (содержащих Fc IgG1 (AA) человека или IgG4 (P) человека), а также эталонных антител к PD-1, МАТ к PD-1 А и МАТ к PD-1 В, усиливать высвобождение цитокинов посредством ингибирования контрольной точки. Для проведения данных исследований антитела использовали в концентрации 0,625, 2,5 и 10 мкг/мл. На Фигурах 15А-15В представлены профили секреции ИФН- $\gamma$  (Фигура 15А) и ФНО- $\alpha$ ; (Фигура 15В) из SEB-стимулированных (0,2 нг/мл) МКПК от типичного донора, имеющего ответ (D: 57709), которые обрабатывали контролем без антитела или одним из следующих антител: антителом для контроля изотипа; МАТ к чPD-1 2 IgG1 (AA); МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG1 (AA); МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P); МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG1 (AA); МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG4 (P); МАТ к чPD-1 15 IgG1 (AA); или эталонными антителами к PD-1, МАТ к PD-1 А IgG1 (AA), МАТ к PD-1 А IgG4 (P), МАТ к PD-1 В IgG1 (AA), МАТ к PD-1 В IgG4 (P). Общее количество ИФН- $\gamma$  (пг/мг) в образцах, обработанных SEB + антитело, определяли для образцов, обработанных антителами к PD-1 в концентрации 0,625, 2,5 и 10 мкг/мл, и среднее значение выборки (SM) и стандартное отклонение (SD,  $\sigma$ ) для трех разных доноров, имеющих ответ (за исключением указанных случаев), приведены в таблице 11. Соотношение уровней ИФН- $\gamma$ , секретлируемого в образце, обработанном гуманизированными вариантами МАТ 2 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1 (содержащими Fc IgG1 (AA) человека или IgG4 (P) человека), по сравнению с уровнями, индуцированными контрольными антителами к PD-1, МАТ к PD-1 А и МАТ к

PD-1 В (т.е. гуманизированным МАТ к PD-1/МАТ к PD-1 А и гуманизированным МАТ к PD-1/МАТ к PD-1 В), представлено в таблице 12 и таблице 13, соответственно.

<b>Таблица 11</b>						
	<b>Секреция ИФН-γ (пг/мл)</b>					
<b>Антитело к PD1 (мкг/мл)</b>	<b>0,625 мкг/мл</b>		<b>2,5 мкг/мл</b>		<b>10 мкг/мл</b>	
<b>Антитело к PD1</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>
МАТ к PD-1 А IgG1 (АА)	221,18	110,89	341,13	247,93	347,46	144,72
МАТ к PD-1 А IgG4 (Р)	281,36	132,65	495,15	190,57	399,41	117,56
МАТ к PD-1 В IgG1 (АА)	366,69	196,64	387,682	215,51	387,32	282,81
МАТ к PD-1 В IgG4 (Р)	348,40	185,96	433,382	163,23	551,68	125,08
МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG1 (АА)	302,05	185,71	610,70	209,77	414,63	272,65
МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4 (Р)	384,57‡	323,79‡	411,40	398,59	370,06	108,12
МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG1 (АА)	340,81	207,76	442,598	303,70	655,29	567,91
МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG4 (Р)	309,82	130,30	468,62	350,15	424,35	288,95
МАТ к чPD-1 15 IgG1 (АА)	360,00	274,28	373,32	160,25	541,83	444,22
МАТ к чPD-1 2 IgG1 (АА)	275,88	135,23	372,73	53,53	496,70	235,37
Контрольный IgG	137,14	76,61	100,65	48,67	138,10	120,81
Антитело отсутствует	120,05	73,90	120,05	73,90	109,46	85,18

‡ Результаты, полученные у двух доноров, имевших ответ.

<b>Таблица 12</b>						
	<b>Соотношение уровней секреции ИФН-γ (новое МАТ к PD-1/МАТ к PD-1 А)</b>					
<b>Антитело к PD1 (мкг/мл)</b>	<b>0,625 мкг/мл</b>		<b>2,5 мкг/мл</b>		<b>10 мкг/мл</b>	
<b>Антитело к PD1</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>
МАТ к PD-1 А IgG1 (АА)	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
МАТ к PD-1 А IgG4 (Р)	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
МАТ к PD-1 В IgG1 (АА)	1,77	0,92	1,28	0,36	1,07	0,42
МАТ к PD-1 В IgG4 (Р)	1,23	0,16	0,92	0,27	1,40	0,12
МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG1	1,36	0,37	2,46	1,85	1,17	0,41

(AA)						
МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P)	1,20‡	0,35‡	0,79	0,54	0,95	0,22
МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG1 (AA)	1,48	0,19	1,46	0,71	1,70	0,84
МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG4 (P)	1,13	0,13	0,91	0,42	1,02	0,46
МАТ к чPD-1 15 IgG1 (AA)	1,50	0,39	1,51	1,23	1,48	0,71
МАТ к чPD-1 2 IgG1 (AA)	1,32	0,53	1,48	0,86	1,42	0,12
Контрольный IgG	0,63	0,2	0,33	0,08	0,39	0,24
Антитело отсутствует	0,54	0,12	0,39	0,14	0,31	0,17

‡ Результаты, полученные у двух доноров, имевших ответ.

<b>Таблица 13</b>						
	<b>Соотношение уровней секреции ИФН-γ (новое МАТ к PD-1/МАТ к PD-1 В)</b>					
<b>Антитело к PD1 (мкг/мл)</b>	<b>0,625 мкг/мл</b>		<b>2,5 мкг/мл</b>		<b>10 мкг/мл</b>	
<b>Антитело к PD1</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>
МАТ к PD-1 А IgG1 (AA)	0,37	0,37	0,82	0,20	1,06	0,48
МАТ к PD-1 А IgG4 (P)	0,82	0,12	1,16	0,38	0,72	0,07
МАТ к PD-1 В IgG1 (AA)	1,0	0,00	1,0	0,00	1,0	0,00
МАТ к PD-1 В IgG4 (P)	1,0	0,00	1,0	0,00	1,0	0,00
МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG1 (AA)	0,84	0,22	1,77	0,81	1,11	0,07
МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P)	0,91‡	0,26‡	0,83	0,50	0,68	0,17
МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG1 (AA)	1,04	0,59	1,12	0,29	1,60	0,42
МАТ к чPD-1 9(1.1) IgG4 (P)	0,92	0,09	0,99	0,36	0,75	0,39
МАТ к чPD-1 15 IgG1 (AA)	1,01	0,48	1,07	0,57	1,34	0,15
МАТ к чPD-1 2 IgG1 (AA)	0,78	0,12	1,10	0,38	1,46	0,53
Контрольный IgG	0,39	0,08	0,27	0,08	0,34	0,13
Антитело отсутствует	0,34	0,11	0,31	0,03	0,28	0,08

‡ Результаты, полученные у двух доноров, имевших ответ.

[00462] Результаты данных исследований демонстрируют, что антитела к PD-1, МАТ 2 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1 и МАТ 15 к PD-1, резко усиливали выработку ИФН- $\gamma$  (Фигуры 14 и 15А и таблицы 11-13) и ФНО- $\alpha$  (Фигура 15В) из SEB-стимулированных МКПК при повторной стимуляции. Помимо этого комбинация антител к PD-1 с антителами к LAG-3 приводила к дополнительному усилению высвобождения цитокинов (Фигура 14) из SEB-стимулированных МКПК при повторной стимуляции. В частности, комбинация МАТ 2 к PD-1, МАТ 7 к PD-1, МАТ 9 к PD-1 или МАТ 15 к PD-1 с уникальным антителом к LAG-3, МАТ к LAG-3 1, обеспечила наибольшее усиление.

### Пример 5

#### Исследования связывания биспецифических молекул PD-1 $\times$ LAG-3

[00463] Получали ряд биспецифических молекул PD-1 $\times$ LAG-3, включая диатела, содержащие области Fc, содержащие три, четыре и пять цепей и биспецифическое антитело. Получали четыре диатела, содержащих четыре цепи и содержащих домены, способствующие образованию гетеродимера, с E/K-спиралью, и обозначали «DART A», «DART B», «DART C» и «DART I». Получали четыре диатела, содержащих четыре цепи и содержащих домены CH1/CL, и обозначали «DART D», «DART E», «DART J» и «DART I». Получали два диатела, содержащих пять цепей и содержащих домены, способствующие образованию гетеродимера, с E/K-спиралью, и домены CH1/CL, и обозначали «DART F» и «DART G». Получали одно антитело, имеющее три цепи и содержащее E/K-спираль, и обозначали «DART H». Получали одно биспецифическое антитело, содержащее четыре цепи, и обозначали «BSAB A». Структура и аминокислотные последовательности указанных биспецифических молекул PD-1 $\times$ LAG-3 приведены выше и обобщены в таблице 14 ниже.

Таблица 14					
Название	Исходное МАТ	Fc*	Цепи	SEQ ID NO:	Другие компоненты
DART A	МАТ к чPD-1 7(1.2) МАТ к чLAG-3 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	267 (X <sub>1</sub> =A; X <sub>2</sub> =Y; X <sub>3</sub> =T; X <sub>4</sub> =E) и 268	E/K-спирали; см. Фигуру 3В
DART B	МАТ к чPD-1 7(1.2) МАТ к чLAG-3 1(1.3)	IgG4 (YTE)	4	267 (X <sub>1</sub> =G; X <sub>2</sub> =Y; X <sub>3</sub> =T; X <sub>4</sub> =E) и 268	E/K-спирали; см. Фигуру 3В

Таблица 14

Название	Исходное МАТ	Fc*	Цепи	SEQ ID NO:	Другие компоненты
DART C	МАТ к чPD-1 7(1.2) МАТ к чLAG-3 1(1.3)	IgG4	4	267 (X <sub>1</sub> =G; X <sub>2</sub> =M; X <sub>3</sub> =S; X <sub>4</sub> =T) и 268	Е/К-спирали; см. Фигуру 3В
DART D	МАТ к чPD-1 7(1.2) МАТ к чLAG-3 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	269 и 270	CL/CH1; см. Фигуру 3С
DART E	МАТ к чPD-1 7(1.2) МАТ к чLAG-3 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	271 и 272	CL/CH1; см. Фигуру 3С
DART F	МАТ к чPD-1 7(1.2) МАТ к чLAG-3 1(1.4)	IgG1 (AA/YTE)	5	273, 274, 275 и 276	CL/CH1 и Е/К-спирали; см. Фигуру 5
DART G	МАТ к чPD-1 7(1.2) МАТ к чLAG-3 1(1.4)	IgG1 (AA/YTE)	5	277, 278, 279 и 280	CL/CH1 и Е/К-спирали; см. Фигуру 5
DART H	МАТ к чPD-1 7(1.2) МАТ к чLAG-3 1(1.4)	IgG1 (AA)	3	281, 282 и 283	Е/К-спирали; см. Фигуру 4А
DART I	МАТ к чPD-1 7(1.2) МАТ к чLAG-3 6(1.1)	IgG4 (YTE)	4	290 и 291	Е/К-спирали; см. Фигуру 3В
DART J	МАТ к чPD-1 7(1.2) МАТ к чLAG-3 6(1.1)	IgG4 (YTE)	4	292 и 293	CL/CH1; см. Фигуру 3С
DART I	МАТ к PD-1 А МАТ к LAG-3 А	IgG1 (AA)	4	284 и 285	CL/CH1; см. Фигуру 3С
BSAB A	МАТ к чPD-1 7(1.2) МАТ к чLAG-3 1(1.4)	IgG1 (AA)	4	286, 287, 288 и 289	МАТ, содержащее область Fc с модифицированным зарядом

‡ Молекулы, содержащие области Fc IgG4, также содержат стабилизированную шарнирную область IgG4.

[00464] Дополнительные биспецифические молекулы PD-1×LAG-3, содержащие альтернативные сайты связывания эпитопов PD-1 и/или LAG-3, могут быть легко получены путем включения различных доменов VH и VL. Аналогичным образом, молекулы, связывающие антиген, отличный от LAG-3, могут быть получены путем включения VH и VL, имеющих желательную специфичность.

[00465] Профили насыщения связывания конструкций биспецифических диател PD-1×LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I и DART I; антител к PD-1: МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P), МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG1 (AA), МАТ к PD-1 A IgG1 (AA) и МАТ к PD-1 A IgG4 (P); и антител к LAG-3: МАТ к чLAG-3 1(1.4) IgG4 (P), МАТ к LAG-3 A IgG4 (P), МАТ к чLAG-3 1(1.4) IgG1 (AA) и МАТ к LAG-3 A IgG1 (AA), исследовали по существу, как описано выше. Конструкции биспецифических антител PD-1×LAG-3 исследовали для оценки связывания с PD-1 и LAG-3, тогда как антитела к PD-1 и антитела к LAG-3 исследовали только для оценки связывания с их соответствующими антигенами. Для проведения данных исследований использовали клетки линии NSO, экспрессирующие PD-1 или LAG-3. Использовали диатела и антитела (170,0-0,013 мкМ или 85,0-0,0021 мкМ (четырекратные последовательные разведения). Значения ЭК<sub>50</sub> и ЭК<sub>90</sub> определяли и представляли в таблицах 15-16. Представлено среднее значение выборки (SM) и стандартное отклонение (SD, σ) для тех случаев, когда проводили два или более отдельных экспериментов.

<b>Таблица 15</b>				
<b>Молекула</b>	<b>Насыщение связывания PD-1</b>			
	<b>ЭК<sub>50</sub> (мкМ)</b>		<b>ЭК<sub>90</sub> (мкМ)</b>	
	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>
DART A	1,9297	0,4324	9,6027	0,4801
DART B	1,7640 <sup>§</sup>		12,2700 <sup>§</sup>	
DART D	2,2267	0,4140	10,9313	2,6351
DART E	3,2180	0,5742	23,840	3,2385
DART F	1,4320 <sup>§</sup>		14,5800 <sup>§</sup>	
DART G	1,1488	0,6227	3,4220	2,4600
DART H	4,5310 <sup>§</sup>		22,6600 <sup>§</sup>	
DART I	1,3232	0,4890	7,8135	4,0821

DART 1	2,1329	1,4850	13,8113	9,0256
MAT к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P)	1,2083	0,8112	3,9340	1,8746
MAT к PD-1 A IgG4 (P)	2,3470	1,2362	22,7770	15,0690
MAT к чPD-1 7(1.2) IgG1 (AA)	1,0879	0,3958	7,4153	3,0794
MAT к PD-1 A IgG1 (AA)	1,6733	0,5464	9,9543	6,6569

§Результаты, полученные в одном эксперименте.

<b>Таблица 16</b>				
<b>Молекула</b>	<b>Насыщение связывания LAG-3</b>			
	<b>ЭК<sub>50</sub> (мкМ)</b>		<b>ЭК<sub>90</sub> (мкМ)</b>	
	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>	<b>SM</b>	<b>SD σ</b>
DART A	0,8402	0,2231	4,4448	2,4770
DART B	1,0750 <sup>§</sup>		9,8580 <sup>§</sup>	
DART D	0,8985	0,5326	5,7967	4,7329
DART E	0,9250	0,8075	5,6450	5,6809
DART F	5,0090	0,5770	19,3350	4,7447
DART G	0,9396	0,3045	8,5507	4,7448
DART H	2,3840 <sup>§</sup>		9,7810	4,2412
DART I	0,5321	0,0547	4,198	3,2188
DART 1	20,0233	2,1454	115,97	15,2425
MAT к чLAG-3 1(1.4) IgG4 (P)	1,0057	0,1969	5,1360	4,7904
MAT к LAG-3 A IgG4 (P)	0,5968	0,1376	2,0833	0,3244
MAT к чLAG-3 1(1.4) IgG1 (AA)	0,6069	0,3430	3,6373	2,4762
MAT к LAG-3 A IgG1 (AA)	0,4523	0,1660	2,0187	0,7035

§Результаты, полученные в одном эксперименте.

[00466] Исследования насыщения связывания демонстрируют, что конструкции биспецифических антител PD-1×LAG-3 сохраняют связывание с PD-1 и имеют профили связывания, которые сходны с профилями связывания антител к PD-1. Аналогичным образом, конструкции биспецифических антител PD-1×LAG-3 сохраняют связывание с LAG-3 и, за исключением DART 1, имеют профили связывания, которые сходны с профилями связывания исходных антител к LAG-3.



### Пример 6

#### Исследования ингибиторной способности биспецифических молекул PD-1×LAG-3

[00467] Способность биспецифических молекул PD-1×LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 и BSAB A; и антител к PD-1: МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P), МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG1 (AA), МАТ к PD-1 А IgG1 (AA) и МАТ к PD-1 А IgG4 (P), блокировать связывание PD-L1 человека (shPD-L1) и PD-L2 человека (SHPD-L2) с PD-1, экспрессируемым на поверхности клеток линии NSO, исследовали по существу, как описано выше. Диатела и антитела использовали в концентрации 33,75-0,002 мкМ или 107,5-0,0001 мкМ (четырёхкратные последовательные разведения).

[00468] Значения ИК<sub>50</sub> и ИК<sub>90</sub> определяли и представляли в таблице 17. Среднее значение выборки (SM) и стандартное отклонение (SD, σ) представляли для тех случаев, когда проводили 2 или более отдельных экспериментов.

Таблица 17

Молекула	Блокирование связывания sPD-L1/PD-1				Блокирование связывания sPD-L2/PD-1			
	ИК <sub>50</sub> (мкМ)		ИК <sub>90</sub> (мкМ)		ИК <sub>50</sub> (мкМ)		ИК <sub>90</sub> (мкМ)	
	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0,9645	0,1485	5,6312	1,5247	1,6273	0,4285	6,9335	3,9849
DART B	1,1515	0,0007	4,8615	0,2199	2,1150	0,3154	7,9550	0,0933
DART D	1,5548	0,1692	7,8950	2,5135	3,1255	0,5869	9,2973	5,5426
DART E	1,6533	0,3307	7,8470	1,1642	2,9460	0,7736	6,6135	0,0177
DART F	0,5697	0,1729	2,0360	0,1174	0,8389	0,0846	1,7995	0,2171
DART G	1,6013	0,3581	8,1953	1,5708	2,5540	0,7891	7,4810	0,2333
DART H	3,3950	0,1018	18,640	9,5742	6,2065	3,6847	29,395	3,8679
DART I	0,8363	0,1302	5,3115	0,3125	1,286	0,3125	6,2485	1,3951
DART 1	1,7467	0,3097	5,4533	1,0214	2,8355	1,8250	7,2735	3,9831
BSAB A	2,1590	0,3097	11,075	0,8132	4,8775	0,5438	15,580	1,3294
МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P)	0,5186	0,1668	3,8050	1,2227	1,0425	0,2563	3,4880	0,5459
МАТ к PD-1 А IgG4 (P)	0,9209	0,3256	4,3023	0,7069	1,3859	0,3882	5,1675	0,2943

МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG1(AA)	0,7320	0,2337	3,2048	1,1479	0,9769	0,2893	2,8437	1,4801
МАТ к PD-1 А IgG1 (AA)	1,0765	0,2393	5,2775	0,9933	1,9510	0,8814	5,0880	1,3831

[00469] Исследования ингибирования связывания лиганда демонстрируют, что конструкции биспецифических антител PD-1×LAG-3 сохраняют способность ингибировать связывание sPD-L1 и sPD-L2 с PD-1 на поверхности клетки.

[00470] Помимо этого исследовали способность биспецифических молекул PD-1×LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 и BSAB A; и антител к LAG-3: МАТ к чLAG-3 1(1.4) IgG4 (P), МАТ к LAG-3 А IgG4 (P), МАТ к чLAG-3 1(1.4) IgG1 (AA) и МАТ к LAG-3 А IgG1 (AA), блокировать связывание LAG-3 человека с нативным ГКГС класса II на поверхности клеток Дауди. В общих чертах, каждую биспецифическую молекулу PD-1×LAG-3 и контрольное антитело к LAG-3 смешивали с биотинилированным растворимым гибридным белком LAG-3-Fc человека (shLAG-3) (в концентрации 0,5 мкг/мл) и отдельно инкубировали с ГКГС II-положительными клетками Дауди ( $2,5 \times 10^6$  клеток). Количество LAG-3, связанного с поверхностью клеток Дауди, определяли с использованием ФЭ-конъюгированного вторичного антитела, связанного со стрептавидином, методом FACS. Диатела и антитела использовали в концентрации 27,5-0,026 мкМ (двукратные последовательные разведения) или 107,5-0,0001 мкМ (четырёхкратные последовательные разведения) или 35-0,002 мкМ (четырёхкратные последовательные разведения).

[00471] Значения ИК<sub>50</sub> и ИК<sub>90</sub> определяли и представляли в таблице 18. Среднее значение выборки (SM) и стандартное отклонение (SD, σ) предоставляли в тех случаях, когда проводили 2 или более отдельных экспериментов.

Таблица 18				
Молекула	Блокирование связывания shLAG-3/ГКГС класса II			
	ИК <sub>50</sub> (мкМ)		ИК <sub>90</sub> (мкМ)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	1,3835	1,6465	8,396102	8,3962
DART B	0,4081	0,1104	3,0645	0,3924
DART D	1,1843	1,1398	8,0041	7,3317
DART E	3,2706	2,9177	28,9683	24,1694

DART F	1,5347	1,2674	10,3920	11,2555
DART G	2,0618	3,3552	11,4422	12,4964
DART H	2,8967	4,9817	17,2533	21,1420
DART I	0,4864	0,1549	2,339	1,1780
DART 1	15,9610	14,0883	87,1486	109,533
BSAB A	0,7101	0,0571	7,2470	1,0706
MAT к чLAG-3 1(1.4) IgG4 (P)	0,4815	0,2176	3,4837	1,7564
MAT к LAG-3 A IgG4 (P)	0,7011	0,1900	2,4232	0,3481
MAT к чLAG-3 1(1.4) IgG1 (AA)	0,3637	0,1409	9,4422	7,9319
MAT к LAG-3 A IgG1 (AA)	0,5923	0,3407	2,1451	1,1139

[00472] Исследования ингибирования связывания лигандов демонстрируют, что конструкции биспецифических антител PD-1×LAG-3 сохраняют способность ингибировать связывание гибридного белка shLAG-3-Fc с ГКГС класса II на поверхности клетки. За исключением DART 1, биспецифические молекулы PD-1×LAG-3 имеют аналогичные профили ингибирования, как и исходные антитела к LAG-3.

### Пример 7

#### Блокирование молекул контрольной точки PD-1/PD-L1 под действием биспецифических молекул PD-1×LAG-3

[00473] Способность биспецифических молекул PD-1×LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 и BSAB A; и антител к PD-1: MAT к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P), MAT к чPD-1 7(1.2) IgG1 (AA), MAT к PD-1 A IgG1 (AA) и MAT к PD-1 A IgG4 (P), выступать антагонистами оси PD-1/PD-L1 (т.е. блокировать взаимодействие PD-1/PD-L1 и предотвращать подавление ответов Т-клеток), оценивали в количественном исследовании с использованием репортера люциферазы Jurkat-luc2-NFAT/CHO-PD-L1 (с использованием клеток CHO/PD-L1 и клеток Jurkat MNFAT-luc2/PD-1), как описано выше. Диатела и антитела использовали в концентрации 100-0,0065 мкМ (четырёхкратные последовательные разведения) или 100-0,0013 мкМ (пятикратные последовательные разведения).

[00474] Значения ИК<sub>50</sub> и ИК<sub>90</sub> определяли и представляли в таблице 19. Среднее значение выборки (SM) и стандартное отклонение (SD, σ) представляли в тех случаях, когда проводили 2 или более отдельных экспериментов.

Таблица 19

Молекула	Сигнал репортера			
	ИК <sub>50</sub> (мкМ)		ИК <sub>90</sub> (мкМ)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0,8804	0,1949	7,9115	1,3232
DART B	1,079	0,1535	7,5413	3,1483
DART D	1,4044	0,2584	12,0786	3,6616
DART E	1,4060	0,1222	13,7867	1,4981
DART F	0,3404	0,0103	1,8710	0,481
DART G	0,6914	0,0206	4,2090	0,7331
DART H	36,6167	20,8078	968,300	811,8471
DART I	1,3335	0,3641	12,146	6,8787
DART 1	11,8807	3,4905	1048,2000	1508,9992
BSAB A	9,7825	1,0288	113,3350	22,2951
MAT к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P)	0,6460	0,3035	6,0736	2,5513
MAT к PD-1 A IgG4 (P)	1,328	0,7439	16,5138	9,7149
MAT к чPD-1 7(1.2) IgG1(AA)	0,5214	0,1541	4,7592	2,1044
MAT к PD-1 A IgG1 (AA)	1,4514	1,0049	35,7382	40,9858

[00475] Исследования интенсивности сигнала репортера демонстрируют, что большинство конструкций биспецифических антител PD-1×LAG-3 сохраняют способность ингибировать связывание sPD-L1 с PD-1 на поверхности клетки. Конструкции четырехвалентных биспецифических диател PD-1×LAG-3, DART A, DART B, DART D, DART-E, DART F, DART G и DART I, были самыми сильными ингибиторами в данном количественном исследовании. Аналогичные результаты были получены для нескольких из указанных биспецифических конструкций, рассмотренных в количественном исследовании связывания PD-L2 с использованием репортера.

### Пример 8

#### Функциональная активность биспецифических молекул PD-1×LAG-3

[00476] Способность биспецифических молекул PD-1×LAG-3 усиливать выделение цитокинов посредством ингибирования контрольной точки исследовали в SEB-стимулированных МКПК при повторной стимуляции, как описано выше, за исключением отмеченных случаев.

[00477] В начальных исследованиях оценивали способность биспецифических молекул PD-1×LAG-3: DART A, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H; и антител к PD-1 и антител к LAG-3: МАТ к PD-1 А IgG4 (P) и МАТ к LAG-3 А IgG4 (P), по отдельности или в комбинации, усиливать высвобождение цитокинов посредством ингибирования контрольной точки. В данных количественных исследованиях биспецифические молекулы и антитела PD-1×LAG-3 использовали в общей концентрации 3,125, 12,5 или 50 нМ, и МКПК стимулировали с использованием 0,2 нг/мл SEB (в предыдущих исследованиях использовали 0,1 нг/мл). Для проведения данных исследований, при использовании комбинации антител, концентрация каждого антитела составляла половину от общей концентрации (т.е., 1,563, 6,25, или 25 нМ). На Фигурах 16А и 16В представлены профили секреции ИФН-γ из SEB-стимулированных МКПК двух типичных доноров, имевших ответ, D: 35644 и D: 59697, соответственно.

[00478] Как уже отмечалось, не все доноры отвечали на SEB в концентрации 0,1 или 0,2 нг/мл. Для усиления SEB-стимуляции МКПК от большего количества доноров в дополнительных исследованиях SEB использовали в высокой концентрации 85 нг/мл или средней концентрации 0,5 нг/мл. При указанных концентрациях стимуляция SEB более устойчива у большего числа доноров, несмотря на то, что все еще может наблюдаться вариабельность ответов доноров.

[00479] В одном из указанных исследований оценивали способность биспецифических молекул PD-1×LAG-3: DART A, DART B; антитела к PD-1: МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P); антитела к LAG-3: МАТ к LAG-3 1 (1.4) IgG4 (P); и комбинации: МАТ к PD-1 А IgG4 (P) и МАТ к LAG-3 А IgG4 (P), усиливать высвобождение цитокинов посредством ингибирования контрольной точки. В указанных количественных исследованиях биспецифические молекулы и антитела PD-1×LAG-3 использовали в концентрации 0,019, 0,078, 0,3125, 1,25, 5 или 20 нМ, и МКПК стимулировали с использованием 85 нг/мл SEB. Для проведения данного количественного исследования, при использовании комбинации антител, каждое антитело обеспечивали в указанной концентрации, и, соответственно, общая концентрация антител в два раза выше концентрации, которую использовали для каждого антитела (т.е., 0,038, 0,156, 0,625, 2,5, 10 или 40 нМ). На Фигурах 17А и 17В представлены профили секреции ИФН-γ из SEB-стимулированных МКПК от двух типичных доноров D: 55515 и D: 54024, соответственно.

[00480] В другом исследовании оценивали способность биспецифических молекул PD-1×LAG-3: DART A, DART B, DART C; антитела к PD-1: МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4(P); антитела к LAG-3: МАТ к LAG-3 1(1.4) IgG4(P); и комбинации: МАТ к PD-1 А IgG4 (P) и МАТ к LAG-3 А IgG4 (P), усиливать высвобождение цитокинов посредством

ингибирования контрольной точки. В данных количественных исследованиях биспецифические молекулы и антитела PD-1×LAG-3 использовали в общей концентрации 0,048, 0,195, 0,78, 3,125, 12,5 или 50 нМ, и МКПК стимулировали с использованием 0,5 нг/мл SEB. Для проведения данных исследований, в тех случаях, когда использовали комбинацию антител, концентрация каждого антитела составляла половину общей концентрации (т.е., 0,024, 0,098, 0,39, 1,563, 6,25 или 25 нМ). На Фигурах 18А и 18В представлены профили секреции ИФН- $\gamma$  из SEB-стимулированных МКПК от двух типичных доноров D: 20990 и D: 54947, соответственно.

[00481] В дополнительном исследовании оценивали высвобождение цитокина ИЛ-2. В частности, исследовали способность биспецифических молекул PD-1×LAG-3: DART D, DART H; антител к PD-1: МАТ к PD-1 А IgG4 (P), МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4(P); антител к LAG-3: МАТ к LAG-3 А IgG4 (P) и МАТ к LAG-3 1(1.4) IgG4(P); и комбинации: МАТ к PD-1 А IgG4 (P) и МАТ к LAG-3 А IgG4 (P), и МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4(P) и МАТ к LAG-3 1(1.4) IgG4(P), усиливать высвобождение ИЛ-2 посредством ингибирования контрольной точки. В данных количественных исследованиях биспецифические молекулы PD-1×LAG-3 и антитела использовали в общей концентрации 3,125, 12,5 или 50 нМ, и МКПК стимулировали высокой концентрацией SEB 85 нг/мл. Для проведения данных исследований, в которых использовали комбинацию антител, концентрация каждого антитела составляла половину общей концентрации (т.е., 1,563, 6,25, или 25 нМ). На Фигуре 19 представлен профиль секреции ИЛ-2 из SEB-стимулированных МКПК от типичного донора (D: 54024).

[00482] В дополнительных исследованиях оценивали способность биспецифических молекул PD-1×LAG-3: DART В и DART I; антител к PD-1: МАТ к PD-1 А IgG4 (P), и МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4(P); антител к LAG-3: МАТ к LAG-3 А IgG4 (P), МАТ к чLAG-3 1(1.4) IgG4(P) и МАТ к чLAG-3 6(1.1) IgG4 (P); и комбинаций: МАТ к PD-1 А IgG4 (P) и МАТ к LAG-3 А IgG4 (P), МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4(P) и МАТ к чLAG-3 1(1.4) IgG4(P), а также МАТ к чPD-1 7(1.2) IgG4(P) и МАТ к чLAG-3 6(1.1) IgG4 (P), усиливать высвобождение цитокинов посредством ингибирования контрольной точки. В данных исследованиях биспецифические молекулы и антитела PD-1×LAG-3 использовали в концентрации 0,0061, 0,024, 0,09, 0,39, 1,56, 6,25 или 25 нМ, и МКПК стимулировали с использованием 0,5 нг/мл SEB. Для проведения данных исследований, в которых использовали комбинацию антител, каждое антитело обеспечивали в указанной концентрации, и, соответственно, общая концентрация антител в два раза выше концентрации, использованной для каждого антитела (т.е., 0,0122, 0,048, 0,18, 0,78, 3,12, 12,5 или 50 нМ).

На Фигуре 20 представлены профили секреции ИФН- $\gamma$  из SEB-стимулированных МКПК, полученных от типичного донора D: 56041.

[00483] Способность биспецифической молекулы PD-1 $\times$ LAG-3 DART I; комбинации антитела к PD-1, МАТ к PD-1 А IgG4 и антитела к LAG-3, МАТ к LAG-3 А IgG4 (P); и антитела для отрицательного контроля, усиливать ответы антигенспецифичных Т-клеток исследовали с использованием количественного исследования вторичного иммунного ответа на столбнячный анатоксин. В частности, ответ антигенспецифичной усиленной секреции цитокинов измеряли с использованием столбнячного анатоксина в качестве антигена для индукции вторичного иммунного ответа в системе для количественного исследования на основе совместной культуры. В общих чертах, CD4 Т-клетки памяти ( $0,5-1,0 \times 10^5$  клеток/лунку) выделяли с использованием наборов для выделения на основе отрицательной селекции (Miltenyi Biotec, Сан-Диего, Калифорния, и Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) из периферической крови человека и культивировали в течение 5-7 дней с облученными моноцитами ( $0,01-0,05 \times 10^5$  клеток/лунку, 3500 рад) от того же донора в присутствии или в отсутствие 5 мкг/мл антигена столбнячного анатоксина для индукции вторичного иммунного ответа (TTd) и разведений (начиная с 25 нМ) DART I, МАТ к PD-1 А IgG4 + МАТ к LAG-3 А IgG4(P), или антитела для контроля изотипа. В параллельных планшетах пролиферацию измеряли путем встраивания тритированного тимидина и ИЛ-2 и ИФН- $\gamma$  измеряли методом ИФА (R&D systems, Миннеаполис, Миннесота) на 5-7 день. На фигурах 21A-D представлены профили секреции ИФН- $\gamma$  (Фигура 21A, 21C) и ИЛ-2 (Фигура 21B, 21D) на 7 день для двух типичных доноров (D50702 и D54267).

[00484] Результаты проведенных исследований демонстрируют, что биспецифические молекулы PD-1 $\times$ LAG-3 значительно усиливали выработку ИФН- $\gamma$  (Фигуры 16A-16B, 17A-17B, 18A-18B, 20) и ИЛ-2 (Фигура 19) из SEB-стимулированных МКПК при повторной стимуляции. В дополнение биспецифические молекулы PD-1 $\times$ LAG-3 значительно усиливали выработку ИФН- $\gamma$  (Фигуры 21A и 21C) из CD4 Т-клеток памяти, стимулированных столбнячным анатоксином. В частности, четырехвалентные биспецифические молекулы PD-1 $\times$ LAG-3 обеспечили более значительное усиление, чем комбинация антител к PD-1 и антител к LAG-3.

### Пример 9

#### Фармакокинетика биспецифических молекул PD-1 $\times$ LAG-3

[00485] Фармакокинетическую типичной биспецифической молекулы PD-1 $\times$ LAG-3, DART I, и типичного антитела к PD-1, МАТ к PD-1 А, исследовали у яванских макаков. В общих чертах, двум яванским макакам (одному самцу и одной самке) вводили путем

инфузии однократную дозу DART I (5 мг/кг) или МАТ к PD-1 А (10 мг/кг), и концентрацию молекул в сыворотке крови контролировали с течением времени, используя ИФА в формате «сэндвич». В общих чертах, 96-луночные планшеты для количественного исследования Maxi-Sorb™ покрывали растворимым PD-1 человека (shPD-1), блокировали бычьим сывороточным альбумином, промывали и инкубировали с калибровочными стандартами, стандартами для контроля качества и разбавленными образцами сыворотки. Количество захваченного DART I и МАТ к PD-1 А оценивали путем последовательного добавления вторичного козьего биотинилированного антитела к IgG Fc человека и конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена (СА-ПХ). Активность ПХ определяли с использованием субстрата ТМВ. Все образцы анализировали с помощью считывателя для микропланшетов (SpectraMax M2e, Molecular Device, Саннивейл, Калифорния, США), и сигналы OD, выпускаемыми стандартами для калибровки, использовали в четырехпараметрической логистической модели с использованием программного обеспечения SoftMax Pro (версия 5.4, Molecular Devices). Концентрации МАТ к PD-1 А или DART I определяли на основании интерполяции данных сигнала OD с помощью уравнения, описывающего стандартную кривую. По оценкам, нижний предел количественного определения (LLOQ) для данного исследования составил 9,775 нг/мл.

[00486] На Фигуре 22 представлена зависимость концентрации в сыворотке от времени, линии представляют среднее значение для самцов (заполненные символы) и самок (открытые символы) обезьян, которым путем инфузии вводили DART I (сплошная линия, треугольники) или МАТ к PD-1 А (пунктирная линия, круги). Полученные данные свидетельствуют о том, что фармакокинетика биспецифической молекулы PD-1×LAG-3 сравнима с фармакокинетикой антитела к PD-1 у яванских макаков.

### **Пример 10**

#### **Токсикологическое исследование антител к PD-1 и биспецифических молекул PD-1×LAG-3**

[00487] Профиль безопасности типичного антитела к PD1, МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P), и типичной биспецифической молекулы PD1×LAG-3, DART I, оценивали в исследовании по подбору дозы у яванских макаков, проведенном не в рамках НЛП (Надлежащая лабораторная практика).

[00488] В данном исследовании оценивали потенциальную токсичность и токсикокинетику антитела к PD-1 (МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P)), при введении с использованием нескольких внутривенных инфузий. Помимо этого оценивали потенциальную токсичность и фармакокинетику молекулы DART PD-1×LAG-3 (DART I)



при введении путем однократной внутривенной инфузии. Дизайн исследования представлен в таблице 20.

Таблица 20							
№ группы	Исследуемый материал	Уровень дозы (мг/кг)	Дни дозирования	Объем дозы	Доза (мг/мл)	Кол-во животных	
						Самцы	Самки
1	Контроль	0	1, 8, 15	5	0	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
2A	МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0,2	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
2B	МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0,2	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
3A	МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
3B	МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
4	DART I	5	1	5	1	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>В группах 1, 2A и 3A дозы вводили, начиная с 1 дня, и вскрытие проводили через 72 часа после введения последней (третьей) дозы на 18 день.

<sup>b</sup>В группах 2B и 3B дозы вводили, начиная с 1 дня, и вскрытие проводили через 7 дней после введения последней (третьей) дозы на 22 день.

<sup>c</sup>В группе 4 дозу вводили на 1 день и затем наблюдали за животными в течение 28 дней после введения однократной дозы (до 29 дня); животных затем возвращали в колонию.

[00489] В данном исследовании оценивали следующие параметры и конечные точки: клинические признаки, массу тела, потребление пищи, температуру тела, параметры клинической патологии (показатели гематологии, свертывания крови и клинической химии), биоаналитические и токсикокинетические параметры, уровни антител к лекарственному препарату, данные проточной цитометрии, уровни цитокинов, результаты макроскопического вскрытия, массу органов и результаты гистопатологических исследований.

[00490] Все животные выжили до запланированной эвтаназии на 18 или 22 день или выбыли из исследования на 29 день. Для МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) отсутствовали

связанные с исследуемым изделием изменения клинических признаков, потребления пищи, массы тела, температуры тела, показателей гематологии, свертывания крови или клинической химии или результатов макроскопического вскрытия. На 18 и 22 дни у животных, получавших МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) в дозе 1 или 100 мг/кг, наблюдали увеличение массы селезенки и зависимую от дозы лимфогистиоцитарную инфильтрацию красной пульпы легкой и умеренной степени тяжести. По сравнению с окружающими лимфоцитами лимфогистиоцитарные клетки имели светлую цитоплазму и нерегулярные ядра. Редкие митотические фигуры были очевидны. На микроскопическом уровне инфильтрат коррелировал с увеличением массы селезенки.

[00491] Профили зависимости концентрации в сыворотке крови от времени для животных, получавших МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P), проявляют профиль, ожидаемый для антитела у этого вида, за некоторыми исключениями. Наклон кривых после введения третьей дозы снижался более резко, чем после первой дозы для двух животных в группе дозы 1 мг/кг и у двух животных в группе дозы 100 мг/кг, что указывает на возможное появление антител к лекарственному препарату (ADA) на более поздних циклах. Анализ показал, что у 2/4 животных ADA развивались в группе 1 мг/кг, и у 1/4 животных ADA развивались в группе 100 мг/кг.

[00492] В заключение следует отметить, что введение МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) путем внутривенной инфузии один раз в неделю в течение 3 недель (1, 8 и 15 дни) хорошо переносилось у яванских макак при уровнях дозы 1 и 100 мг/кг. Дозозависимый лимфогистиоцитарный клеточный инфильтрат красной пульпы селезенки легкой и умеренной степени тяжести присутствовал при введении доз 1 и 100 мг/кг МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P).

[00493] Для DART I отсутствовали изменения клинических признаков, потребления пищи, массы тела, температуры тела, показателей гематологии или параметров свертывания крови. Изменения, связанные с DART I, параметров клинической химии, включали незначительное, кратковременное повышение активности аспаратаминотрансферазы (АСТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) на 2 день. Среднее изменение активности АСТ было в 3,2 раза выше, чем активность у контрольных животных, получавших носитель, и в 7,8 раза выше уровней до начала исследования, при этом уровни были выше контрольного эталонного диапазона. Среднее изменение активности ЛДГ было в 2,5 раза выше, чем активность у контрольных животных, получавших носитель, и в 6,9 раза выше уровней до начала исследования. Оба параметра вернулись к исходным уровням на 8 день. В заключение следует отметить, что

однократное введение DART-I путем внутривенной инфузии хорошо переносилось у яванских макак при уровне дозы 5 мг/кг.

### Пример 11

#### Исследование фармакокинетики антител к PD-1 при введении однократной дозы

[00494] Исследование фармакокинетики (ФК) при введении однократной дозы с выбранными токсикологическими конечными точками проводили у яванских макак. В данном исследовании МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) сравнивали с двумя другими антителами к PD1 IgG4 (P): МАТ к PD-1 А IgG4 (P) и МАТ к PD-1 В IgG4 (P). Каждое антитело вводили двум обезьянам (1 самцу, 1 самке) в дозе 10 мг/кг путем внутривенной инфузии в течение 1 ч, и животные находились под наблюдением в течение 65 дней.

[00495] Отсутствовали связанные с исследуемым изделием изменения клинических признаков, изменения массы тела, потребления пищи, высвобождения цитокинов или иммунофенотипирования, связанные с введением МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) или МАТ к PD-1 А IgG4 (P). Полученные данные были сходны с данными для МАТ к PD-1 В IgG4 (P), за исключением того, что при введении МАТ к PD-1 В IgG4 (P) наблюдали повышение уровней ИЛ-5.

[00496] Связывание антитела к PD-1 с PD-1 на поверхности Т-клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием способа конкурентного связывания, в котором оценивали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) флуоресцентномеченого МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P), связывающегося с Т-клетками в отсутствие (контроль, ФСБ) или в присутствии избытка конкурента (немеченого МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P)), для образцов крови, собранных во всех временных точках у яванских макак, получавших МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P), МАТ к PD-1 А IgG4 (P) или МАТ к PD-1 В IgG4 (P). Как показано на фигурах 23А-23С, МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) и МАТ к PD-1 В IgG4 (P) продемонстрировали длительное связывание с PD-1 на поверхности CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (связывание с PD-1 поддерживалось на уровне  $\geq 80\%$  в течение 28 дней или более) (Фигуры 23А и 23С, соответственно) по сравнению с МАТ к PD-1 А IgG4 (P) (связывание с PD-1 поддерживалось на уровне  $\geq 80\%$  в течение 21 дня или менее) (Фигура 23В). Для каждого из антител к PD-1 данные по связыванию с PD-1 на Т-клетках коррелируют с их концентрацией в сыворотке крови.

### Пример 12

#### Исследование токсичности при повторном введении

[00497] Для оценки безопасности, токсикокинетического и фармакодинамического профиля терапевтических молекул согласно настоящему изобретению, примерную молекулу (МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P)) вводили яванским макакам и выполняли

исследование по подбору дозы не в рамках НЛП. В данном исследовании четыре группы животных (по 10 на группу, 5 самцов и 5 самок) получали МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) или контрольный препарат один раз в неделю путем инфузии при 3 уровнях дозы. Животных оценивали для выявления любой потенциальной токсичности в течение 4-недельного периода дозирования лекарственного препарата и затем в течение дополнительного 10-недельного периода без введения лекарственного препарата. Экспериментальный дизайн данного исследования представлен в таблице 21. Животным вводили дозы один раз в неделю путем внутривенной инфузии в течение 1 ч с помощью откалиброванного инфузионного насоса на 1, 8, 15 и 22 день исследования. Одного самца и одну самку из каждой группы умерщвляли на 25 день, остальных животных умерщвляли на 95 день исследования. Оценивали влияние введения МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) на субпопуляции лейкоцитов в кровотоке, включая занятие рецепторов PD-1 на Т-лимфоцитах. Также определяли профили антител к лекарственному препарату (ADA).

Таблица 21								
№ группы	Исследуемый материал <sup>a</sup>	Уровень дозы (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Доза (мг/мл)	Кол-во животных <sup>b</sup>			
					Основное исследование		Исследование восстановления	
					М	F	М	F
1	Контроль	0	5,88	0	3	3	2	2
2	МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P)	10	5,88	1,7	3	3	2	2
3	МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P)	40	5,88	6,8	3	3	2	2
4	МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P)	150	5,88	25,5	3	3	2	2

<sup>a</sup> Контроль и МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) вводили еженедельно путем внутривенной инфузии.

<sup>b</sup> Шесть обезьян (3 самца/3 самки) на группу вскрывали на 25 день, и оставшихся обезьян в группе восстановления (2 самца/2 самки) вскрывали на 95 день.

[00498] Яванские макаки хорошо переносили еженедельные внутривенные (в/в) инфузии МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) в дозах 0, 10, 40 и 150 мг/кг, и все животные выжили до запланированной эвтаназии на 25 или 95 день. Не было обнаружено связанных с МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) изменений клинических признаков, потребления пищи, массы тела, показателей физических, офтальмологических и неврологических обследований, электрокардиологических параметров, температуры тела, частоты дыхания,

артериального давления и пульса, параметров свертывания крови, клинической химии и анализа мочи, массы органов или результатов макроскопического вскрытия.

[00499] Изменения гематологических параметров, связанные с МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P), включали кратковременное снижение титров лимфоцитов. Титры лимфоцитов умеренно уменьшались по сравнению с исходными уровнями (1 день до введения дозы) на 2 день (23 часа после инфузии) у самцов и самок при дозе  $\geq 10$  мг/кг, статистически достоверно для самцов при дозе 10 и 40 мг/кг и у самок при дозе 40 и 150 мг/кг по сравнению с контролями. Титры лимфоцитов возвращались практически к исходным уровням на 8 день до начала дозирования, но умеренно снижались у некоторых самцов и самок при всех уровнях дозы (в 0,47-0,68 раза относительно исходных уровней) на 9 день (23 часа после инфузии). Титры лимфоцитов увеличивались до введения дозы на 15 и 22 день, но уменьшались у некоторых самцов и самок (в 0,36-0,54 раза относительно исходных уровней) на 16 и 23 день (23 часа после инфузии).

[00500] Дозозависимое, кратковременное снижение популяций циркулирующих иммунных клеток, включая общую популяцию лейкоцитов, Т-клетки, В-клетки и НК-клетки, наблюдали через 23 часа после окончания инфузии у животных, получавших МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P), по сравнению с контрольной группой. Наибольшую величину изменений наблюдали после введения первой дозы в 1 день; изменения меньшей величины кратковременно наблюдали после введения последующих доз на 8, 15 или 22 дни. Популяции иммунных клеток обычно восстанавливались до исходных значений, или близких к исходным, к 72 часу после окончания инфузии и на протяжении фазы восстановления. У животных, получавших МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P), не наблюдали изменений, касающихся циркулирующих моноцитов, по сравнению с контрольной группой.

[00501] Максимальное связывание МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) с PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> клетками наблюдали в течение фазы лечения МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) исследования при всех проверенных дозах (10, 40 или 150 мг/кг). Во время периода восстановления у животных, у которых не вырабатывались антитела к лекарственному препарату (ADA), концентрации МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) в сыворотке крови оставались выше 29 мкг/мл, и максимальное связывание PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-клетками поддерживалось в течение всего 10-недельного периода восстановления. У указанных животных отсутствовали доказательства модуляции PD-1 на Т-клетках. Во время периода восстановления у животных, у которых развивались ADA-ответы, частота MGD012-связанных PD-1<sup>+</sup> Т-клеток снижалась до исходного уровня. Снижение от максимального связывания МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) с PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>

клетками ADA-положительных животных обычно имело место, когда кажущаяся концентрация МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) в сыворотке крови уменьшалась ниже приблизительно 25 мкг/мл. Однако неизвестно, относилось ли данное кажущееся пороговое соотношение к ADA-отрицательным животным, поскольку присутствие ADA у ADA-положительных животных может способствовать блокированию связывания антител к PD-1 с PD-1.

[00502] Различия фармакокинетических ответов МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P), связанные с полом животных, были минимальными и линейными в пределах исследованного диапазона доз (10-150 мг/кг). Для МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) в дозе 10, 40 и 150 мг/кг комбинированное среднее значение  $C_{max}$  для обоих полов составило 240 мкг/мл (0,240 мг/мл), 1078 мкг/мл (1,08 мг/мл) и 3938 мкг/мл (3,94 мг/мл), и значения AUC составили 47310 ч•мкг/мл (47,3 ч•мкг/мл), 205723 ч•мкг/мл (206 ч•мкг/мл) и 745681 ч•мкг/мл (746 ч•мкг/мл), соответственно. Средний клиренс согласно результатам некомпартментного анализа (NCA) первого цикла МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) до появления ADA составил 0,21 мл/ч/кг, что значительно ниже, чем скорость клубочковой фильтрации яванских макаков, как и ожидалось для высокомолекулярного белка. Средний стационарный объем распределения согласно результатам NCA первого цикла МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) составил 68 мл/кг, что приблизительно в 1,5 раза больше объема сыворотки, но меньше, чем внеклеточное водное пространство. Это свидетельствует о том, что МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) вытекает из сосудов во внеклеточное пространство ткани, но не все внеклеточное пространство было доступно для указанной молекулы. Среднее значение среднего времени удержания (MRT) согласно результатам NCA первого цикла МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) составило 335 часов или приблизительно 14 дней. Появление ADA уменьшало концентрации МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) в циклах 2-4. Доказательства снижения концентраций МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) в сыворотке крови после введения повторных доз МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) наблюдали у 7/10, 4/10 и 3/10 животных в группах доз 10, 40 и 150 мг/кг, соответственно. Присутствие ADA к МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) было подтверждено у 4, 2 и 1 из указанных животных в группах доз 10, 40 и 150 мг/кг, соответственно; все животные, у которых ADA не были подтверждены, были в группе терминального вскрытия, в которой концентрации МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) в сыворотке крови, вероятно, препятствовали детектированию ADA. Соответственно, в последующих исследованиях токсикокинетики, если остаточная концентрация была ниже, чем предыдущая остаточная концентрация, данные, начиная с этого момента времени, подвергали пересмотру. На основании результатов двухкомпаратментного моделирования данных по всем циклам для 3 групп дозирования, за

исключением временных точек, которые подверглись влиянию ADA, средние значения для первичных параметров ТК для двухкомпарментной модели составили 0,22 мл/ч/кг для клиренса, 38,5 мл/кг для первоначального объема распределения ( $V_1$ ) и 33,8 мл/кг для  $V_2$ , что дало средний равновесный объем распределения ( $V_{ss}$ ) 72,3 мл/кг и MRT 329 часов. Полученные значения согласуются с параметрами, полученными из NCA первой дозы. Результаты моделирования свидетельствуют о том, что, в отсутствие ADA, при еженедельном дозировании устойчивое состояние у яванских макак будет достигнуто после 5 дозы, и индекс накопления будет равен 2,4.

[00503] На 25 день минимальные мультифокальные периваскулярные инфильтраты мононуклеарных клеток, связанные с МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P), присутствовали в поверхностных слоях дермы в сайте в/в инъекции у самцов при дозе  $\geq 40$  мг/кг и у самок при дозе  $\geq 10$  мг/кг и были ожидаемой реакцией на повторную инъекцию чужеродного белка (моноклонального антитела). На 95 день не было отмечено каких-либо микроскопических изменений, связанных с МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P), это указывает на восстановление изменения, связанного с исследуемым изделием, наблюдаемого на 25 день.

[00504] В заключение следует отметить, что результаты данного исследования указывают на то, что введение МАТ к чPD-1 7 (1.2) IgG4 (P) путем внутривенной инфузии один раз в неделю (1, 8, 15 и 22 дни) клинически хорошо переносилось у яванских макак при уровнях дозы 10, 40 или 150 мг/кг. Наблюдаемые эффекты были ограничены кратковременным снижением количества циркулирующих лимфоцитов и минимальными изменениями в месте инъекции, связанными с инъекцией чужеродного белка. На основании этих результатов уровень без наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) считали равным 150 мг/кг (комбинированное среднее  $C_{max}$  для обоих полов 3,94 мг/мл и AUC 746 ч•мг/мл).

[00505] Все публикации и патенты, упомянутые в данном описании, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и индивидуально указана для полного включения посредством ссылки. Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано применительно к конкретными вариантами реализации, следует понимать, что оно может быть дополнительно модифицировано, и предусмотрено, что настоящая заявка включает любые варианты, способы применения или адаптированные варианты согласно настоящему изобретению, следуя в общем принципам настоящего изобретения и включая такие отклонения от настоящего изобретения, которые входят в известную или обычную

практику в области, к которой относится настоящее изобретение, и которые могут быть применены к основным признакам, изложенным выше.



Перечень последовательностей

<110> MacroGenic, Inc.  
 Shah, Kalpana  
 Smith, Douglas  
 La Motte-Mohs, Ross  
 Johnson, Leslie  
 Moore, Paul  
 Bonvini, Ezio  
 Koenig, Scott

<120> PD-1-связывающие молекулы и способы их применения

<130> 1301.0122PCT

<150> US 62/198,867  
 <151> 2015-07-30

<150> US 62/239,559  
 <151> 2015-10-09

<150> US 62/255,140  
 <151> 2015-11-13

<150> US 62/322,974  
 <151> 2016-04-15

<160> 298

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(217)  
 <223> Домен CH2-CH3 IgG1 человека

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (217)..(217)  
 <223> Хаа представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 1

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 2  
<211> 216  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(216)  
<223> Домен CH2-CH3 IgG2 человека

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (216)..(216)  
<223> Xaa представляет собой ЛИЗИН (K) или отсутствует

<400> 2

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

20

25

30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln  
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro  
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
130 135 140

Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 3  
<211> 217  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(217)  
<223> Домен CH2-CH3 IgG3 человека

<220>  
<221> MISC\_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 3

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 4

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> Домен CH2-CH3 IgG4 человека

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Хаа представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 4

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

195

200

205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa  
210 215

<210> 5

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен CH2-CH3 IgG1 человека, содержащий замены L234A/L235A

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 5

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

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

165

170

175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 6

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Несущий выступ" домен CH2-CH3 IgG1 человека

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 6

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130

135

140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 7

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> "Несущий впадину" домен CH2-CH3 IgG1 человека

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 7

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

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



100

105

110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 8  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(107)  
<223> Каппа-домен CL IgG человека

<400> 8

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1 5 10 15

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

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

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

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 9  
<211> 104  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(104)  
<223> Лямбда-домен CL IgG человека

<400> 9

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
20 25 30

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

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

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100

<210> 10  
<211> 98  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(98)  
<223> Домен CH1 IgG1 человека

<400> 10

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  
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

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

<210> 11  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(12)  
<223> Шарнирная область IgG2 человека

<400> 11

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 12  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(12)  
<223> Шарнирная область IgG4 человека

<400> 12

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro  
1 5 10

<210> 13  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Стабилизированная шарнирная область IgG4

<400> 13

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 14  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Линкер 1

<400> 14

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 15  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Содержащий цистеин линкер 2

<400> 15

Gly Gly Cys Gly Gly Gly  
1 5

<210> 16  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен, способствующий образованию гетеродимера

<400> 16

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys  
1 5

<210> 17  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен, способствующий образованию гетеродимера

<400> 17

Val Glu Pro Lys Ser Cys  
1 5

<210> 18  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
  
<220>  
<223> Домен, способствующий образованию гетеродимера  
  
<400> 18

Ala Glu Pro Lys Ser Cys  
1 5

<210> 19  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
  
<220>  
<223> Домен, способствующий образованию гетеродимера  
  
<400> 19

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
1 5

<210> 20  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
  
<220>  
<223> Домен, способствующий образованию гетеродимера  
  
<400> 20

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
1 5

<210> 21  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
  
<220>  
<223> Домен, способствующий образованию гетеродимера (E-спираль)  
  
<400> 21

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
20 25

<210> 22  
<211> 28

<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
  
<220>  
<223> Домен, способствующий образованию гетеродимера, содержащий "К-спираль"  
  
<400> 22

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val  
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
20 25

<210> 23  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Содержащий цистеин домен, способствующий образованию гетеродимера,  
содержащий "Е-спираль"

<400> 23

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
20 25

<210> 24  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Содержащий цистеин домен, способствующий образованию гетеродимера,  
содержащий "К-спираль"

<400> 24

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val  
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
20 25

<210> 25  
<211> 46  
<212> PRT  
<213> Streptococcus dysgalactiae

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(46)  
<223> Альбуминсвязывающий домен 3 белка G штамма Streptococcus G148

<400> 25

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly  
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu  
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
35 40 45

<210> 26

<211> 46

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант деиммунизированного альбуминсвязывающего домена

<400> 26

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly  
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu  
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
35 40 45

<210> 27

<211> 46

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант деиммунизированного альбуминсвязывающего домена

<400> 27

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly  
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu  
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
35 40 45

<210> 28

<211> 46

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант деиммунизированного альбуминсвязывающего домена  
<400> 28

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly  
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu  
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
35 40 45

<210> 29  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Альтернативный линкер 2  
<400> 29

Gly Gly Gly Ser  
1

<210> 30  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Альтернативный линкер 2  
<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly  
1 5

<210> 31  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Линкер  
<400> 31

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 32  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность



<220>

<223> Линкер

<400> 32

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10 15

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Альтернативный линкер 2

<400> 33

Leu Glu Pro Lys Ser Ser  
1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Альтернативный линкер 2

<400> 34

Ala Pro Ser Ser Ser  
1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Линкер

<400> 35

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu  
1 5

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Линкер

<400> 36

Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
1 5 10 15

<210> 37  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Линкер

<400> 37

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10 15

<210> 38  
<211> 525  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(525)  
<223> LAG-3 человека (сигнальная последовательность и зрелый белок)

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(28)  
<223> Сигнальная последовательность

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (29)..(525)  
<223> Зрелый белок

<400> 38

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp  
1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val  
20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile  
35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln  
50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu  
65 70 75 80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro  
85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly  
100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln  
 115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala  
 130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys  
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro  
 165 170 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser  
 180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln  
 195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser  
 210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly  
 225 230 235 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn  
 245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala  
 260 265 270

Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val  
 275 280 285

Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly  
 290 295 300

Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu  
 305 310 315 320

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His  
 325 330 335

Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr  
 340 345 350

Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu  
 355 360 365

Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser  
370 375 380

Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala  
385 390 395 400

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln  
405 410 415

Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser  
420 425 430

Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly  
435 440 445

His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu  
450 455 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro  
465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln  
485 490 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro  
500 505 510

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu  
515 520 525

<210> 39  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(120)  
<223> Вариабельный домен тяжелой цепи МАТ к LAG-3 А

<400> 39

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

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

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

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 40  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(107)  
 <223> Вариабельный домен легкой цепи МАТ к LAG-3 А

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu  
 85 90 95

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

<210> 41  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(107)  
<223> Вариабельный домен тяжелой цепи МАТ к LAG-3 1

<400> 41

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

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

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

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

Glu Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Gly Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ile Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 42  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(6)  
<223> CDRH1 МАТ к LAG-3 1

<400> 42

Arg Asn Tyr Gly Met Asn  
1 5

<210> 43  
<211> 17

<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 MAT κ LAG-3 1

<400> 43

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu  
1 5 10 15

Gly

<210> 44  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(11)  
<223> CDRH3 MAT κ LAG-3 1

<400> 44

Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 45  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(112)  
<223> Домен VL MAT κ LAG-3 1

<400> 45

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

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

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

<210> 46  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(16)  
<223> CDRL1 MAT κ LAG-3 1

<400> 46

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn  
1 5 10 15

<210> 47  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 MAT κ LAG-3 1

<400> 47

Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser  
1 5

<210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRL3 MAT κ LAG-3 1

<400> 48

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr  
1 5



<210> 49  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VH из VH1 МАТ к LAG-3 человека 1  
<400> 49

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

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

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

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

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 50  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VH из VH2 МАТ к LAG-3 человека 1  
<400> 50

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

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

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

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

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен VH из VL1 MAT к LAG-3 человека 1

<400> 51

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 52

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен VL из VL2 MAT к LAG-3 человека 1

<400> 52

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 53

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен VL из VL3 MAT к LAG-3 человека 1

<400> 53

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 54  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VL из VL4 МАТ к LAG-3 человека 1

<400> 54

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 55  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDRL1 домена VL из VL4 МАТ к LAG-3 человека 1

<400> 55

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn  
1 5 10 15

<210> 56  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(118)  
<223> Домен VH MAT κ LAG-3 6

<400> 56

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

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

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

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

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 57  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 MAT κ LAG-3 6

<400> 57

Asp Tyr Asn Met Asp  
1 5

<210> 58  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 MAT κ LAG-3 6

<400> 58

Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu  
1 5 10 15

Gly

<210> 59  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRH3 MAT κ LAG-3 6

<400> 59

Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 60  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(107)  
<223> Домен VL MAT κ LAG-3 6

<400> 60

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

Ala Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

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

<210> 61  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(11)  
 <223> CDRL1 MAT κ LAG-3 6

<400> 61

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala  
 1 5 10

<210> 62  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRL2 MAT κ LAG-3 6

<400> 62

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
 1 5

<210> 63  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRL3 MAT κ LAG-3 6

<400> 63

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
 1 5

<210> 64  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(113)  
<223> Вариабельный домен тяжелой цепи МАТ к PD-1 А  
  
<400> 64

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
100 105 110

Ser

<210> 65  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(107)  
<223> Вариабельный домен легкой цепи МАТ к PD-1 А

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

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



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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg  
85 90 95

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

<210> 66  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(120)  
<223> Вариабельный домен тяжелой цепи МАТ к PD-1 В

<400> 66

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

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

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

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 67  
<211> 111  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(111)

<223> Вариабельный домен легкой цепи МАТ к PD-1 В

<400> 67

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

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

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
35 40 45

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

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 68

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(288)

<223> Полипептид PD-1 человека (последовательность NCI NP 005009.2)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> Сигнальная последовательность PD-1 человека

<400> 68

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

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  
 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

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

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly  
 165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys  
 180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro  
 195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly  
 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

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> 69  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(121)  
<223> Домен VH МАТ к PD-1 1

<400> 69

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Phe Ser Ile Thr Asn Asp  
20 25 30

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

Met Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Phe  
65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 70  
<211> 373  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(373)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH МАТ к PD-1 1

<400> 70

cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac cttctcagtc 60  
tctgtccctc acctgcactg tcaactggctt ctcaatcacc aatgattatg cctggaactg 120  
gatccgacag tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc cacataacct acagtggcag 180  
cactagctac aacctatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa 240

ccacttcttc ctgcagttga gttctgtgac tcttgaggac acagccacat attactgtgc 300  
aagagattac ggtagtggct acccctatac tttggactac tgggggtcaag gtacctcagt 360  
caccgtctcc tcc 373

<210> 71  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(6)

<400> 71

Asn Asp Tyr Ala Trp Asn  
1 5

<210> 72  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(16)  
<223> CDRH2 MAT κ PD-1 1

<400> 72

His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 73  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(12)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 1

<400> 73

Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 74  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(106)  
 <223> Домен VL MAT к PD-1 1  
 <400> 74

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Gln Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr  
 85 90 95

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

<210> 75  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(318)  
 <223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL MAT к PD-1 1

<400> 75  
 caaattgttc tcaccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60  
 atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact ggtaccagca gaagcctgga 120  
 tcctcccccc aaccctggat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtgataacc cgtacacgtt cggagggggg 300  
 accaagctgg aaataaaa 318

<210> 76  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(10)  
<223> CDRL1 MAT к PD-1 1

<400> 76

Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val Tyr  
1 5 10

<210> 77  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 MAT к PD-1 1

<400> 77

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRL3 MAT к PD-1 1

<400> 78

Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 79  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VH из VH1 MAT к PD-1 человека 1

<400> 79

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Asn Asp  
20 25 30

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

Ile Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 80

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полинуклеотид, кодирующий VH1 МАТ к PD-1 человека

<400> 80

gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctgggtgaagc catcccagac actgagcctg 60

acttgcaccg tgagtggctt ctccatctca aatgactacg cctggaattg gattaggcag 120

cctcccggta aagggtctgga gtggatcggc cacatcacat acagcggctc cacatcatat 180

aatcccagtc tgaagagccg tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttgtt 240

ctgacatga ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcgagattat 300

ggttctgggt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt gaccgtgagc 360

tcc 363

<210> 81

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен VL из VL1 МАТ к PD-1 человека 1

<400> 81

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val



20

25

30

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

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr  
85 90 95

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

<210> 82  
<211> 318  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Полинуклеотид, кодирующий VL1 МАТ к PD-1 человека 1

<400> 82  
gaaatcgttc tgaccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga aaaggtcacc 60  
attacttgct ctgctacttc tatcgtgtcc tacgtgtact ggtatcagca gaagcccggg 120  
caggctcccc agccattgat atatctgacc agcaacctgg cttctggtat cccagctcgt 180  
ttttccggta gcgggtccgg gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa 240  
gacgccgcca cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcgggtggc 300  
accaaagtcg aaataaag 318

<210> 83  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(116)  
<223> Домен VH МАТ к PD-1 2

<400> 83

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 84  
<211> 348  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(348)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH МАТ к PD-1 2

<400> 84  
gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120  
ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac atcagtagtg gcagtatgag catttctat 180  
gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240  
ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt 300  
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348

<210> 85  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 МАТ к PD-1 2

<400> 85

Ser Phe Gly Met His  
1 5

<210> 86  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 MAT κ PD-1 2

<400> 86

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 87  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 2

<400> 87

Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 88  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(112)  
<223> Домен VL MAT κ PD-1 2

<400> 88

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

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

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

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

Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105						110	

<210> 89  
 <211> 336  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(336)  
 <223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL MAT к PD-1 2

<400> 89  
 gatgttgatga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gagccttggt cacagtactg gaaacaccta tttacattgg 120  
 tactgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagggtttc taaccgattt 180  
 tctgggggtcc cgcacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240  
 agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaaactac acatgttccg 300  
 tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 90  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(16)  
 <223> CDRL1 MAT к PD-1 2

<400> 90

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Thr	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His
1				5					10					15	

<210> 91  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 MAT к PD-1 2

<400> 91

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 MAT к PD-1 2

<400> 92

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr  
1 5

<210> 93

<211> 116

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен VH из VH1 MAT к PD-1 человека 2

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 94  
<211> 348  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Полинуклеотид, кодирующий VH1 МАТ к PD-1 человека 2

<400> 94  
gaagtgcaat tggttgagag tgggtggtggc ctgggtgcagc caggtggaag tctgcggttg 60  
tcctgtgcag caagcggatt tgtgttcagc tcttttggga tgcattgggt gcgccaggct 120  
cccggcaagg gtctcgagtg ggtagcatac atctccagcg ggtccatgtc tattagttat 180  
gccgacacag tgaaaggcag gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cacactgtac 240  
ctgcaaatga atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc ttccctgtct 300  
gattacttcg actactgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc 348

<210> 95  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VL из VL1 МАТ к PD-1 человека 2

<400> 95

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

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

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr  
85 90 95

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

<210> 96  
<211> 336  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Полинуклеотид, кодирующий VL1 МАТ к PD-1 человека 2

<400> 96  
gacgttgatga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccctggggcca gccagccagt 60  
atctcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag gaaatacata tctccattgg 120  
tacctgcaaa aaccagggca gagccccag ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt 180  
tctggcgtgc cagatcggtt cagcggcagc gggctctggca ctgatttcac actgaaaatc 240  
tctagggtgg aggcagagga cgtaggcggt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc 300  
tggacttttg gccaaaggtac taagctggaa atcaag 336

<210> 97  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(125)  
<223> Домен VH МАТ к PD-1 3

<400> 97

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Glu Lys Ile Thr Thr Ile Val Glu Gly Thr Tyr Trp Tyr Phe  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 98  
<211> 375  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(375)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH МАТ к PD-1 3

<400> 98  
caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgagggc ctggggccttc agtgacgctg 60  
tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa tgcactgggt gaagcagaca 120  
cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact attgatcctg aaactgggtgg tactgcctac 180  
aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac 240  
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag 300  
attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360  
gtcaccgtct cctca 375

<210> 99  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 МАТ к PD-1 3

<400> 99

Asp Tyr Val Met His  
1 5

<210> 100  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 МАТ к PD-1 3

<400> 100



Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 101  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(16)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 3

<400> 101

Glu Lys Ile Thr Thr Ile Val Glu Gly Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10 15

<210> 102  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(112)  
<223> Домен VL MAT κ PD-1 3

<400> 102

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

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

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

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

Ser His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 103  
<211> 336  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(336)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL МАТ к PD-1 3

<400> 103  
gatgttttgc tgaccсааас tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gagacaccta tttggaatgg 120  
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt 180  
tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcagga cagattttac actcaaaatc 240  
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatcttccg 300  
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 104  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(16)  
<223> CDRL1 МАТ к PD-1 3

<400> 104  
Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

<210> 105  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 МАТ к PD-1 3

<400> 105  
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 106  
<211> 9

<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRL3 MAT κ PD-1 3

<400> 106

Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 107  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(116)  
<223> Домен VH MAT κ PD-1 4

<400> 107

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 108  
<211> 348  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(348)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH МАТ к PD-1 4

<400> 108  
gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcaactgggt tcgtcaggct 120  
ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcataat attagtagtg gcagtatgag tatttctctat 180  
gcagacacag tgaagggccg attcacgcgc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240  
ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact 300  
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctctca 348

<210> 109  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 МАТ к PD-1 4

<400> 109  
Ser Phe Gly Met His  
1 5

<210> 110  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 МАТ к PD-1 4

<400> 110  
Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 111  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRH3 MAT к PD-1 4

<400> 111

Leu Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 112  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(112)  
<223> Домен VL MAT к PD-1 4

<400> 112

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 113  
<211> 336  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(336)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL MAT к PD-1

<400> 113  
gatgttgatga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
atctcctgca gatctagtca gaggccttggt cacagtactg gaaacaccta tttccattgg 120  
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagggtttc taaccgattt 180  
tctgggggtcc cgcacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240  
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaactac acatgttccg 300  
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 114  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(16)  
<223> CDRL1 MAT κ PD-1 4

<400> 114  
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Phe His  
1 5 10 15

<210> 115  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 MAT κ PD-1 4

<400> 115  
Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 116  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRL3 MAT κ PD-1 4

<400> 116  
Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr  
1 5

<210> 117  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(119)  
<223> Домен VH MAT к PD-1 5

<400> 117

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 118  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(357)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH MAT к PD-1 5

<400> 118

caggtcсаас tgcagcagcc tgggggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta ctccctcacc gcctactgga tgaactggat gaaacagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta 180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240  
atgcaactca tcagccccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagcac 300  
tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

<210> 119  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 MAT κ PD-1 5

<400> 119

Ala Tyr Trp Met Asn  
1 5

<210> 120  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 MAT κ PD-1 5

<400> 120

Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Asp

<210> 121  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(10)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 5

<400> 121

Glu His Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 122  
<211> 111



<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(111)  
<223> Домен VL MAT к PD-1 5

<400> 122

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

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

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 123  
<211> 333  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(333)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL MAT к PD-1 5

<400> 123

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtcctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcctgac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 124  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(15)  
<223> CDRL1 MAT κ PD-1 5

<400> 124

Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn  
1                   5                   10                   15

<210> 125  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 MAT κ PD-1 5

<400> 125

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser  
1                   5

<210> 126  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRL3 MAT κ PD-1 5

<400> 126

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr  
1                   5

<210> 127  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(118)  
<223> Домен VH MAT κ PD-1 6

<400> 127

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Thr  
115

<210> 128  
<211> 333  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(333)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH МАТ к PD-1 6

<400> 128  
gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60  
ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120  
cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcattccag cgcctctaa ccgcgatct 180  
ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240  
tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgcctat 300  
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 129  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 MAT κ PD-1 6  
  
<400> 129

Ser Tyr Gly Met Ser  
1 5

<210> 130  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 MAT κ PD-1 6  
  
<400> 130

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 131  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 6  
  
<400> 131

Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr  
1 5

<210> 132  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(111)  
<223> Домен VL MAT κ PD-1 6  
  
<400> 132

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

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

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

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

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 133  
<211> 333  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(333)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL MAT к PD-1 6

<400> 133  
gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60  
atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 120  
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ctgcatccaa ccaaggatcc 180  
ggggtccttg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240  
cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcogtgg 300  
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 134  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(15)  
<223> CDRL1 MAT к PD-1 6

<400> 134

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn

1 5 10 15

<210> 135  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 MAT κ PD-1 6

<400> 135

Pro Ala Ser Asn Gln Gly Ser  
1 5

<210> 136  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRL3 MAT κ PD-1 6

<400> 136

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr  
1 5

<210> 137  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(119)  
<223> Домен VH MAT κ PD-1 7

<400> 137

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 138  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(357)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH МАТ к PD-1 7

<400> 138  
gaggccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctgggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60  
tcctgcaagg cttctggcta ctccctcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120  
cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta 180  
gatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac 240  
atgcaactca tcagcccgcac atctgaggac tctgcggctc attactgtgc aagggagcac 300  
tacggtaacta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt gtcttcc 357

<210> 139  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 МАТ к PD-1 7

<400> 139  
Ser Tyr Trp Met Asn  
1 5

<210> 140  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 MAT κ PD-1 7

<400> 140

Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Asp

<210> 141  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(10)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 7

<400> 141

Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 142  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(111)  
<223> Домен VL MAT κ PD-1 7

<400> 142

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His



65

70

75

80

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 143  
 <211> 333  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(333)  
 <223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL МАТ к PD-1 7

<400> 143  
 gacattgtgc tgaccsaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60  
 atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatccatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180  
 ggggtccctg ccaggtttag tggcagtgagg tttgggacag acttcagcct caacatccat 240  
 cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300  
 acgttcggag gggggaccaa gctggaata aaa 333

<210> 144  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(15)  
 <223> CDRL1 МАТ к PD-1 7

<400> 144

Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn  
 1 5 10 15

<210> 145  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRL2 МАТ к PD-1 7

<400> 145

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser  
1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 MAT к PD-1 7

<400> 146

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 147

<211> 119

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен VH из VH1 MAT к PD-1 человека 7

<400> 147

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 148  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Полинуклеотид, кодирующий VH1 МАТ к PD-1 человека 7

<400> 148  
caagttcaat tggtagacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgttaagggtg 60  
tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120  
ccagggcagg gtctggaatg gattgggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatgggtg 180  
gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac 240  
atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgctc cagagagcac 300  
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaaactc tcgtaaccgt atcctcc 357

<210> 149  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VH из VH2 МАТ к PD-1 человека 7

<400> 149  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
35 40 45  
Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
50 55 60  
Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 150  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Полинуклеотид, кодирующий VH2 МАТ к PD-1 человека 7

<400> 150  
caagttcaat tggtagagag cggggcagag gtgaagaaac cgggcgccag tgttaagggtg 60  
tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120  
ccagggcagg gtctggaatg ggctgggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatggttg 180  
gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac 240  
atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac 300  
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaaactc tcgtaaccgt atcctcc 357

<210> 151  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VL из VL1 МАТ к PD-1 человека 7

<400> 151  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30  
Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45  
Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80  
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95  
Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 152  
<211> 333  
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полинуклеотид, кодирующий VL1 МАТ к PD-1 человека 7

<400> 152

gaaatcgtac tcaccsagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60  
ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120  
cagcagaagc ctgggcagcc acctaaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct 180  
ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240  
tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgcccctat 300  
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 153

<211> 111

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен VL из VL2 МАТ к PD-1 человека 7

<400> 153

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

<210> 154

<211> 333

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полинуклеотид, кодирующий VL2 МАТ к PD-1 человека 7

<400> 154  
gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60  
ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120  
cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct 180  
ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240  
tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgcctat 300  
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 155  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VL из VL3 МАТ к PD-1 человека 7

<400> 155  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30  
Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45  
Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80  
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95  
Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 156  
<211> 333  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Полинуклеотид, кодирующий VL3 МАТ к PD-1 человека 7

<400> 156  
gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120  
cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg cgcctctaa cgcgggatct 180  
ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240  
tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccttat 300  
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 157  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDRL1 домена VL из VL2 МАТ к PD-1 человека 7 и VL3 МАТ к PD-1 человека 7  
<400> 157

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn  
1 5 10 15

<210> 158  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDRL2 домена VL из VL3 МАТ к PD-1 человека 7  
<400> 158

Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser  
1 5

<210> 159  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(113)  
<223> Домен VH МАТ к PD-1 8

<400> 159

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Asn His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Glu Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Ser

<210> 160  
<211> 339  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(339)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH MAT к PD-1 8

<400> 160  
gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctgggtgaagc ctggggccttc agtgaagata 60  
tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagaac 120  
catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta aaaatggtga cactcactac 180  
aaccagaagt tcaagggcga ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac 240  
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcgatttt 300  
gactactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctcc 339

<210> 161  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 MAT к PD-1 8

<400> 161

Asp Tyr Tyr Met Asn  
1 5

<210> 162  
<211> 17



<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 MAT κ PD-1 8

<400> 162

Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 163  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(4)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 8

<400> 163

Asp Phe Asp Tyr  
1

<210> 164  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(112)  
<223> Домен VL MAT κ PD-1 8

<400> 164

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 165  
<211> 336  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(336)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL МАТ к PD-1 8

<400> 165  
gatgttgtga tgaccsaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttggaga tcaagcctcc 60  
atctcttgca gatctagtca gacccttgta tatagtaatg gaaacaccta tttaaattgg 120  
ttctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240  
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca 300  
ttcacgttcg gctcggggac aaagttgga ataaaa 336

<210> 166  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(16)  
<223> CDRL1 МАТ к PD-1 8

<400> 166

Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn  
1 5 10 15

<210> 167  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 MAT κ PD-1 8

<400> 167

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 MAT κ PD-1 8

<400> 168

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr  
1 5

<210> 169

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(119)

<223> Домен VH MAT κ PD-1 9

<400> 169

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 170  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(357)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH МАТ к PD-1 9

<400> 170  
gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatcttg tgtcttgggt tcgccagact 120  
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgaacc attagtgggtg gtggtggtaa cacctactat 180  
tcagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240  
ctgcaaatca gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaggatgggt 300  
ttcgacggcg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc 357

<210> 171  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 МАТ к PD-1 9

<400> 171

Ser Tyr Leu Val Ser  
1 5

<210> 172  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 МАТ к PD-1 9

<400> 172

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 173  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(10)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 9

<400> 173

Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 174  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(107)  
<223> Домен VL MAT κ PD-1 9

<400> 174

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Glu Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 175

<211> 321  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(321)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL МАТ к PD-1 9

<400> 175  
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga tattgtcacc 60  
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catgggatca gcagaaacag 120  
gaaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaaacct tggcagcagg tgtgccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct 240  
gaagattttg ggaattatta ctgtcagcat cattatgctg ttccgtggac gttcgggtgga 300  
ggcaccagac tggaaatcac a 321

<210> 176  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(11)  
<223> CDRL1 МАТ к PD-1 9

<400> 176  
Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 177  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 МАТ к PD-1 9

<400> 177  
Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala  
1 5

<210> 178  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRL3 MAT к PD-1 9  
  
<400> 178

Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp Thr  
1 5

<210> 179  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VH из VH1 MAT к PD-1 человека 9  
  
<400> 179

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 180  
<211> 357  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Полинуклеотид, кодирующий VH1 MAT к PD-1 человека 9  
  
<400> 180  
gaggtgcagc tgggtgaaag tgggggcggc ctggtgcgac ccgggggaag tctgaaactg

tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg tgtcttgggt aagacaagca 120  
 cccggaaaag gcttggaatg ggtggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat 180  
 agcgacagtg tcaaggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240  
 ctccagatga actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300  
 tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc 357

<210> 181  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Домен VH из VH2 МАТ к PD-1 человека 9  
 <400> 181

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 182  
 <211> 357  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Полинуклеотид, кодирующий VH2 МАТ к PD-1 человека 9  
 <400> 182

gaggtgcagc tgggtgaaag tgggggaggc ctggcgcgac cggggggaag tctgaaactg 60



tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg tgggctgggt aagacaagca 120  
cccggaaaag gcttggaatg gacggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat 180  
agcgacagtg tcaaggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240  
ctccagatga actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300  
tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc 357

<210> 183  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDRH1 домена VH из VH2 МАТ к PD-1 человека 9, содержащего замену серина глицином

<400> 183

Ser Tyr Leu Val Gly  
1 5

<210> 184  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VL из VL1 МАТ к PD-1 человека 9

<400> 184

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

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

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

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

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

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

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

<210> 185  
<211> 321  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полинуклеотид, кодирующий VL1 МАТ к PD-1 человека 9

<400> 185  
gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc 60  
atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg cctgggtatca acagaaacct 120  
ggtaaagccc caaaattgct catttacaac gccaaagacc tcgcagctgg cgtgccaaagt 180  
aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc 240  
gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccttgac cttcggacaa 300  
ggcactaagc tcgagatcaa a 321

<210> 186  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен VL из VL2 МАТ к PD-1 человека 9

<400> 186

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

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

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

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

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

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

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

<210> 187  
<211> 321  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Полинуклеотид, кодирующий VL2 МАТ к PD-1 человека 9

<400> 187  
gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc 60  
atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg cctgggatca acagaaacct 120  
ggtaaagccc caaaattgct catttacgac gccaaagacc tcgcagctgg cgtgccaaagt 180  
aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc 240  
gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccttggac cttcggacaa 300  
ggcactaagc tcgagatcaa a 321

<210> 188  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDRL1 домена VL из VL2 МАТ к PD-1 человека 9

<400> 188

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 189  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDRL2 домена VL из VL2 МАТ к PD-1 человека 9

<400> 189

Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala  
1 5

<210> 190  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(116)  
<223> Домен VH МАТ к PD-1 10

<400> 190  
Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20

25

30

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

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

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

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

Ala Arg Gln Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 191  
<211> 348  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(348)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH МАТ к PD-1 10

<400> 191  
gaagtgatac tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatctca tgtcttgggt tcgccagact 120  
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt attagtgggt gtggtagtaa tatctactat 180  
ccagacagtg tgaagggtcg attcaccata tccagggaca atgccaagaa cacctgtac 240  
ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagaa 300  
ctggcttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348

<210> 192  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 МАТ к PD-1 10

<400> 192

Asn Tyr Leu Met Ser  
1 5

<210> 193  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 MAT κ PD-1 10

<400> 193

Ser Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 194  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 10

<400> 194

Gln Glu Leu Ala Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 195  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(107)  
<223> Домен VL MAT κ PD-1 10

<400> 195

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 196  
<211> 321  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(321)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL MAT к PD-1 10

<400> 196  
gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60  
atcagttgca ggacaagtca ggacattagc aatTTTTTaa actggtatca gcagaaacca 120  
gatggaacta ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240  
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtagtagcg ttccgtggac gttcgggtgga 300  
ggaccaagc tggaaatcat a 321

<210> 197  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(11)  
<223> CDRL1 MAT к PD-1 10

<400> 197

Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn  
1 5 10

<210> 198  
<211> 7

<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 MAT κ PD-1 10

<400> 198

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser  
1 5

<210> 199  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (19)..()  
<223> CDRL3 MAT κ PD-1 10

<400> 199

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp Thr  
1 5

<210> 200  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(117)  
<223> Домен VH MAT κ PD-1 11

<400> 200

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Thr Thr Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 201  
<211> 351  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(351)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH МАТ к PD-1 11

<400> 201  
gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60  
tctgcaaga cttctggcta cacatttacc ggctactgga tgcaactgggt aaaacagagg 120  
cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct atttatcctg gaaatagtga tactcactac 180  
aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac 240  
atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcatct attactgtac tactggggacc 300  
tactcgtact tcgatgtctg gggcacaggg accacgggtca cegtctcctc a 351

<210> 202  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 МАТ к PD-1 11

<400> 202

Gly Tyr Trp Met His  
1 5

<210> 203  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)



<223> CDRH2 MAT κ PD-1 11

<400> 203

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 204  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(8)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 11

<400> 204

Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 205  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(106)  
<223> Домен VL MAT κ PD-1 11

<400> 205

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105

<210> 206  
<211> 318  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(318)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL МАТ к PD-1 11

<400> 206  
gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60  
ttctcctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac actgggtatca gcacagaaca 120  
aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180  
aggtttagtg gcagtggatc agggactgat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct 240  
gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacggt cggtgctggg 300  
accaagctgg agctgaaa 318

<210> 207  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(11)  
<223> CDRL1 МАТ к PD-1 11

<400> 207

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His  
1 5 10

<210> 208  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 МАТ к PD-1 11

<400> 208

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser  
1 5

<210> 209  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(8)  
<223> CDRL3 MAT κ PD-1 11

<400> 209

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Leu Thr  
1 5

<210> 210  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(125)  
<223> Домен VH MAT κ PD-1 12

<400> 210

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Glu Arg Ile Thr Thr Val Val Glu Gly Ala Tyr Trp Tyr Phe  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 211

<211> 375  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(375)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH МАТ к PD-1 12

<400> 211  
caggggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60  
tcctgcaagg cttcgggctt cacatttact gactatgaga tgcactgggt gaaacagaca 120  
cctgtgcatg gcctggaatg gattgggact attgatcctg aaactgggtg tactgcctac 180  
aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac 240  
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagagagagg 300  
attactacgg ttgttgaggg ggcatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360  
gtcaccgtct cctca 375

<210> 212  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 МАТ к PD-1 12

<400> 212  
Asp Tyr Glu Met His  
1 5

<210> 213  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 МАТ к PD-1 12

<400> 213  
Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 214  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(16)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 12

<400> 214

Glu Arg Ile Thr Thr Val Val Glu Gly Ala Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10 15

<210> 215  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(112)  
<223> Домен VL MAT κ PD-1 4

<400> 215

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Cys Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

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

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 216  
<211> 336  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus



<400> 219

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 220  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(121)  
<223> Домен VH MAT к PD-1 13

<400> 220

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His  
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 221  
<211> 363  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(363)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH MAT к PD-1 13

<400> 221

gaagtgatgc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc

tctgtgcag cctctggatt cacttttcagt agccatacca tgtcttgggt tcgccagact 120  
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgggtg gtggttctaa tatctactat 180  
ccagacagtg tgaagggctg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240  
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct 300  
tactacggta attactggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggg caccgtctcc 360  
tcc 363

<210> 222  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 MAT κ PD-1 13

<400> 222

Ser His Thr Met Ser  
1 5

<210> 223  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 MAT κ PD-1 13

<400> 223

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 224  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(12)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 13

<400> 224



Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 225  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(107)  
<223> Домен VL MAT к PD-1 13

<400> 225

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

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asp Ser Ile Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 226  
<211> 321  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(321)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL MAT к PD-1 13

<400> 226

gacattcaga tgaccagtc tcctgccacc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60

atcacgtgcc tggcaagtca gaccattggt acatgggttag catggtatca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctgagctct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct 240  
gaagattttg taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcgggtgga 300  
ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 227  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(11)  
<223> CDRL1 MAT κ PD-1 13

<400> 227

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala  
1 5 10

<210> 228  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 MAT κ PD-1 13

<400> 228

Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp  
1 5

<210> 229  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRL3 MAT κ PD-1 13

<400> 229

Gln Gln Leu Asp Ser Ile Pro Trp Thr  
1 5

<210> 230  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(117)  
<223> Домен VH MAT к PD-1 14

<400> 230

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ile Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Thr Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 231  
<211> 351  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(351)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH MAT к PD-1 14

<400> 231

caggccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
tctgcaagg cttctggcta caacttcate agctactgga taacctgggt gaaacagagg 120  
cctggacaag gccttcagtg gattggaaat atttatcctg gtactgatgg tactacctac 180  
aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240  
atgcacctca gtcgcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aactgggcta 300  
cactgggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacgggtca cegtctctc c 351

<210> 232  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 MAT κ PD-1 14

<400> 232

Ser Tyr Trp Ile Thr  
1 5

<210> 233  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 MAT κ PD-1 14

<400> 233

Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 234  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(8)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 14

<400> 234

Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 235  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(107)

<223> Домен VL MAT к PD-1 14

<400> 235

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 236

<211> 321

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(321)

<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL MAT к PD-1 14

<400> 236

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt 60

gtcacctgca aggccagtca gagtgtgggt actaatgtag cctgggtatca acagaagccc 120

ggtcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcacccctcc gattcagtgg cgtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg 300

gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 237

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(11)  
<223> CDRL1 MAT κ PD-1 14  
  
<400> 237

Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Asn Val Ala  
1 5 10

<210> 238  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 MAT κ PD-1 14  
  
<400> 238

Ser Ala Ser Ser Arg Phe Ser  
1 5

<210> 239  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRL3 MAT κ PD-1 14  
  
<400> 239

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 240  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(117)  
<223> Домен VH MAT κ PD-1 15  
  
<400> 240

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 241  
<211> 351  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(351)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VH МАТ к PD-1 15

<400> 241  
gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggagggc ttagtgaagc ctggaggggc cctgaaactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cattttcagt agctatctca tctcttgggt tcgccagact 120  
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcctgcc attagtggtg gtgggtgctga cacctactat 180  
gccgacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat 240  
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg 300  
acctatgcta tggactactg ggggtcaagga acctcagtc ccgctctctc c 351

<210> 242  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 МАТ к PD-1 15

<400> 242

Ser Tyr Leu Ile Ser

1

5

<210> 243  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 MAT κ PD-1 15

<400> 243

Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 244  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(8)  
<223> CDRH3 MAT κ PD-1 15

<400> 244

Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5

<210> 245  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(107)  
<223> Домен VL MAT κ PD-1 15

<400> 245

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

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp  
20 25 30

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



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

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

Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 246  
<211> 321  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(321)  
<223> Полинуклеотид, кодирующий домен VL MAT к PD-1 15

<400> 246  
gacattcaga tgaccagtc tccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60  
atcacatgcc tggcaagtca gaccattggt acatgggttag catggtatca gcagaaacca 120  
gggaaatctc ctcaagctct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct 240  
gaagattttg taaattatta ctgtcaaca ctttacagta ttccgtggac gttcgggtgga 300  
ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 247  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(11)  
<223> CDRL1 MAT к PD-1 15

<400> 247

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala  
1 5 10

<210> 248  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(7)  
<223> CDRL2 MAT к PD-1 15

<400> 248

Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp  
1 5

<210> 249  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDRL3 MAT к PD-1 15

<400> 249

Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp Thr  
1 5

<210> 250  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VH из MAT к PD-1 человека 15 VH1

<400> 250

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg 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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 251  
<211> 351  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Полинуклеотид, кодирующий VH1 МАТ к PD-1 человека 15

<400> 251  
gaagtgcaac tggttgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtgggtc actcagactg 60  
tcttgtgcag cttcaggctt tacattctcc tcttatctta tctcttgggt gcgccaagcc 120  
ccaggtaagg gccttgaatg ggtcgccgcc attagtgggg gtggtgccga tacatattat 180  
gccgacagcg tcaagggacg tttcaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac 240  
ctgcagatga actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc ccggcgcggg 300  
acttacgcta tggactattg gggccagggc accttgggtca ctgtctcacc c 351

<210> 252  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VH из МАТ к PD-1 человека 15 VL1

<400> 252

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

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

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

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

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

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

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

<210> 253  
<211> 321  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Полинуклеотид, кодирующий VL1 МАТ к PD-1 человека 15

<400> 253  
gatatccaga tgaccagtc tcccagctct ctcagtgcaa gcgtaggcga ccgtgtgacc 60  
atcacctgtc tggccagtca gaccattgga acctggctcg cctgggatca gcagaaacct 120  
ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc gccacctccc tcgcagatgg agtgcctcc 180  
cgatttagcg ggtccgggtc cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc 240  
gaggatttcg ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttggtcag 300  
ggtactaaac tggagatcaa a 321

<210> 254  
<211> 98  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(98)  
<223> Домен CH1 IgG4 человека

<400> 254

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val

<210> 255  
 <211> 329  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Гуманизированная тяжелая цепь IgG1  
  
 <400> 255

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  
 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

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  
 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

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  
 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  
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
325

<210> 256

<211> 326

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Гуманизированная тяжелая цепь IgG4 со стабилизированной шарнирной областью

<400> 256

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 325

<210> 257  
<211> 98  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(98)  
<223> Домен CH1 IgG2 человека

<400> 257

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
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

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Thr Val

<210> 258  
<211> 217  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (217)..(217)  
<223> Хаа представляет собой ЛИЗИН (K) или отсутствует

<400> 258

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

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30



Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 259

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность IgG4 для доменов CH2 и CH3

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 259

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

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa  
210 215

<210> 260

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домены дикого типа и вариант доменов CH2 и CH3 IgG1 человека

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(5)  
<223> Xaa4 и Xaa5 представляют собой L (дикий тип), или оба представляют собой A (сниженное связывание с рецептором Fc-гамма)

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (22)..(26)  
<223> Xaa22, Xaa24 и Xaa26, соответственно, представляют собой M, S и T (дикий тип), или представляют собой Y, T и E (более длительный период полувыведения)

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (136)..(177)  
<223> Xaa136, Xaa138 и Xaa177, соответственно, представляют собой: T, L и Y (дикий тип), или представляют собой W, L и Y (выступ), или S, A и V (впадина)

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (204)..(205)  
<223> Xaa204 и Xaa205, соответственно, представляют собой N и H (дикий тип), или представляют собой N и R (связывание с белком A отсутствует), или A и K (связывание с белком A отсутствует)

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (217)..(217)  
<223> Xaa217 представляет собой K или отсутствует

<400> 260

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

Pro Lys Asp Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Xaa Cys Xaa Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Xaa Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Xaa Xaa Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 261  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ЛИНКЕР 2

<400> 261

Leu Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5

<210> 262  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Линкер 3

<400> 262

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
1 5 10

<210> 263  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Линкер 3

<400> 263

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 264

<211> 218

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь гуманизированного антитела к PD-1 (МАТ к PD-1 человека 7(1.2))

<400> 264

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195

200

205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

&lt;210&gt; 265

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Тяжелая цепь гуманизированного антитела к PD-1 ((MAT к PD-1 человека  
 7(1.2))

&lt;400&gt; 265

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

<210> 266  
<211> 445  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь гуманизированного антитела ((MAT к PD-1 человека 7(1.2))

<400> 266

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
195 200 205



Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440 445

<210> 267  
<211> 501  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Первая и третья полипептидные цепи DART A

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (34)..(34)  
<223> Xaa34 представляет собой A или G

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (307)..(307)  
<223> Xaa307 представляет собой Y или M

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (309)..(309)  
<223> Xaa309 представляет собой T или S

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (311)..(311)  
<223> Xaa311 представляет собой E или T

<400> 267

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Xaa Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly  
115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala  
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala



405

410

415

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 420 425 430

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 435 440 445

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg  
 450 455 460

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 465 470 475 480

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 485 490 495

Ser Leu Ser Leu Gly  
 500

<210> 268

<211> 273

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая и четвертая полипептидные цепи DART A

<400> 268

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu  
165 170 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp  
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu  
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly  
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala  
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys  
260 265 270

Glu

<210> 269  
<211> 571  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Первая и третья полипептидные цепи DART D

<400> 269

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35

40

45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
 115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu  
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp  
 180 185 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu  
 195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr  
 210 215 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu  
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 245 250 255

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 260 265 270

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 275 280 285

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

290

295

300

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
305 310 315 320

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn  
325 330 335

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro  
340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val  
370 375 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
385 390 395 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
405 410 415

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
420 425 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
435 440 445

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
450 455 460

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln  
465 470 475 480

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
485 490 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His





Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser  
210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu  
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
245 250 255

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
260 265 270

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
275 280 285

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
290 295 300

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
305 310 315 320

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
325 330 335

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
340 345 350

<210> 271

<211> 571

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая и третья полипептидные цепи DART E

<400> 271

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly  
115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala  
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala  
145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser  
165 170 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val  
180 185 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser  
210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu  
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
245 250 255

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
260 265 270

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
275 280 285

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
290 295 300

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser



<210> 272  
 <211> 352  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Вторая и четвертая полипептидные цепи DART E  
  
 <400> 272

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
 115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu  
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp  
 180 185 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu  
 195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu  
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
245 250 255

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
260 265 270

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
275 280 285

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
290 295 300

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
305 310 315 320

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
325 330 335

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
340 345 350

<210> 273  
<211> 448  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Первая полипептидная цепь DART F

<400> 273

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr



325

330

335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
 355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430

Ala Leu His Ala Lys Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

<210> 274

<211> 218

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая и пятая полипептидные цепи DART F

<400> 274

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 275  
<211> 732  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Третья полипептидная цепь DART F

<400> 275

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys



85

90

95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr  
 245 250 255

Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340

345

350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Val Met Thr  
450 455 460

Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile  
465 470 475 480

Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr  
485 490 495

Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Glu Arg Leu Ile  
500 505 510

Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
515 520 525

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala  
530 535 540

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr  
545 550 555 560 565

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
565 570 575

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
580 585 590

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

595

600

605

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 610 615 620

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp  
 625 630 635 640

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
 645 650 655

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 660 665 670

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp  
 675 680 685

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly  
 690 695 700

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
 705 710 715 720

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
 725 730

<210> 276

<211> 273

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Четвертая полипептидная цепь DART F

<400> 276

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu  
165 170 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp  
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu  
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly  
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala  
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys  
260 265 270

Glu

<210> 277  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Первая полипептидная цепь DART G

<400> 277

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala



260

265

270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Ala Lys Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly

<210> 278

<211> 219

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая и пятая полипептидные цепи DART G

<400> 278

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 279

<211> 732

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Третья полипептидная цепь DART G

<400> 279

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala





260

265

270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu  
 450 455 460

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr  
 465 470 475 480

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe  
 485 490 495

Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 500 505 510

His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly



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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
130 135 140

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu  
165 170 175

Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp  
180 185 190

Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu  
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro  
210 215 220

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu  
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
260 265 270

<210> 281  
<211> 503  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Первая полипептидная цепь DART H

<400> 281

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu  
165 170 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp  
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu

195

200

205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr  
 210 215 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly  
 225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala  
 245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu  
 260 265 270

Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 275 280 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

450

455

460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
500

<210> 282  
<211> 273  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вторая полипептидная цепь DART H

<400> 282

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly  
115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala  
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala  
145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser  
165 170 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val  
180 185 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser  
210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly  
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala  
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys  
260 265 270

Glu

<210> 283  
<211> 227  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Третья полипептидная цепь DART H

<400> 283

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85

90

95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

Pro Gly Lys  
 225

<210> 284  
 <211> 563  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Первая и третья полипептидные цепи DART 1

<400> 284

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

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



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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
115 120 125

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe  
130 135 140

Ser Asn Ser Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
145 150 155 160

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala  
165 170 175

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
180 185 190

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
245 250 255

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
260 265 270

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
275 280 285

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
290 295 300

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
305 310 315 320

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser  
325 330 335

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala  
340 345 350

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
355 360 365

Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
370 375 380

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
385 390 395 400

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
405 410 415

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
420 425 430

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
435 440 445

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
450 455 460

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
465 470 475 480

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
485 490 495

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
500 505 510

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
515 520 525

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
530 535 540

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
545 550 555 560

Ser Pro Gly

<210> 285  
<211> 348  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая и четвертая полипептидные цепи DART 1

<400> 285

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys  
115 120 125

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe  
130 135 140

Ser Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro  
165 170 175

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
180 185 190

Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
195 200 205

Tyr Cys Ala Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro

210

215

220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser  
225 230 235 240

Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
245 250 255

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
260 265 270

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
275 280 285

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
290 295 300

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
305 310 315 320

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
325 330 335

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
340 345

<210> 286

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая полипептидная цепь BSAB A

<400> 286

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Lys  
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Glu Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Glu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

<210> 287

<211> 218

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая полипептидная цепь BSAB A

<400> 287

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 288

<211> 449

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Третья полипептидная цепь BSAB A

<400> 288

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

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

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

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

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Arg  
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly  
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350



Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly

<210> 289

<211> 219

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Четвертая полипептидная цепь BSAB A

<400> 289

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 290

<211> 496

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая и третья полипептидные цепи DART I

<400> 290

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
 100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe  
 130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp  
 165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
 180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp  
 210 215 220

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly  
 225 230 235 240

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
 245 250 255

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Ser Lys Tyr  
 260 265 270

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
 275 280 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr  
 290 295 300

Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
 305 310 315 320

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 325 330 335

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 340 345 350

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
355 360 365

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
370 375 380

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
385 390 395 400

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys  
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
485 490 495

<210> 291

<211> 271

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая и четвертая полипептидные цепи DART I

<400> 291

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

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



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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
 100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe  
 130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp  
 165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
 180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp  
 210 215 220

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser Gly  
 225 230 235 240

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 245 250 255

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 260 265 270

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
275 280 285

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
290 295 300

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
305 310 315 320

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
325 330 335

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
340 345 350

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
355 360 365

Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
370 375 380

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
385 390 400

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
405 410 415

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
420 425 430

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
435 440 445

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
450 455 460

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
465 470 475 480

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
485 490 495

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
500 505 510

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
515 520 525

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
530 535 540

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
545 550 555 560

Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
565

<210> 293

<211> 350

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая и четвертая полипептидные цепи DART J

<400> 293

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro  
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val



165

170

175

Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp  
180 185 190

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp  
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe  
210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
245 250 255

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
260 265 270

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
275 280 285

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
290 295 300

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
305 310 315 320

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
325 330 335

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
340 345 350

<210> 294

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Домен VH из VH1 MAT к LAG-3 человека 6

<400> 294

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 295  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Домен VH из VH2 МАТ к LAG-3 человека 6

<400> 295

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser

<210> 296  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Домен VL из VL1 МАТ к LAG-3 человека 6  
 <400> 296

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

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

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

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

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

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

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

<210> 297  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Домен VL из VL2 МАТ к LAG-3 человека 6  
 <400> 297

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 298

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL1 домена VL из VL1 и VL2 MAT к LAG-3 человека 6

<400> 298

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala  
1 5 10

## Формула изобретения

1. Молекула, направленная против PD-1 человека, которая содержит переменный домен тяжелой цепи (H) и переменный домен легкой цепи (L), причем:

указанный переменный домен тяжелой цепи содержит домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub>, и указанный переменный домен легкой цепи содержит домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub>, при этом:

(A) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи МАТ к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: ID NO: 73; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи МАТ к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: ID NO: 78;

или

(B) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи МАТ 2 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: ID NO: 87; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи МАТ 2 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92;

или

(C) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи МАТ 3 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: ID NO: 101; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи МАТ 3 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105 и SEQ ID NO: 106;

или

(D) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи МАТ 4 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110 и SEQ ID NO: ID NO: 111; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи МАТ 4 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115 и SEQ ID NO: 116;

или

(E) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 5 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: ID NO: 121; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 5 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125 и SEQ ID NO: 126;

или

(F) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 6 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: ID NO: 131; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 6 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135 и SEQ ID NO: 136;

или

(G) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 7 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 и SEQ ID NO: ID NO: 141; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 7 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145 и SEQ ID NO: 146;

или

(H) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 8 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 и SEQ ID NO: ID NO: 163; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 8 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167 и SEQ ID NO: 168;

или

(I) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 9 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172 и SEQ ID NO: ID NO: 173; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 9 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177 и SEQ ID NO: 178;

или

(J) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 10 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193 и SEQ ID NO: ID NO: 194; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 10 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198 и SEQ ID NO: 199;

или

(K) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 11 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: ID NO: 204; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 11 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 209;

или

(L) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 12 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213 и SEQ ID NO: ID NO: 214; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 12 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219

или

(M) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 13 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: ID NO: 224; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 13 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228 и SEQ ID NO: 229;

или

(N) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 14 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233 и SEQ ID NO: ID NO: 234; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 14 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238 и SEQ ID NO: 239;

или

(O) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT 15 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 и SEQ ID NO: ID NO: 244; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT 15 к PD-1 и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248 и SEQ ID NO: 249;

или

(P) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT к чPD-1 7(1.2) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, и SEQ ID NO: 141; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT к чPD-1 7(1.2) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 145 и SEQ ID NO: 146;

или

(Q) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT к чPD-1 7(1.3) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, и SEQ ID NO: 141; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT к чPD-1 7(1.3) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 145;

или

(R) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> представляют собой домены CDR тяжелой цепи MAT к чPD-1 9(2.2) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 172, и SEQ ID NO: 173; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> представляют собой домены CDR легкой цепи MAT к чPD-1 9(2.2) и, соответственно, содержат аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189 и SEQ ID NO: 178.

2. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 1, представляющая собой антитело.

3. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 2, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело.



4. Молекула, направленная против PD-1 человека, по любому из пп. 1-3, характеризующийся тем, что указанная молекула содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 181 или SEQ ID NO: 250.
5. Молекула, направленная против PD-1 человека, по любому из пп. 1, 3 или 4, характеризующаяся тем, что указанная молекула содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 186 или SEQ ID NO: 251.
6. Молекула, направленная против PD-1 человека, по любому из пп. 1-5, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой биспецифическую связывающую молекулу, способную одновременно связываться с PD-1 человека и со вторым эпитопом.
7. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 6, характеризующаяся тем, что указанный второй эпитоп представляет собой эпитоп молекулы, участвующей в регулировании контрольной точки иммунного ответа, присутствующей на поверхности иммунной клетки.
8. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 6, характеризующаяся тем, что указанный второй эпитоп представляет собой эпитоп B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, галектина-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, ГКГС класса I или II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 или VISTA.
9. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 8, характеризующаяся тем, что указанный второй эпитоп представляет собой эпитоп CD137, CTLA-4, LAG-3, OX40, TIGIT или TIM-3.

10. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 9, содержащая эпитопсвязывающий сайт LAG-3, причем указанный эпитопсвязывающий сайт LAG-3 содержит:

(A) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> переменного домена тяжелой цепи MAT к LAG-3 1, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, соответственно; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и CDR<sub>L3</sub> переменного домена легкой цепи MAT к LAG-3 1, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно;

или

(B) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> переменного домена тяжелой цепи VH1 MAT к чLAG-3 1, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, соответственно; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> переменного домена легкой цепи MAT к LAG-3 1 VL4, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, соответственно;

или

(C) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> переменного домена тяжелой цепи MAT к LAG-3 6, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> переменного домена легкой цепи MAT к LAG-3 6, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63, соответственно;

или

(D) (1) домен CDR<sub>H1</sub>, домен CDR<sub>H2</sub> и домен CDR<sub>H3</sub> переменного домена тяжелой цепи VH1 MAT к чLAG-3 6, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно; и

(2) домен CDR<sub>L1</sub>, домен CDR<sub>L2</sub> и домен CDR<sub>L3</sub> переменного домена легкой цепи MAT к LAG-3 6, содержащие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63, соответственно.

11. Молекула, направленная против PD-1 человека, по любому из пп. 6-10, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой:

(A) диатело, причем указанное диатело представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит две или три, четыре или пять полипептидных цепей; или

(B) трехвалентную связывающую молекулу, причем указанная трехвалентная связывающая молекула представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит три, четыре или пять полипептидных цепей, или

(C) биспецифическое антитело.

12. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 11, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой диатело и содержит домен, связывающий альбумин (ABD).

13. Молекула, направленная против PD-1 человека, по любому из пп. 1-11, содержащая область Fc.

14. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 13, характеризующаяся тем, что указанная область Fc относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

15. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 14, дополнительно содержащая шарнирный домен.

16. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 15, характеризующаяся тем, что указанная область Fc и указанный шарнирный домен относятся к изотипу IgG4, и при этом указанный шарнирный домен содержит стабилизирующую мутацию.

17. Молекула, направленная против PD-1 человека, по любому из пп. 13-15, характеризующаяся тем, что указанная молекула представляет собой антитело, содержащее:

(a) SEQ ID NO: 264 и 265; или

(b) SEQ ID NO: 264 и 267.

18. Молекула, направленная против PD-1 человека, по любому из пп. 13-16, характеризующаяся тем, что указанная область Fc представляет собой вариант области Fc, который содержит:

(a) одну или более модификаций аминокислот, которые снижают аффинность варианта области Fc в отношении FcγR; и/или

(b) одну или более модификаций аминокислот, которые увеличивают период полувыведения из сыворотки крови варианта области Fc.

19. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 14, характеризующаяся тем, что указанные модификации, которые снижают аффинность варианта области Fc в отношении FcγR, содержат замену L234A; L235A; или L234A и L235A, при этом указанная нумерация соответствует индексу ЕС, как описано в Кабат.

20. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 14 или 15, характеризующаяся тем, что указанные модификации, которые увеличивают период полувыведения из сыворотки крови варианта области Fc, содержат замену M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E; или K288D и H435K, при этом указанная нумерация соответствует индексу ЕС, как описано в Кабат.

21. Молекула, направленная против PD-1 человека, по любому из пп. 11, 13-16 или 18-20, которая представляет собой диатело, содержащее:

(a) SEQ ID NO: 267, в которой X<sub>1</sub> представляет собой Ala; X<sub>2</sub> представляет собой Tug; X<sub>3</sub> представляет собой Thr; X<sub>4</sub> представляет собой Glu, и SEQ ID NO: 268; или

(b) SEQ ID NO: 267, в которой X<sub>1</sub> представляет собой Gly; X<sub>2</sub> представляет собой Tug; X<sub>3</sub> представляет собой Thr; X<sub>4</sub> представляет собой Glu, и SEQ ID NO: 268; или

(c) SEQ ID NO: 267, в которой X<sub>1</sub> представляет собой Gly; X<sub>2</sub> представляет собой Met; X<sub>3</sub> представляет собой Ser; X<sub>4</sub> представляет собой Thr, и SEQ ID NO: 268; или

(d) SEQ ID NO: 269 и 270; или

(e) SEQ ID NO: 271 и 272; или

(f) SEQ ID NO: 273, 274, 275 и 276; или

(g) SEQ ID NO: 277, 278, 279 и 280; или

(h) SEQ ID NO: 281, 282 и 283; или

(i) SEQ ID NO: 290 и 291; или

(j) SEQ ID NO: 292 и 293.

22. Молекула, направленная против PD-1 человека, по любому из пп. 1-21, характеризующаяся тем, что указанную молекулу применяют для стимуляции опосредуемого Т-клетками иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом.

23. Молекула, направленная против PD-1 человека, по любому из пп. 1-21, характеризующаяся тем, что указанную молекулу применяют в лечении заболевания или состояния, связанного с подавленной иммунной системой.

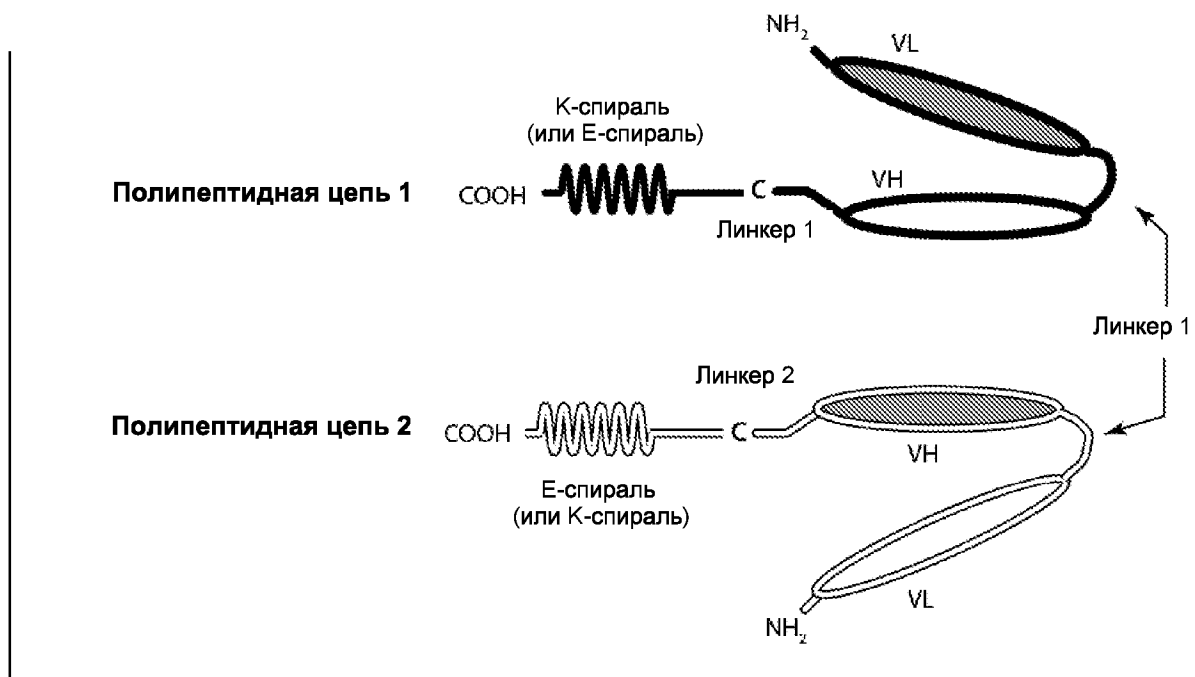
24. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 23, характеризующаяся тем, что указанное заболевание или состояние представляет собой рак или инфекцию.

25. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 24, характеризующаяся тем, что указанный рак характеризуется наличием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки: опухоли надпочечников, ассоциированного со СПИДом рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака мочевого пузыря, рака костей, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, рака молочной железы, опухолей сонной артерии, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной карциномы клеток почек, светлоклеточной карциномы, рака толстой кишки, колоректального рака, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, экстраклеточной миксоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или желчного протока, рака желудка, гестационного трофобластного заболевания, герминогенной опухоли, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли островковых клеток, саркомы Капоши, рака почек, лейкоза, липомы/доброкачественной липоматозной опухоли, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легких, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринных опухолей, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухоли парашитовидной железы, педиатрического рака, опухоли оболочек периферических нервов, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, постериальной увеальной меланомы, редкого гематологического расстройства, метастатического рака почек, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, карциномы тимуса, тимомы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки.

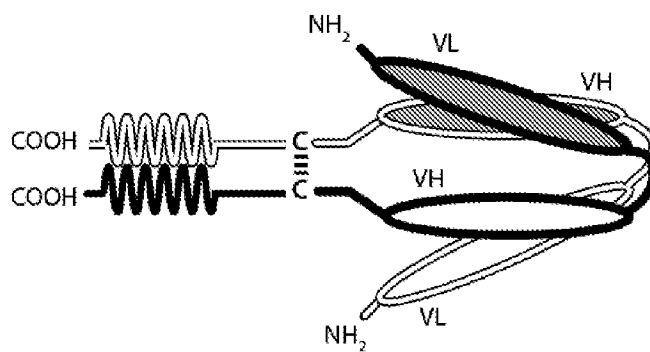
26. Молекула, направленная против PD-1 человека, по п. 25, характеризующаяся тем, что указанный рак представляет собой колоректальный рак, гепатоцеллюлярную карциному, глиому, рак почек, рак молочной железы, множественную миелому, рак мочевого пузыря, нейробластому; саркому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, острый

миелоидный лейкоз (AML), хронический миелолейкоз (CML), острый В-линейный лимфобластный лейкоз (B-ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лейкоз ворсистых клеток (HCL), бластную опухоль из плазмцитоподобных дендритных клеток (BPDCN), неходжкинские лимфомы (NHL), включая лейкоз мантийных клеток (MCL) и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), лимфому Ходжкина, системный мастоцитоз или лимфому Беркитта.

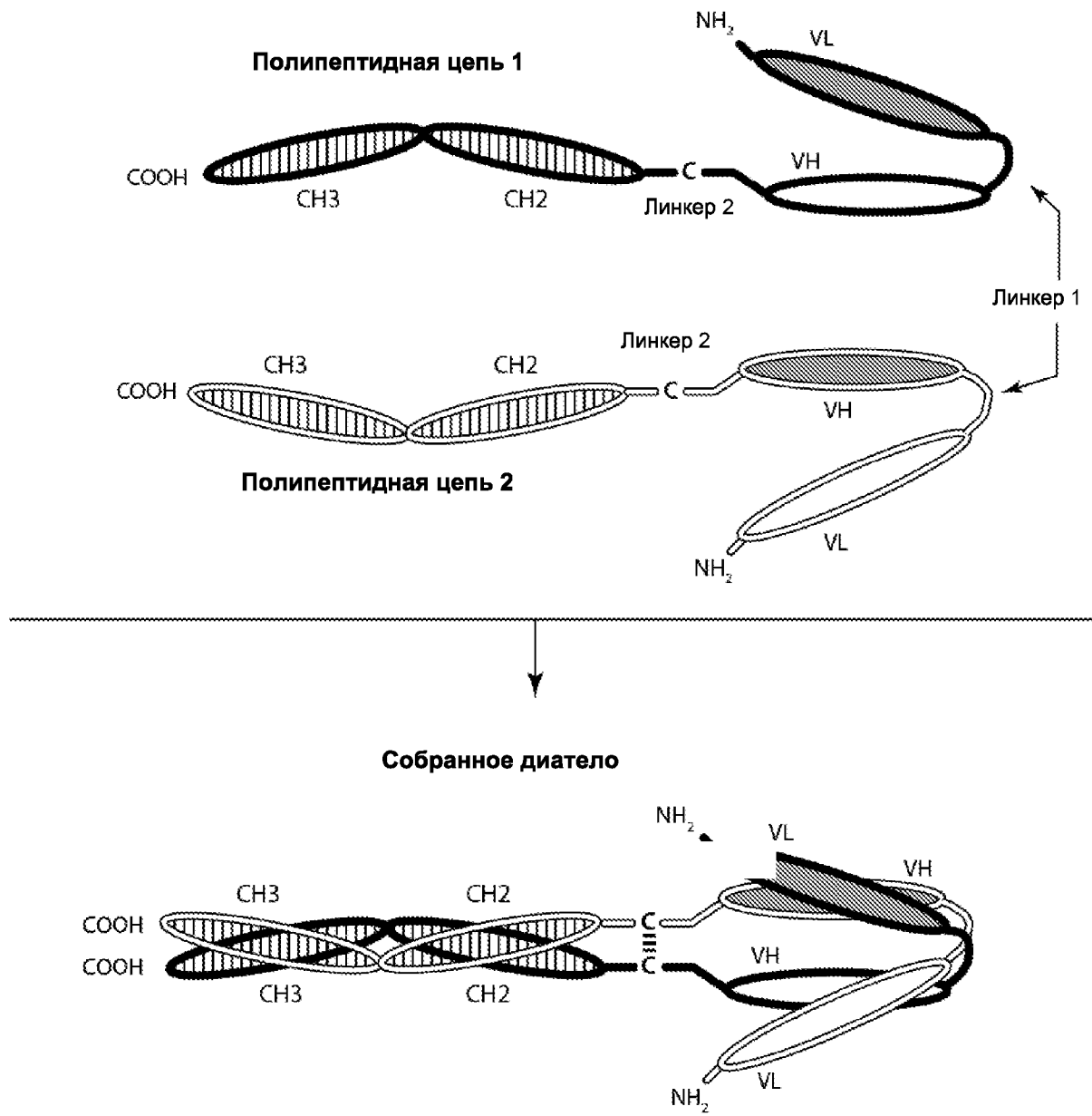
27. Молекула, направленная против PD-1 человека, по любому из пп. 1-21, характеризующаяся тем, что указанная молекула помечена детектируемой меткой и применяется для детектирования PD-1.



Собранное диатело

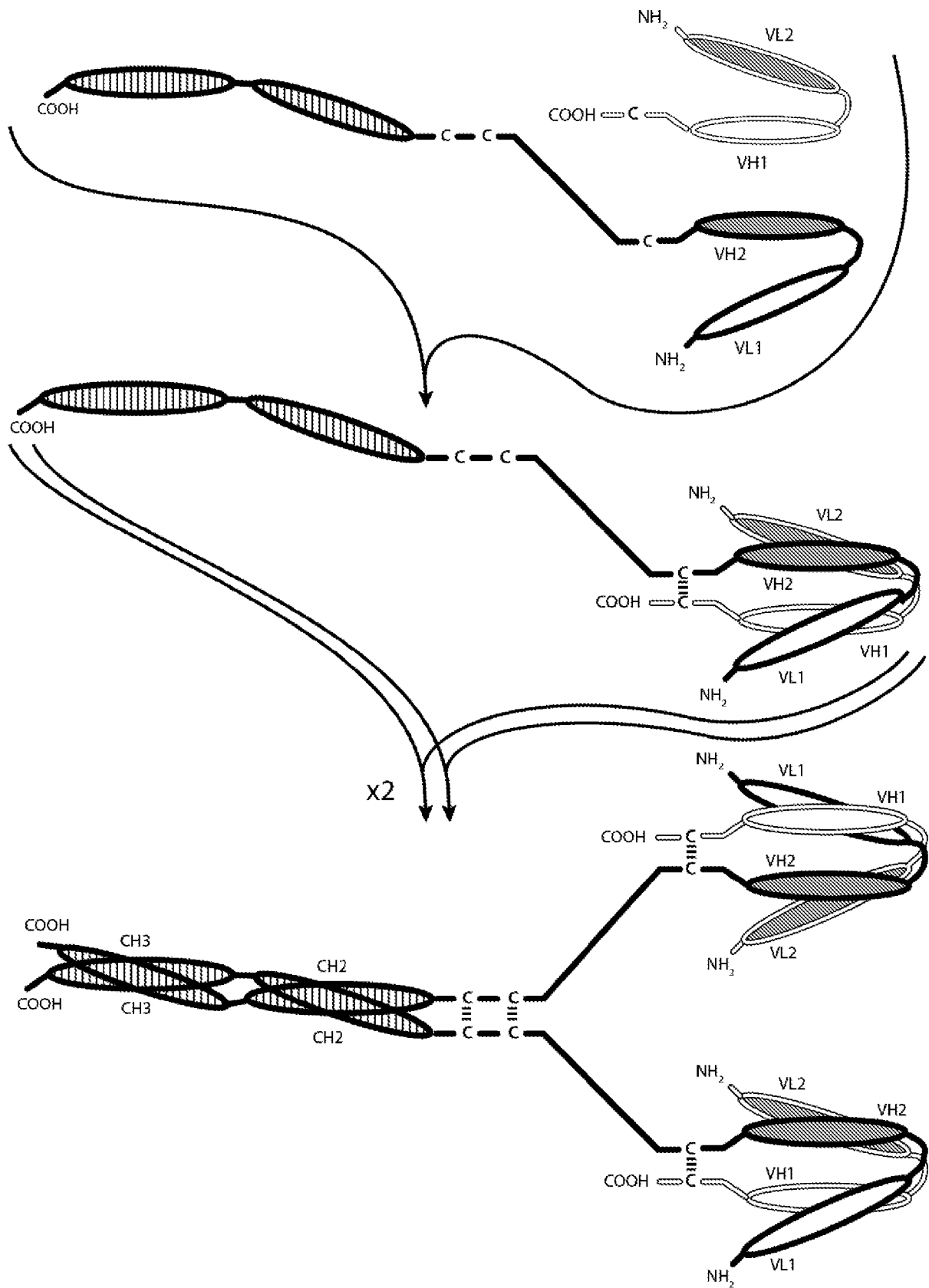


Фигура 1

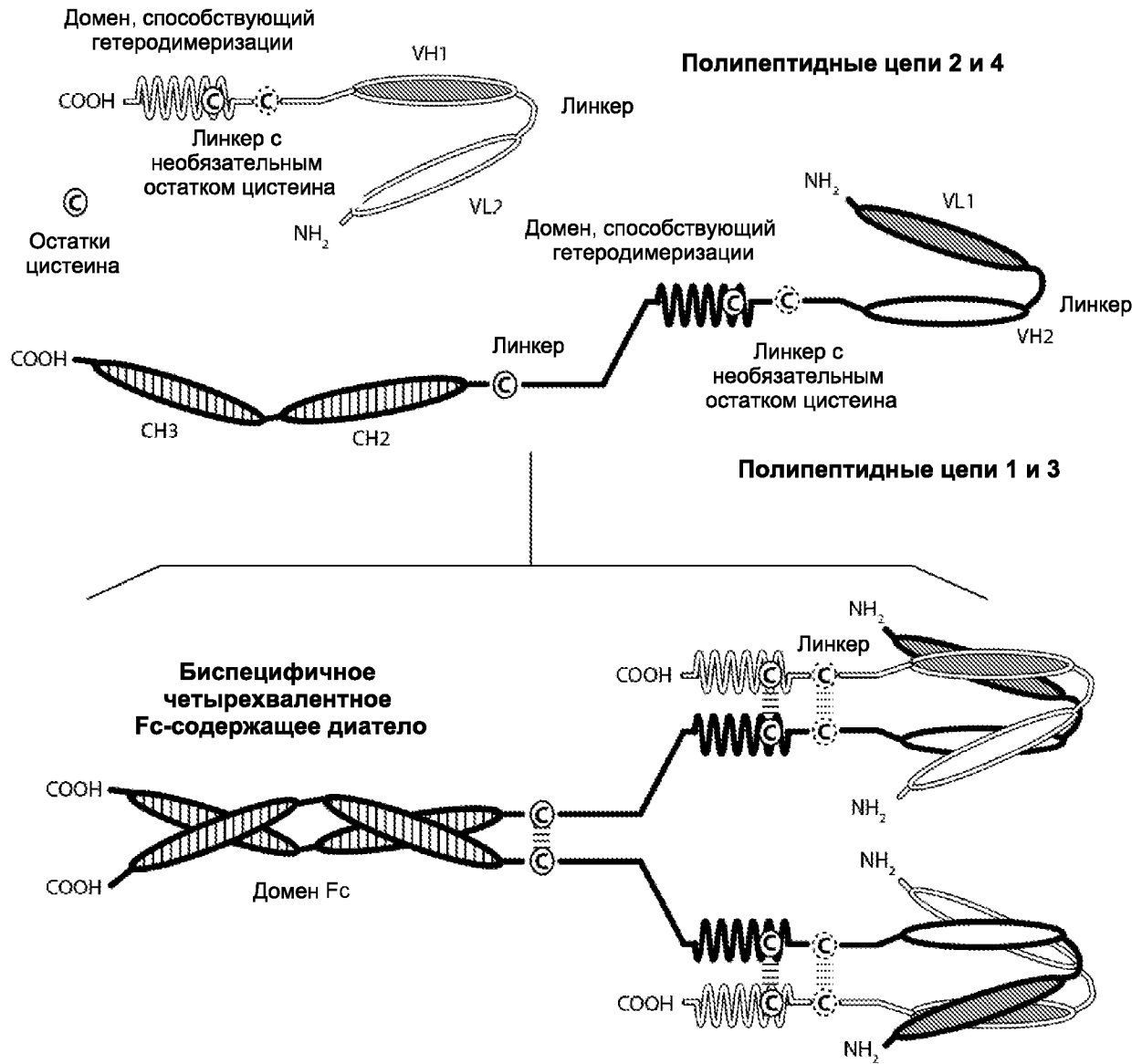


Фигура 2

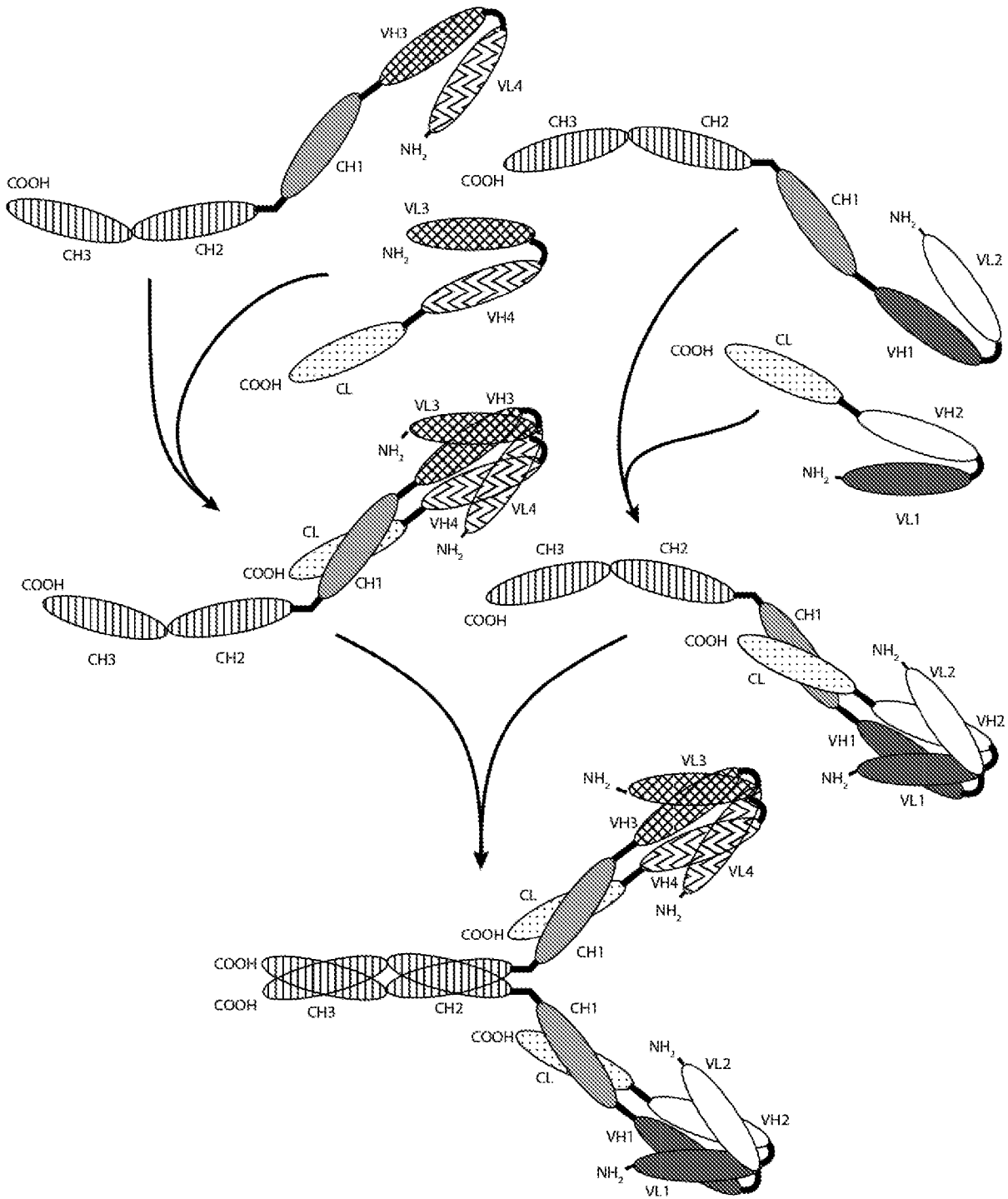




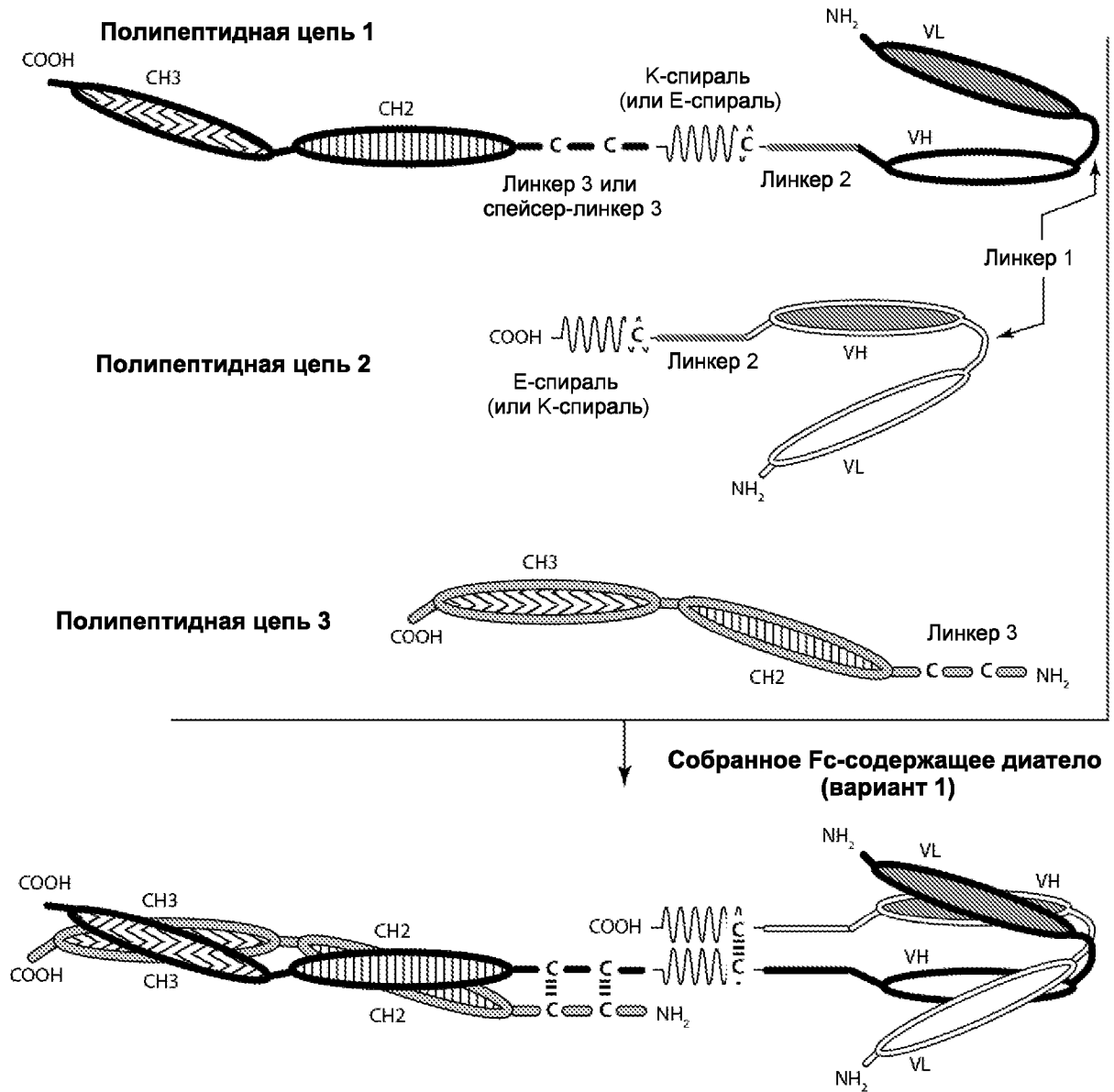
Фигура 3А



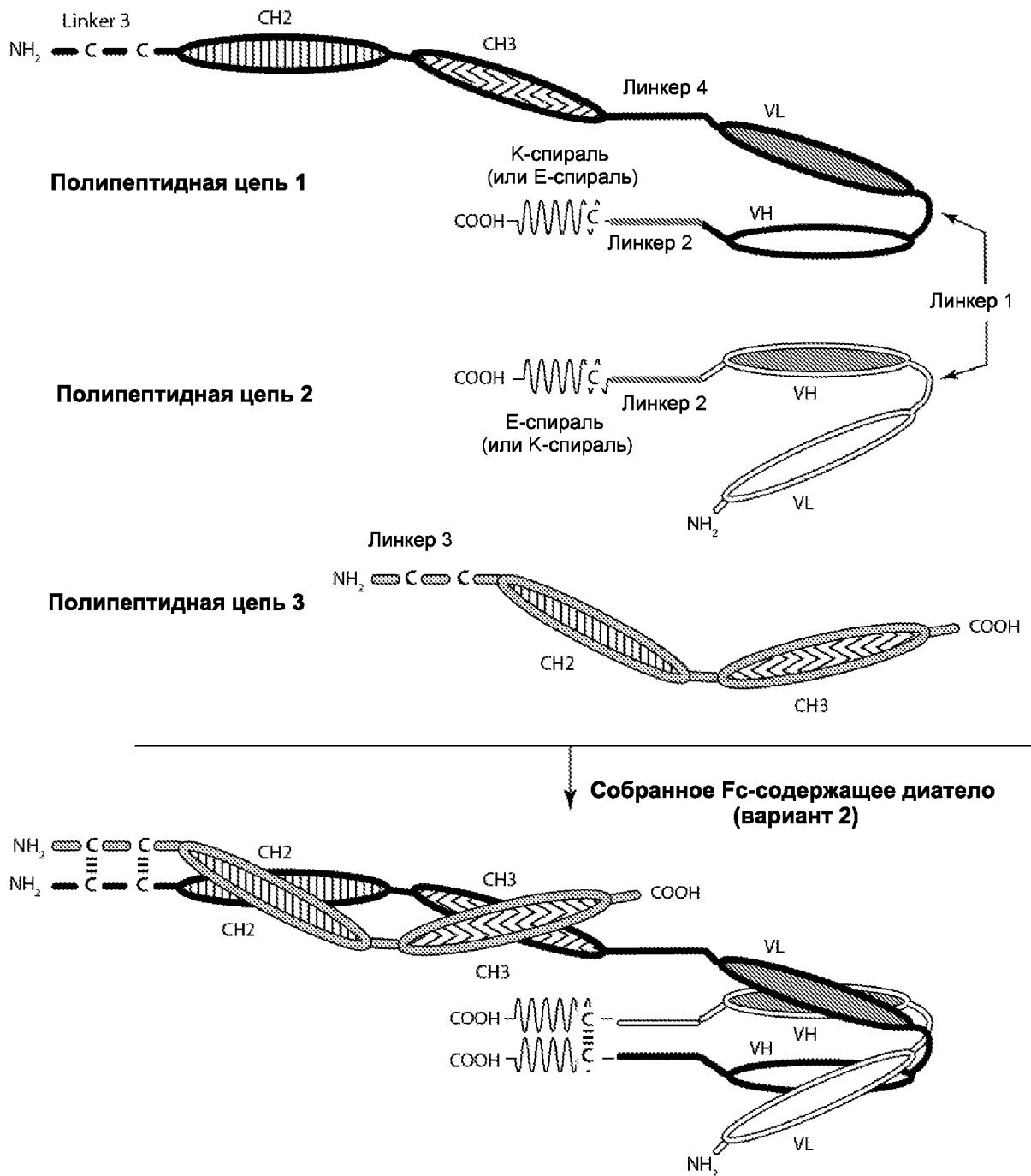
Фигура 3В



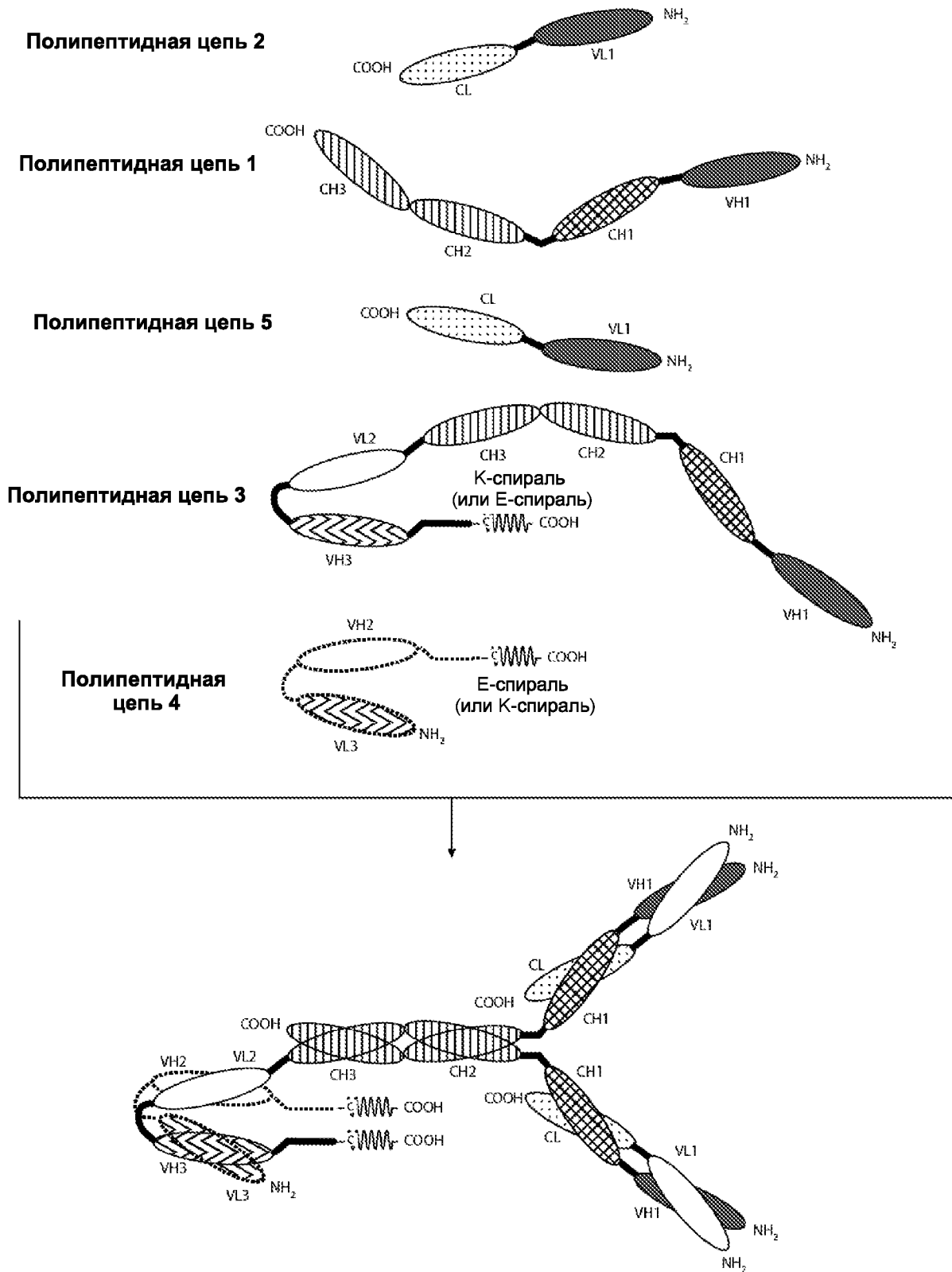
Фигура 3С



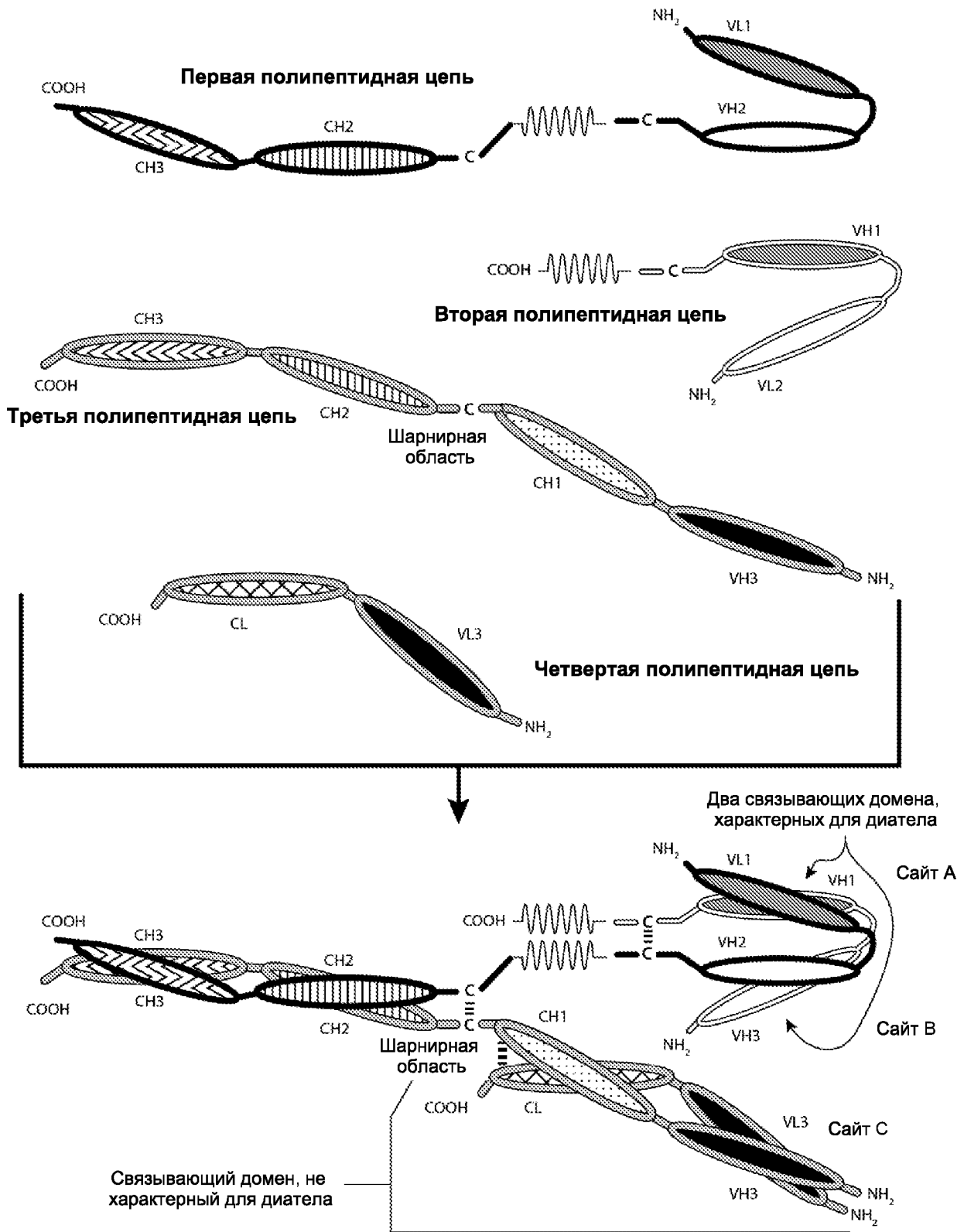
Фигура 4А



Фигура 4В



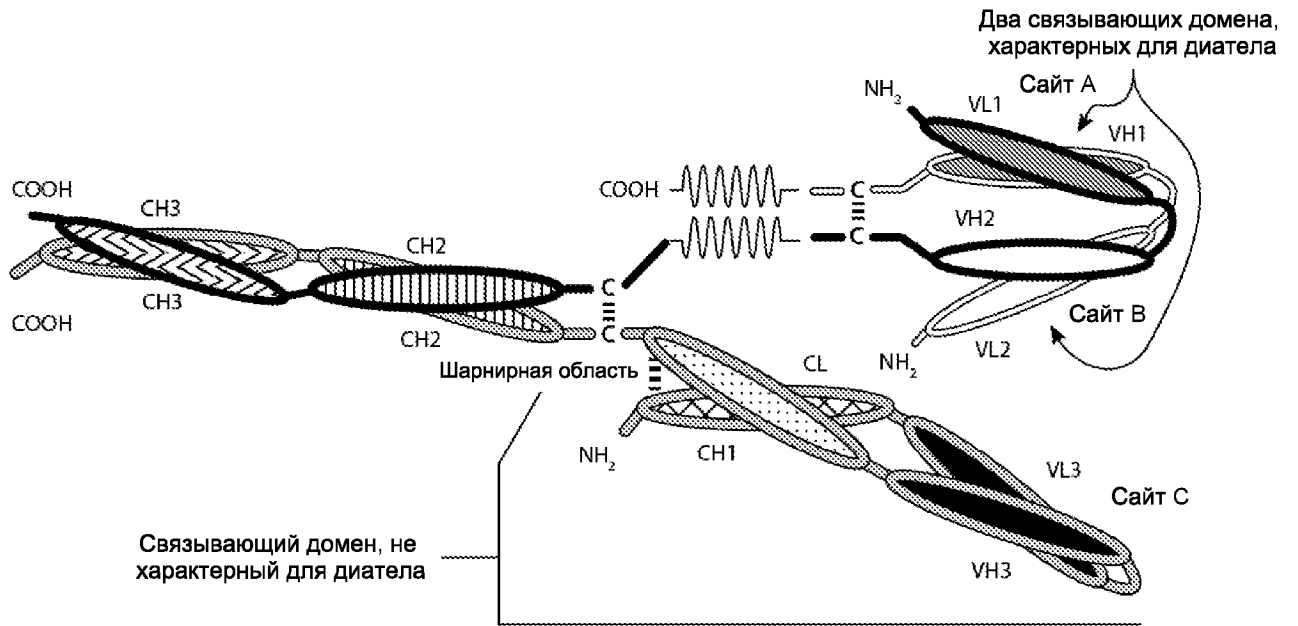
Фигура 5



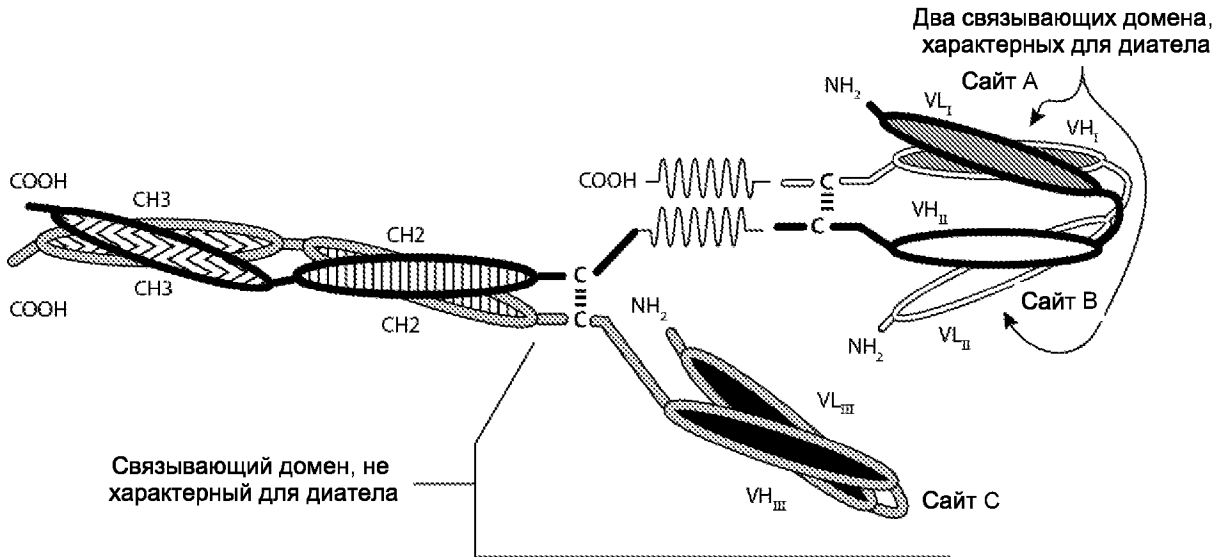
Фигура 6А



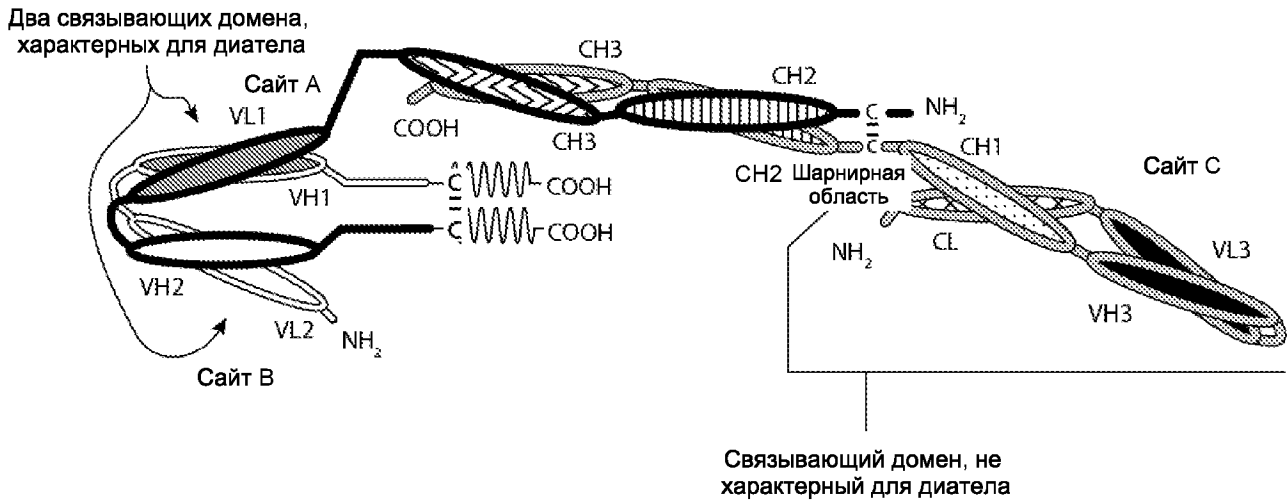




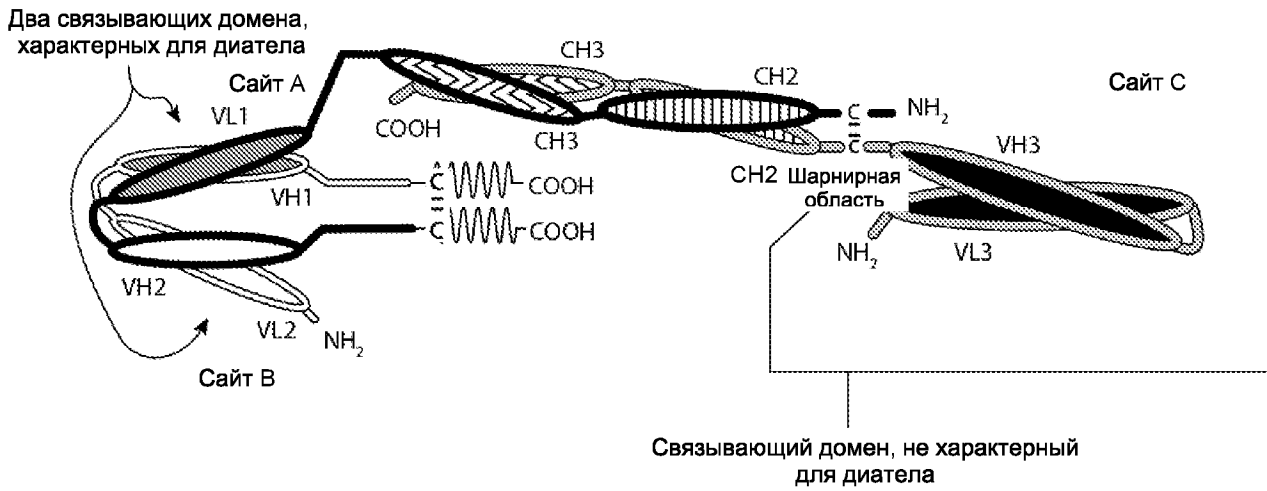
Фигура 6С



Фигура 6D

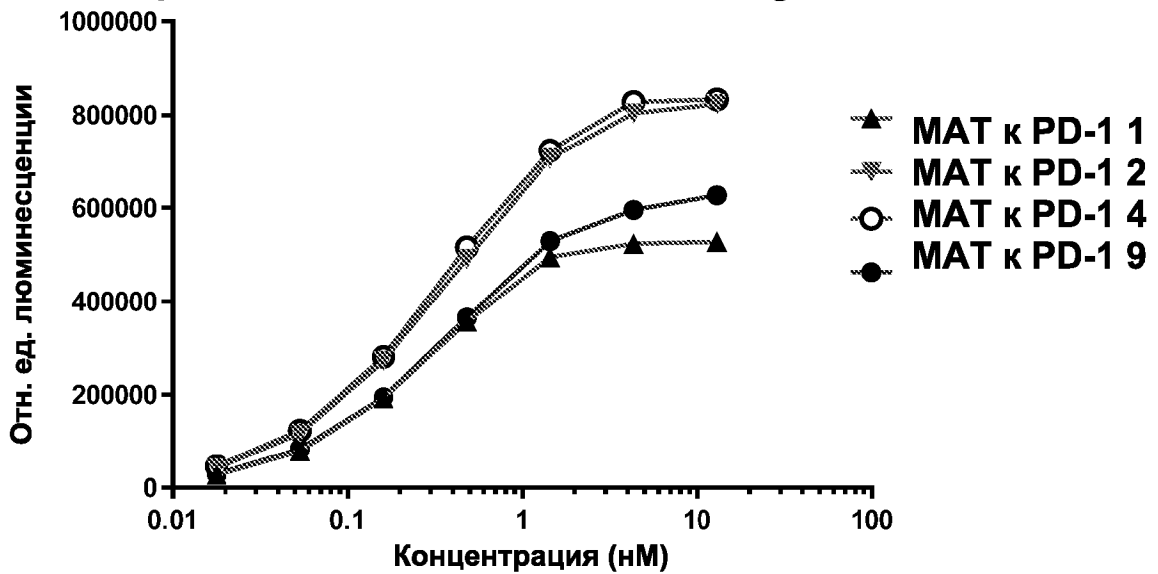


Фигура 6Е



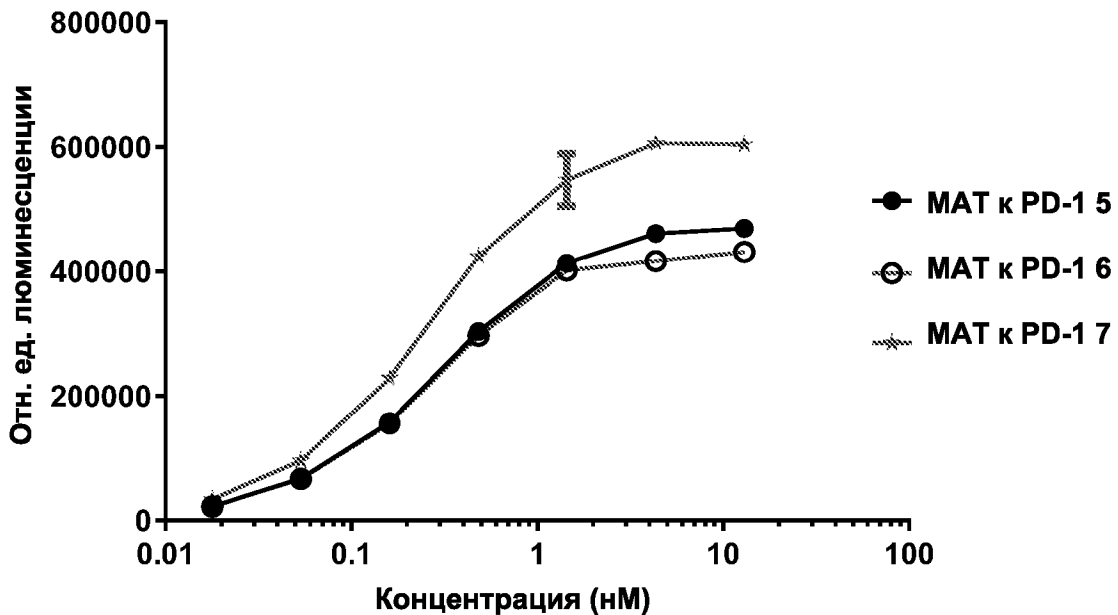
Фигура 6F

Покрывали shPD-1 His (1 мкг/мл) и детектировали конъюгированное с ПХ козьё антитело к IgG мыши Н + L



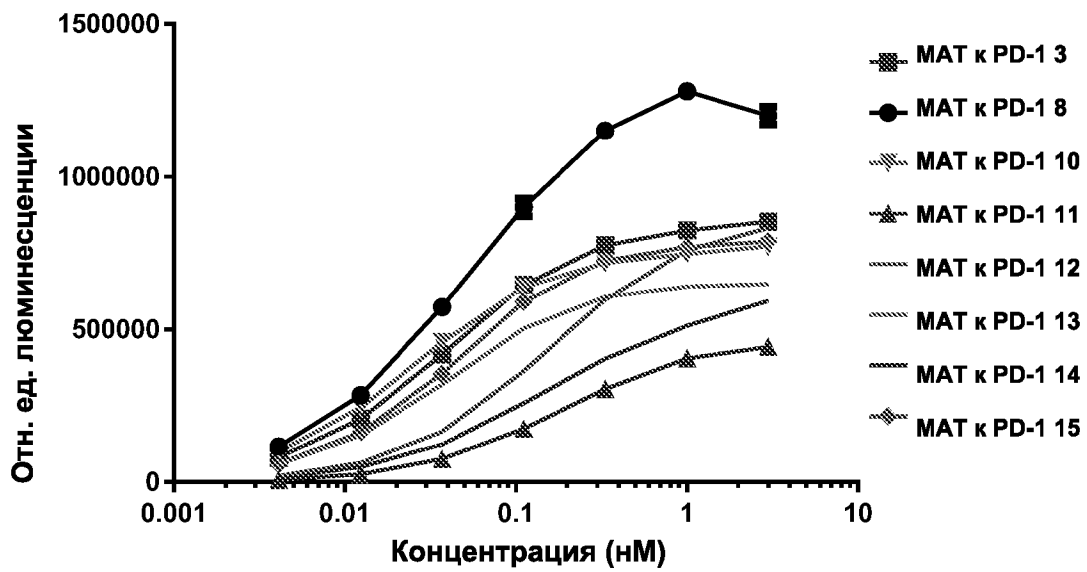
Фигура 7А

Покрывали shPD-1 His (0,5 мкг/мл) и детектировали конъюгированное с ПХ козьё антитело к IgG мыши Н + L



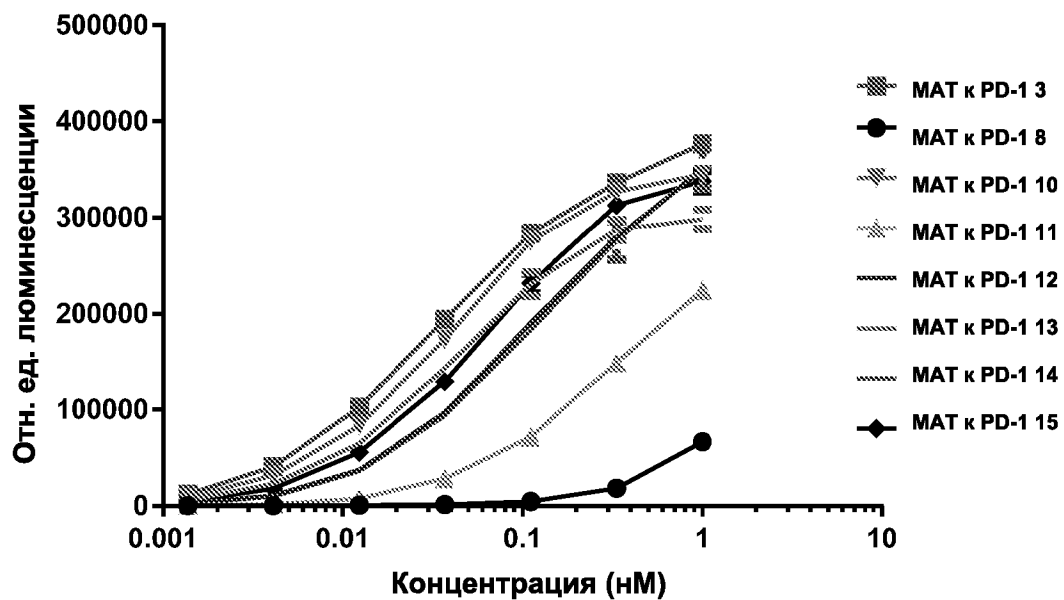
Фигура 7В

Покрывали shPD-1 His (0,5 мкг/мл) и детектировали козье антитело к IgG мыши (H + L)



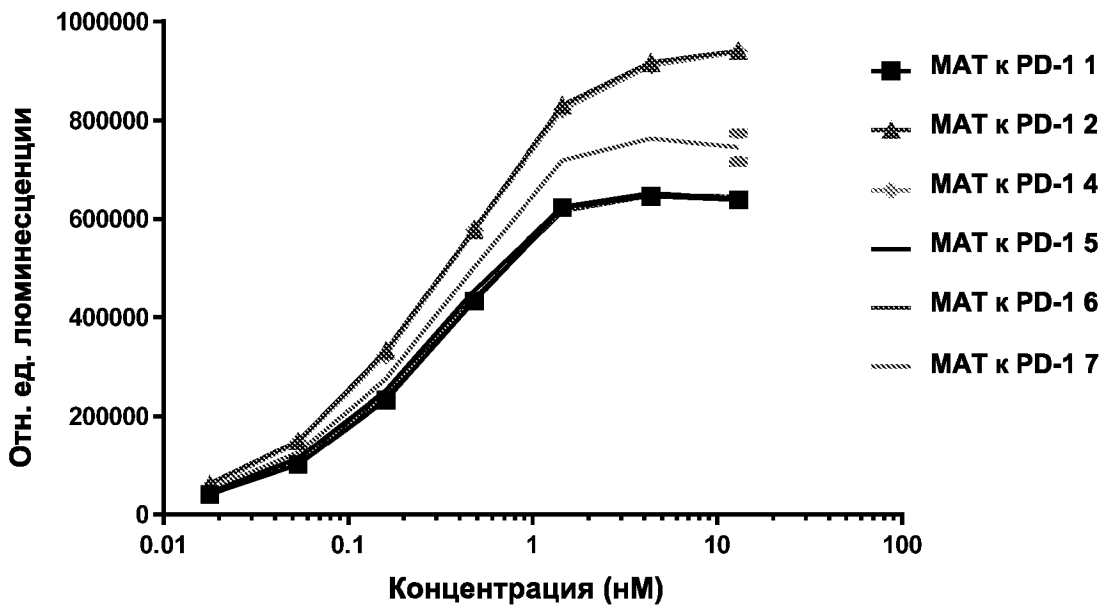
Фигура 7С

Покрывали shPD-1 hFc (0,5 мкг/мл) и детектировали козье антитело к IgG мыши (H + L)



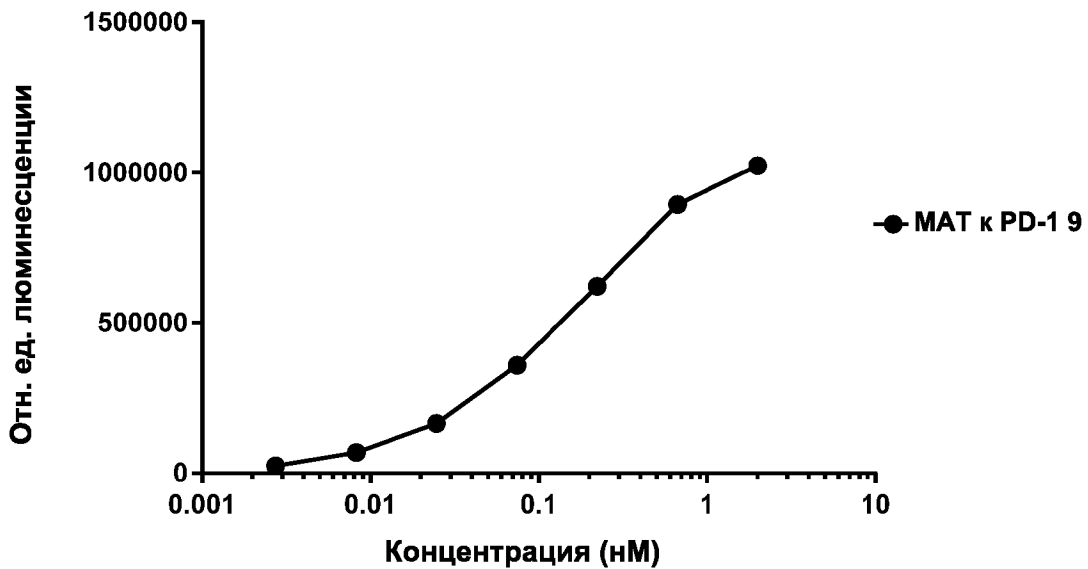
Фигура 7D

Покрывали *scupo*-PD-1-TEV-Fc (0,5 мкг/мл) и детектировали конъюгированное с ПХ козьё антитело к IgG мыши H + L



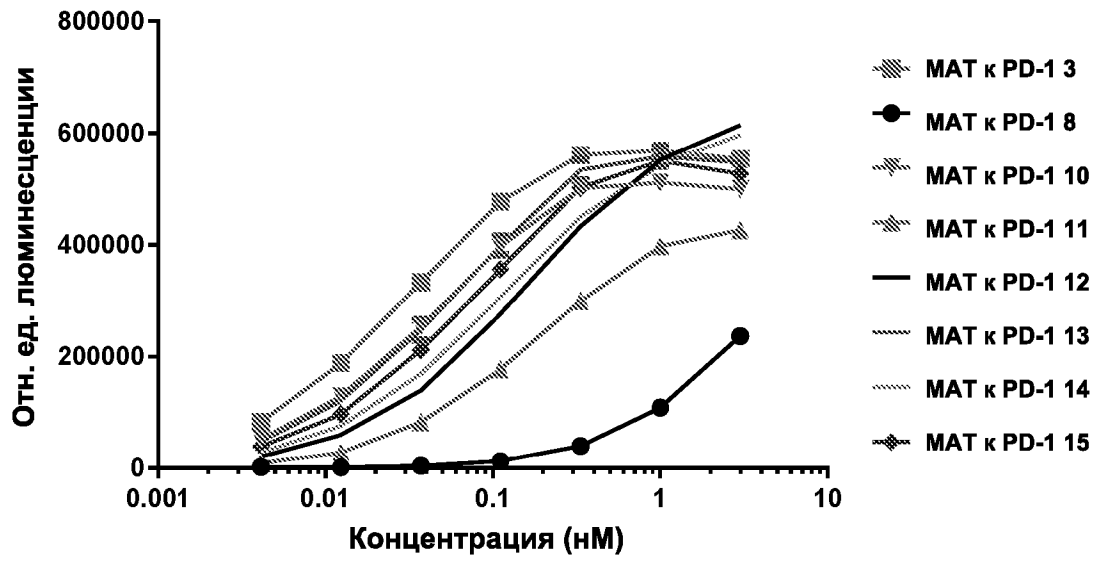
Фигура 8А

Покрывали *scupo*-PD-1-TEV-hFc (1 мкг/мл) и детектировали козьё антитело к IgG мыши H + L



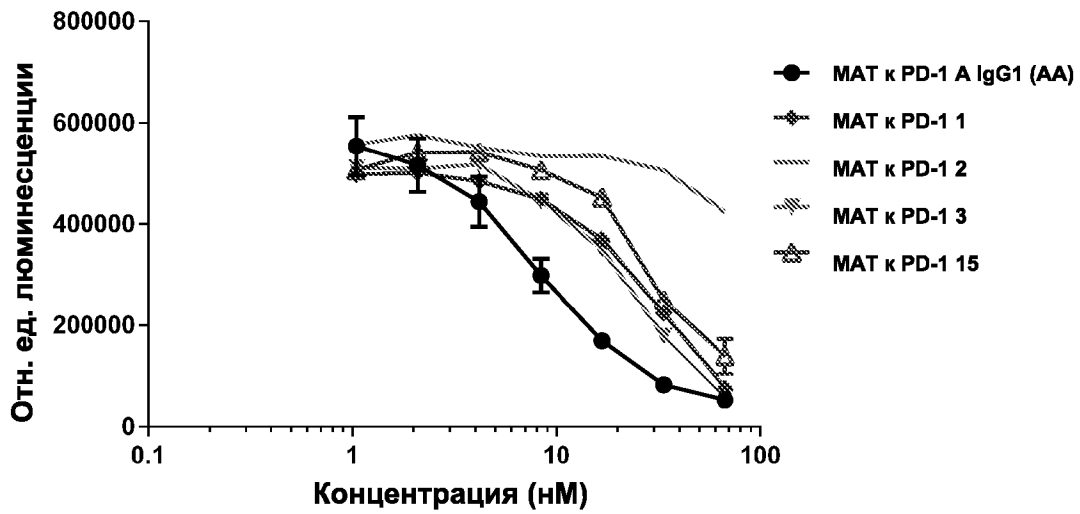
Фигура 8В

Покрывали *s*уно-PD-1-TEV-Fc (1 мкг/мл) и детектировали козье антитело к IgG мыши (H + L)



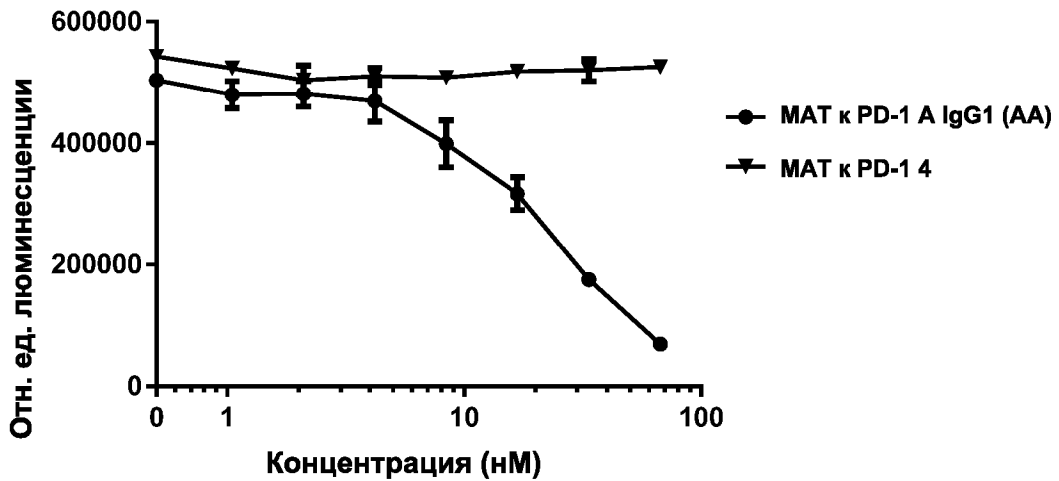
Фигура 8С

Захватывали PD-L1 Фс-биотин (1 мкг/мл) и детектировали shPD-1-His



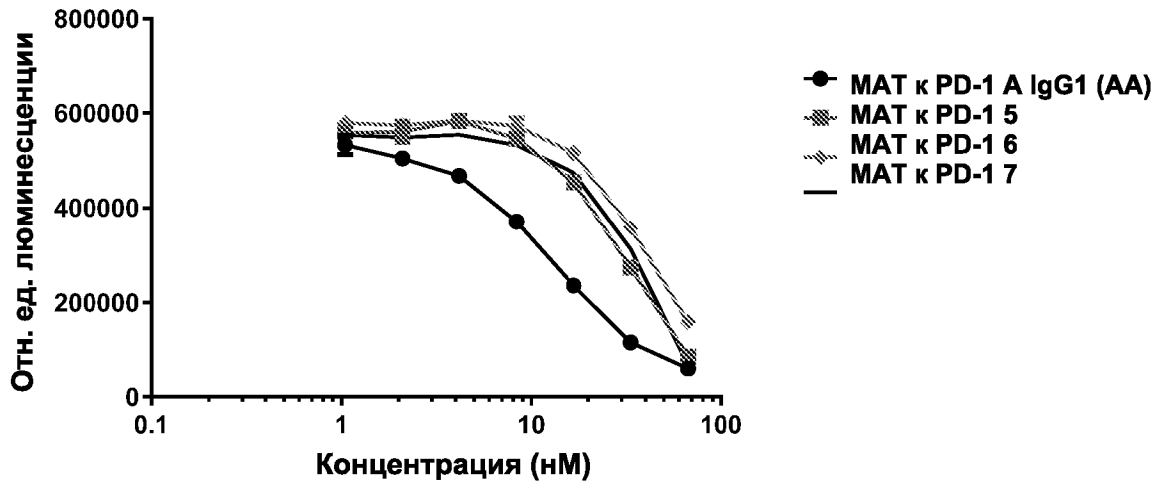
Фигура 9А

Захватывали PD-L1 Фс-биотин (1 мкг/мл) и детектировали shPD-1-His



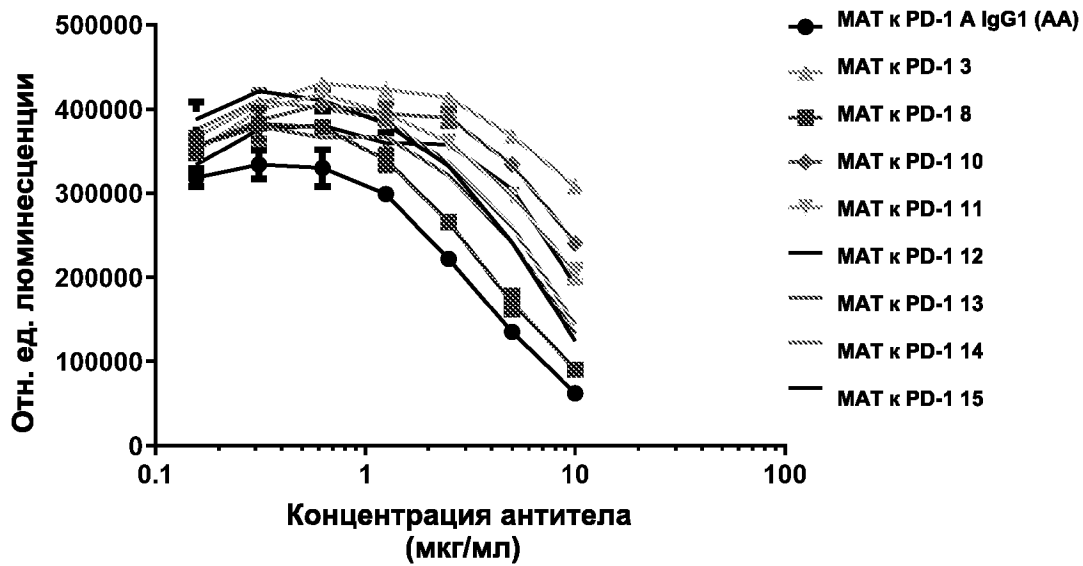
Фигура 9В

Захватывали PD-L1 Фс-биотин (1 мкг/мл) и детектировали shPD-1-His



Фигура 9С

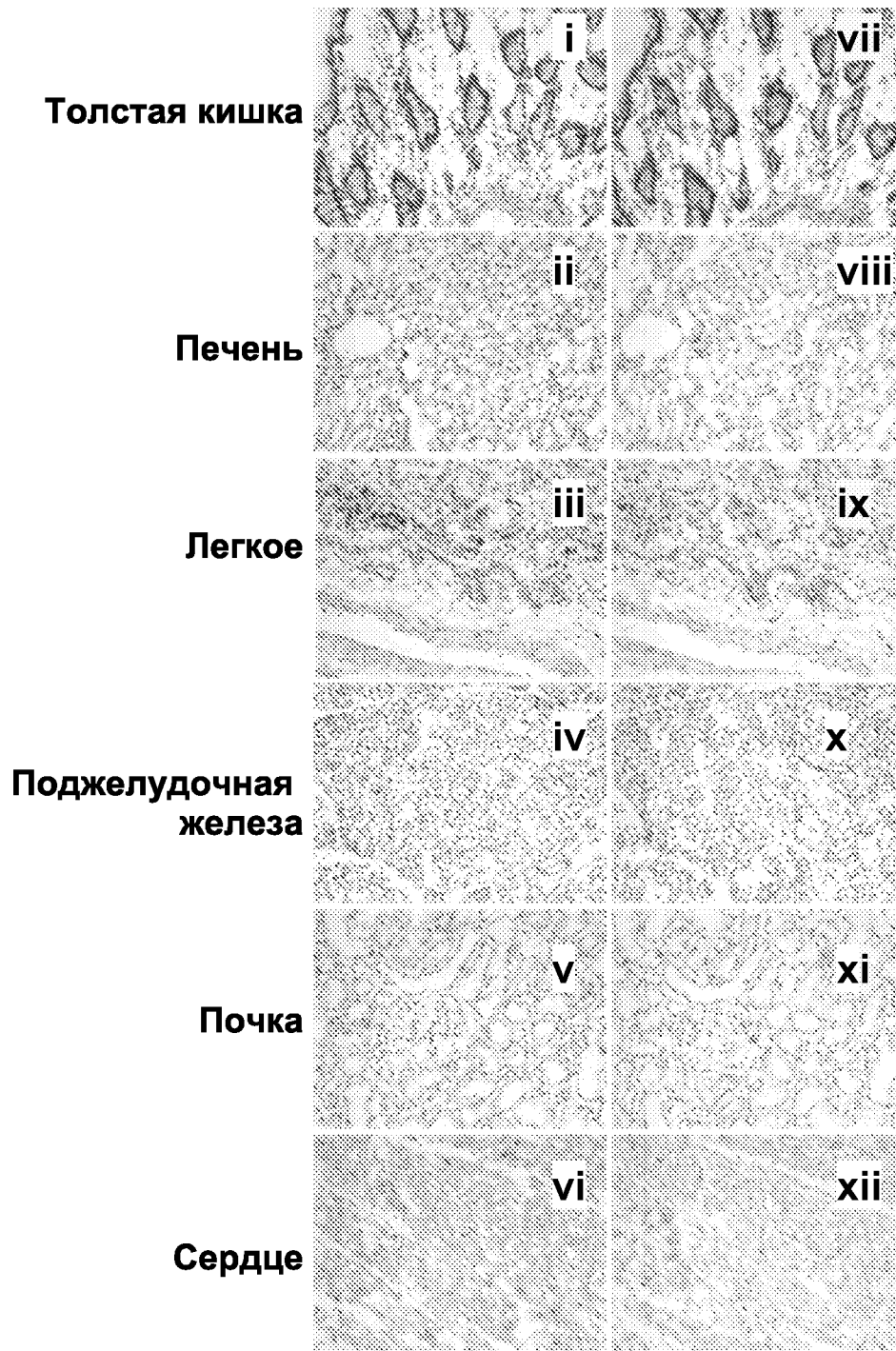
Захватывали PD-L1 Фс-биотин (1 мкг/мл) и детектировали shPD-1-His



Фигура 9D

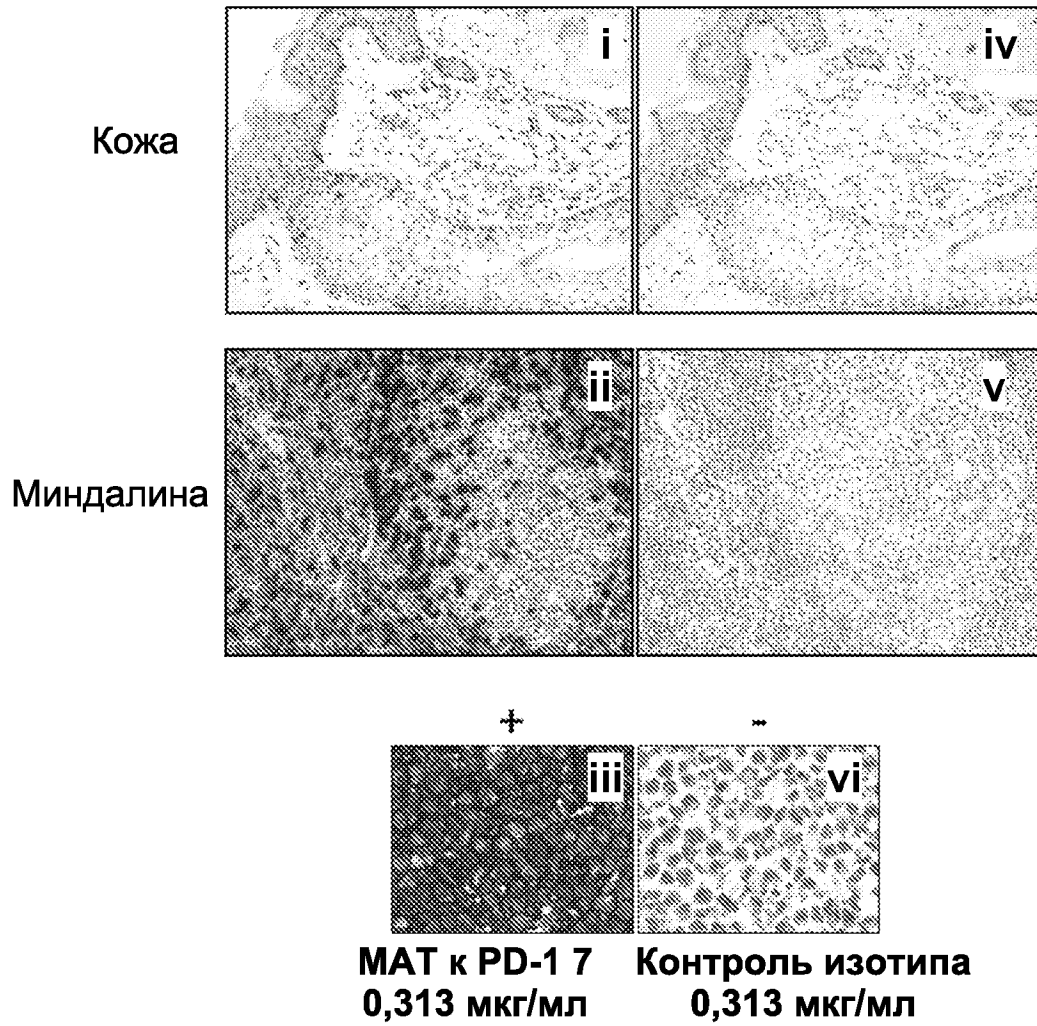


19/38  
Нормальная ткань



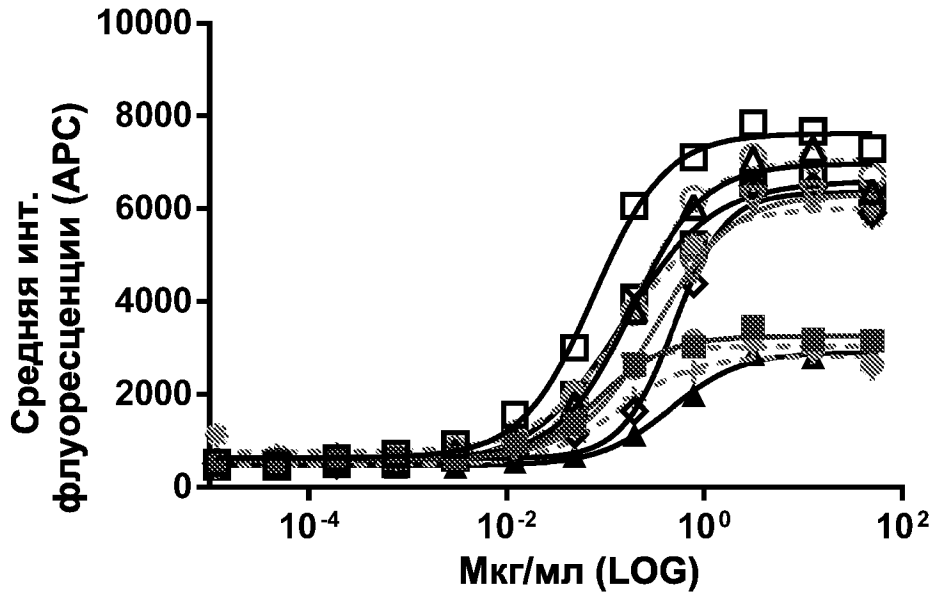
МАТ к PD-1 7      Контроль изотипа  
0,313 мкг/мл      0,313 мкг/мл

Фигура 10А



Фигура 10В

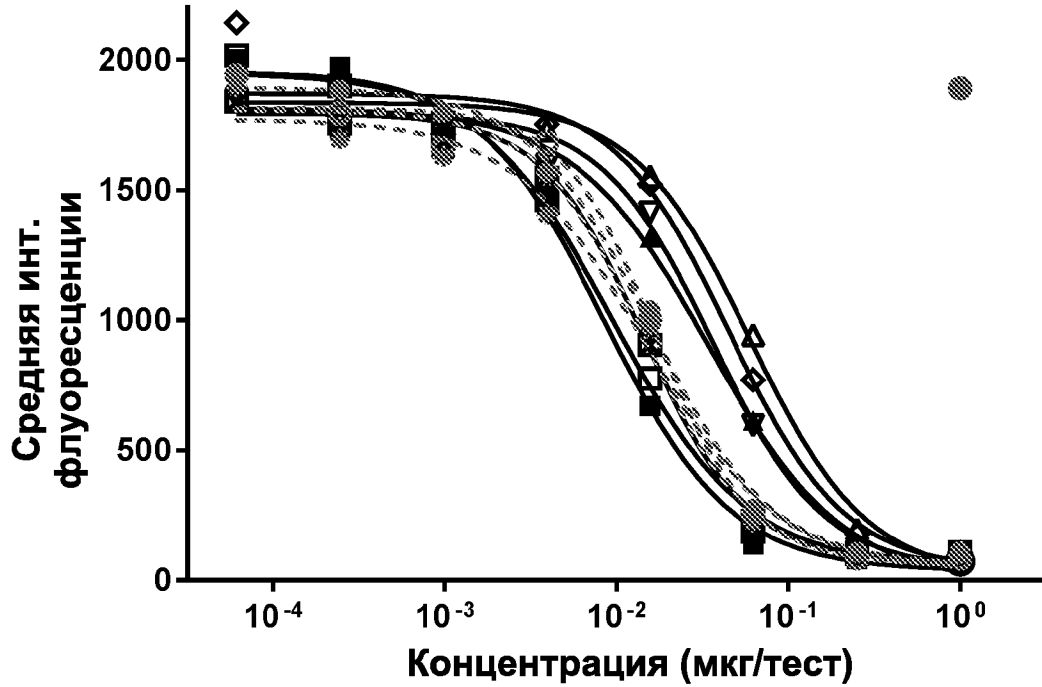
### Кривые насыщения (разведение 1:4)



- ◆ MAT к ЧPD-1 2 IgG1 (AA)
- MAT к ЧPD-1 7(1.1) IgG1 (AA)
- MAT к ЧPD-1 7(1.2) IgG1 (AA)
- MAT к ЧPD-1 7(1.2) IgG4 (P)
- ▲ MAT к ЧPD-1 9(1.1) IgG1 (AA)
- ▲ MAT к ЧPD-1 9(1.1) IgG4 (P)
- ◆ MAT к ЧPD-1 15 IgG1 (AA)
- ◆ MAT к PD-1 A IgG1 (AA)
- ◆ MAT к PD-1 A IgG4 (P)
- ◆ MAT к PD-1 B IgG1 (AA)
- ◆ MAT к PD-1 B IgG4 (P)

Фигура 11

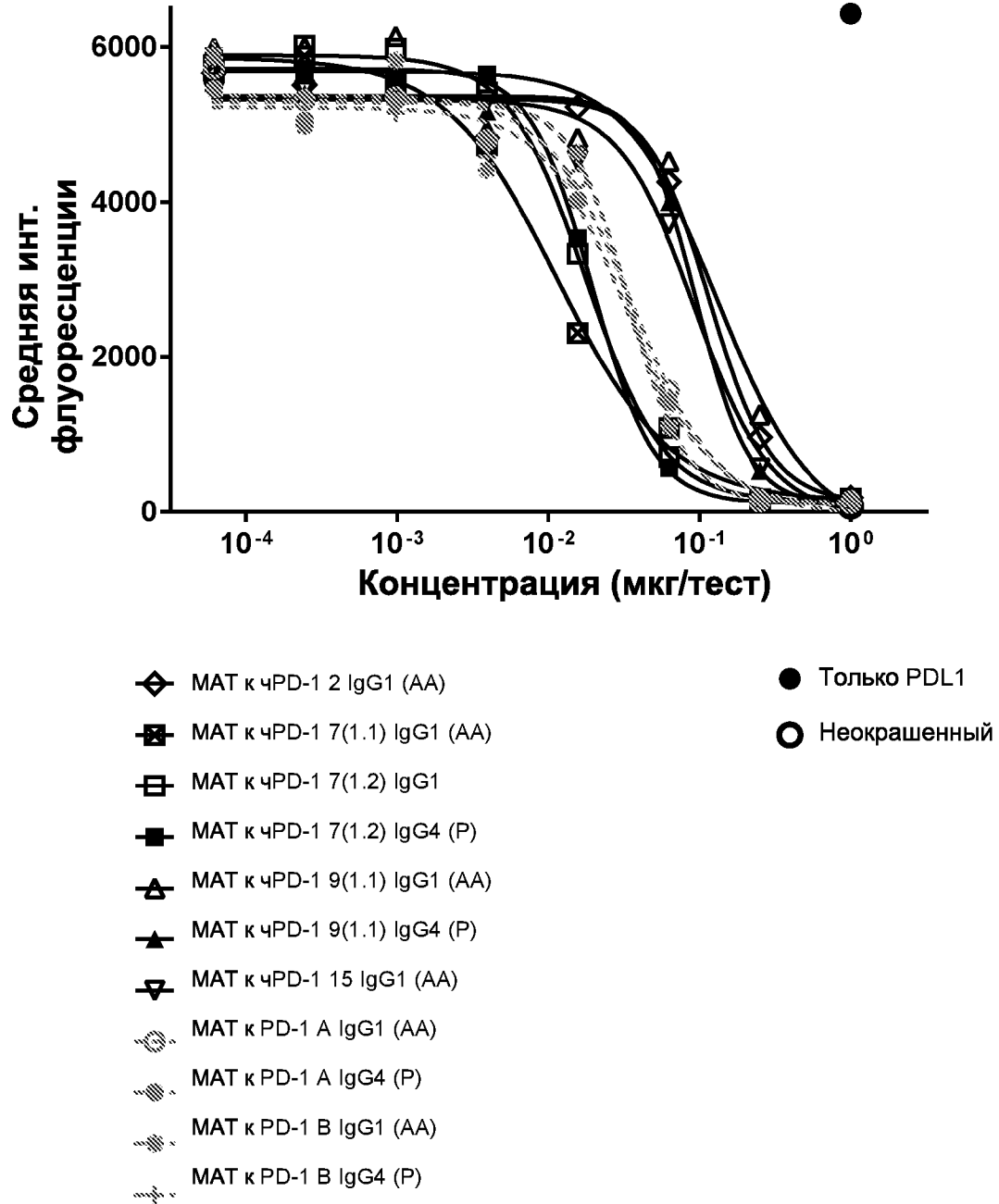
## Блокирование sPD-L1 (разведение 1:4)



- ◆ MAT к чPD-1 2 IgG1 (AA)
- MAT к чPD-1 7(1.1) IgG1 (AA)
- ▣ MAT к чPD-1 7(1.2) IgG1
- MAT к чPD-1 7(1.2) IgG4 (P)
- ▲ MAT к чPD-1 9(1.1) IgG1 (AA)
- ▲ MAT к чPD-1 9(1.1) IgG4 (P)
- ▽ MAT к чPD-1 15 IgG1 (AA)
- ⊙ MAT к PD-1 A IgG1 (AA)
- ⊙ MAT к PD-1 A IgG4 (P)
- ⊙ MAT к PD-1 B IgG1 (AA)
- ⊙ MAT к PD-1 B IgG4 (P)
- Только PDL1
- Неокрашенный

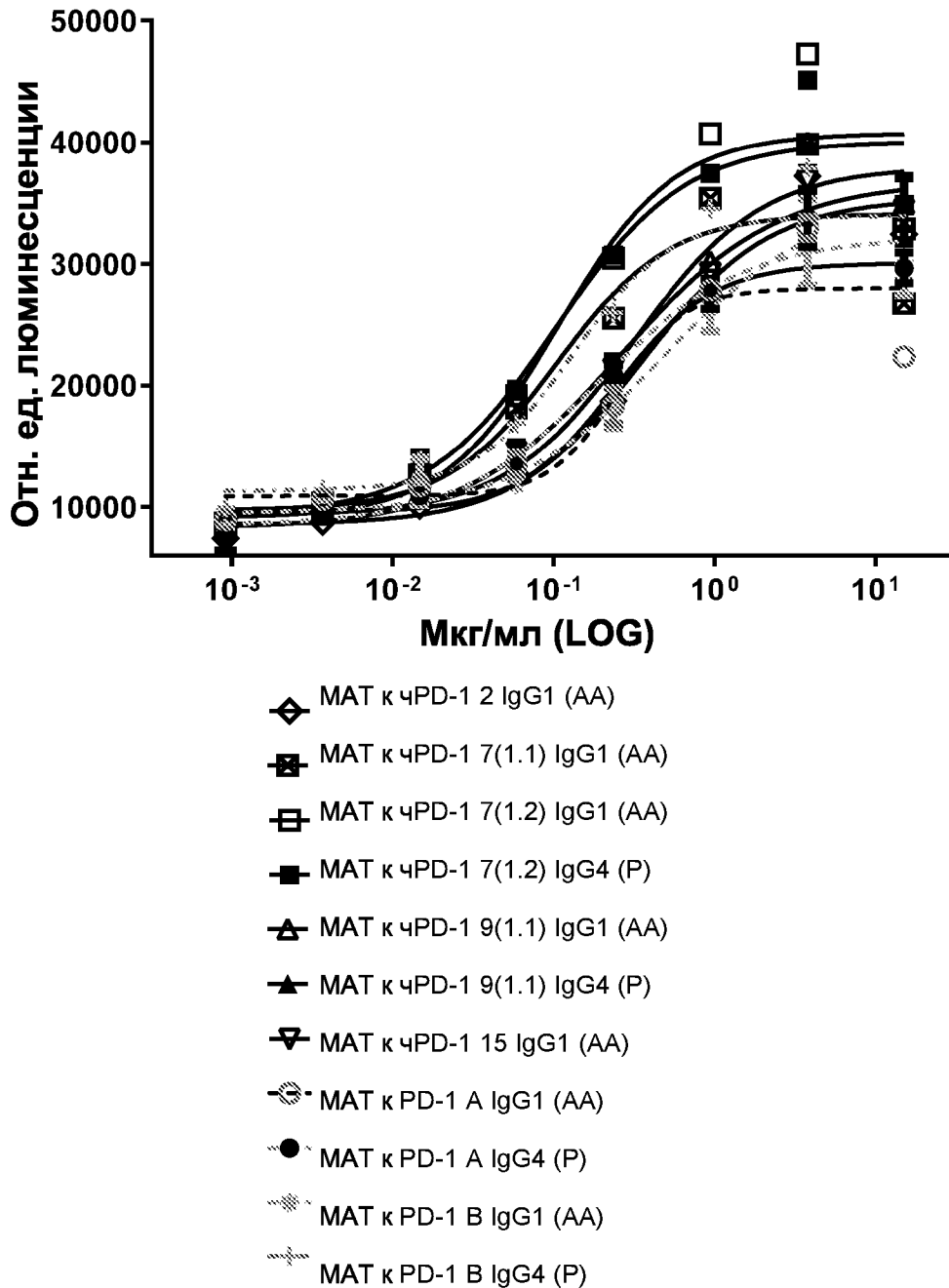
Фигура 12А

## Блокирование sPD-L2 (разведение 1:4)

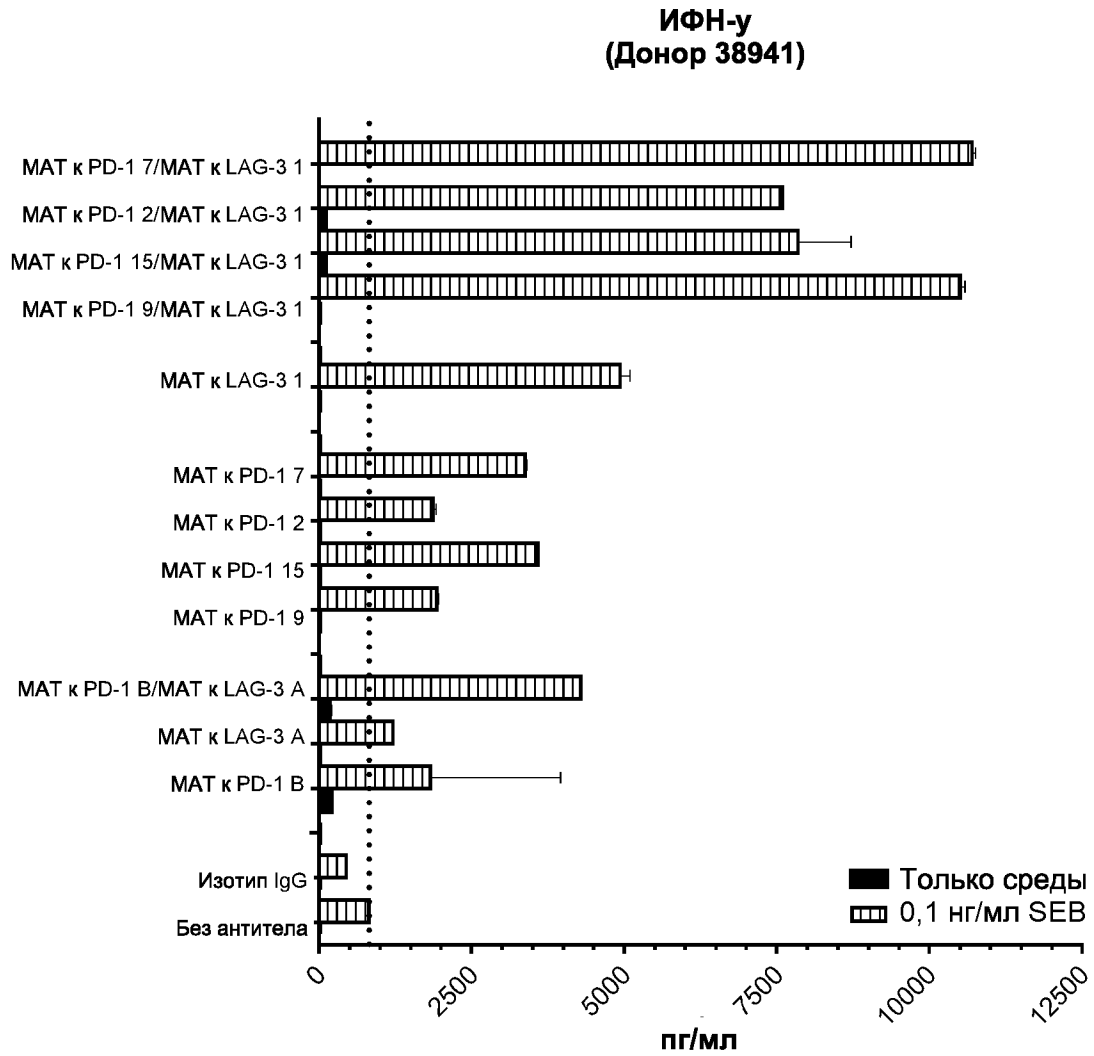


Фигура 12В

**CHO/PD-L1 (40 тыс.) + NFAT-luc2/PD1 Jukart (50 тыс.), 6 ч, гуманизированное МАТ (разведение 1:4)**

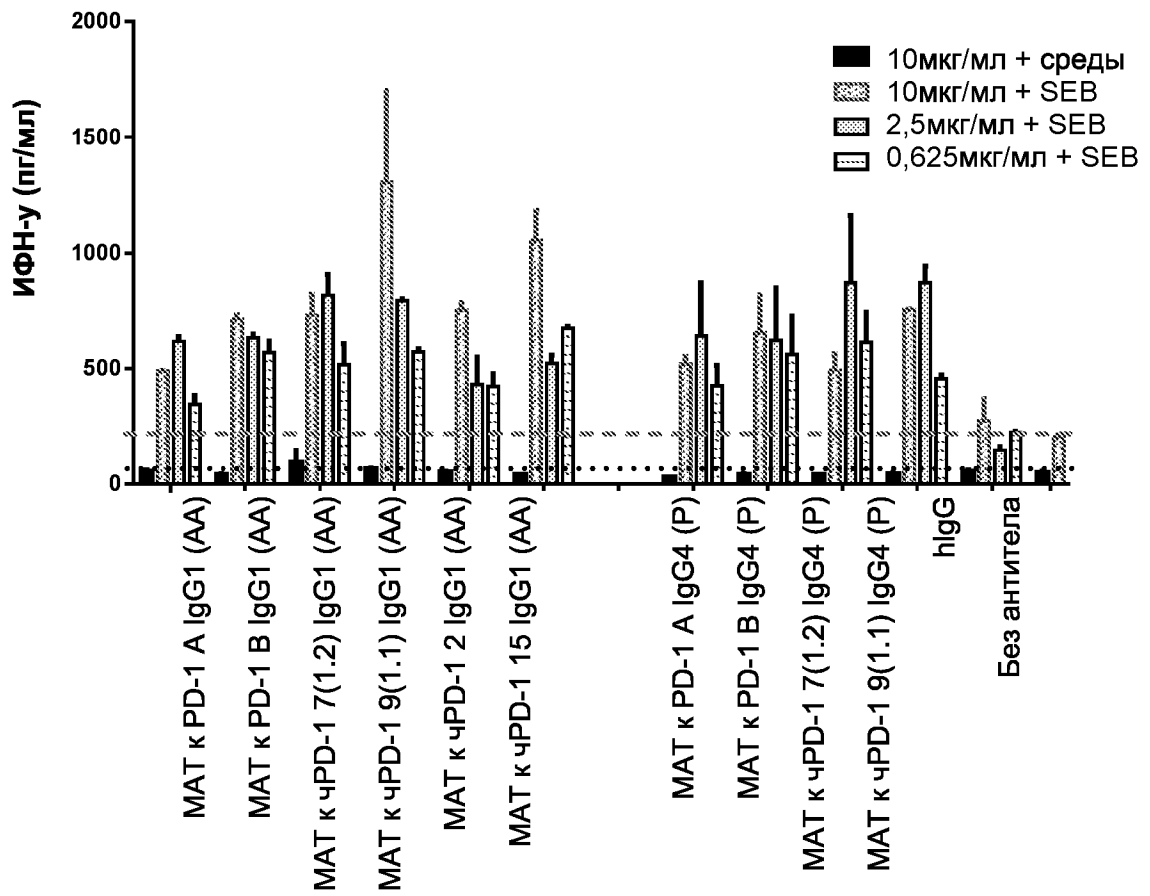


Фигура 13



Фигура 14

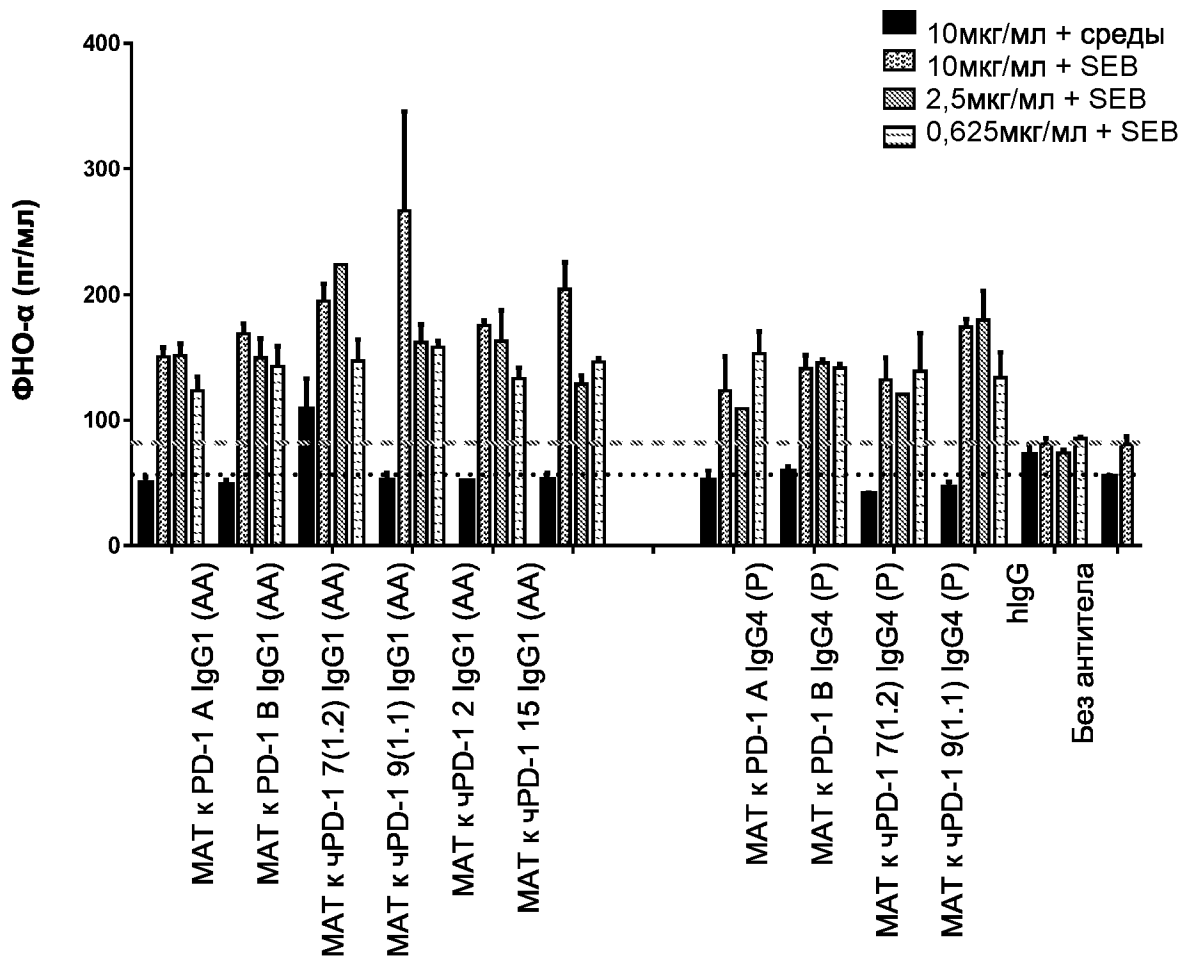
(Донор: 57709)



Фигура 15А

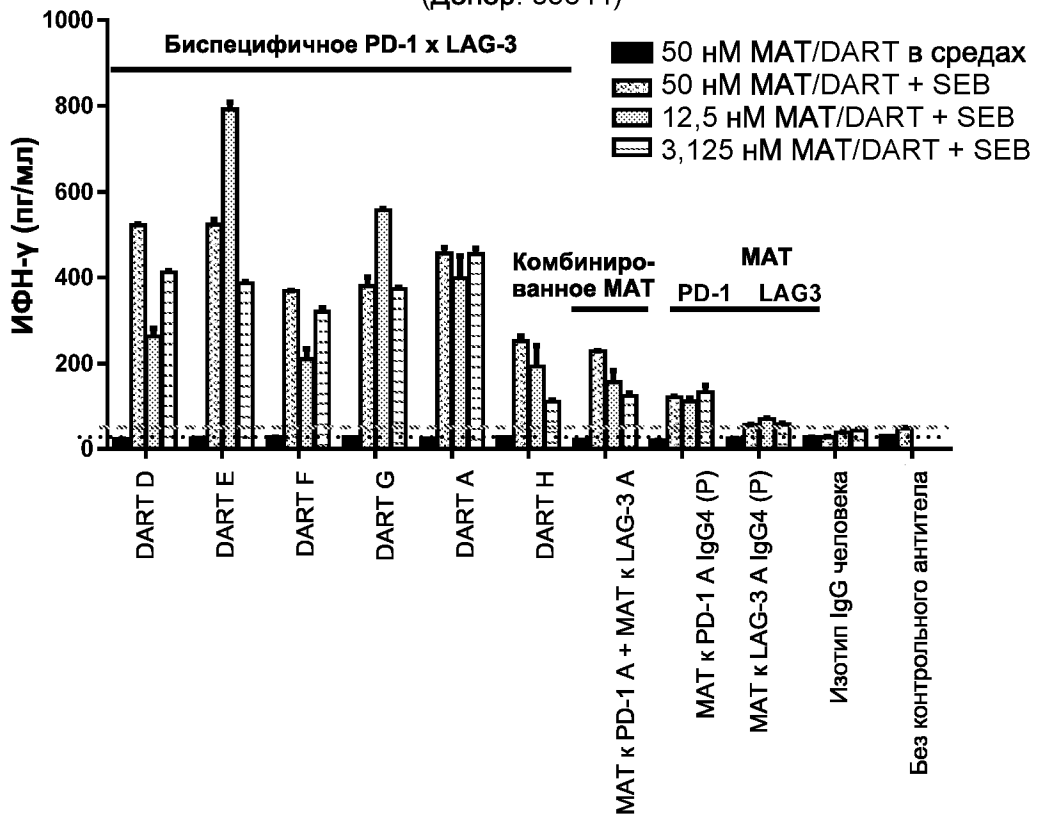


Донор: 57709



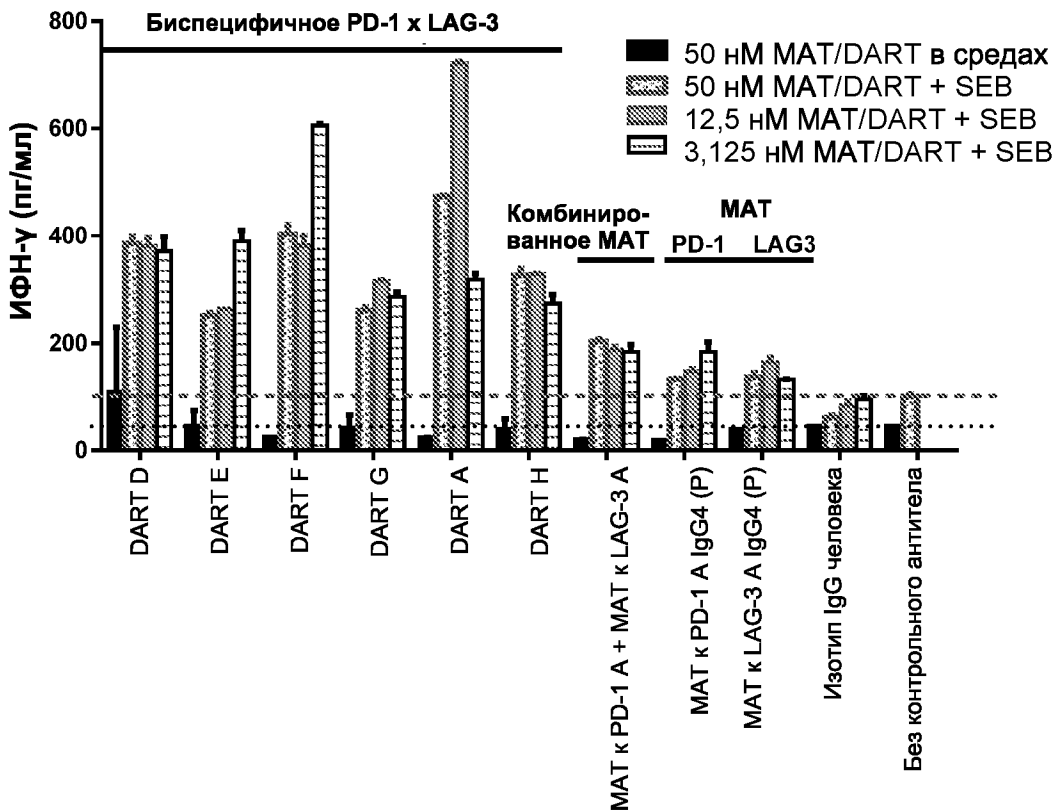
Фигура 15В

(Донор: 35644)

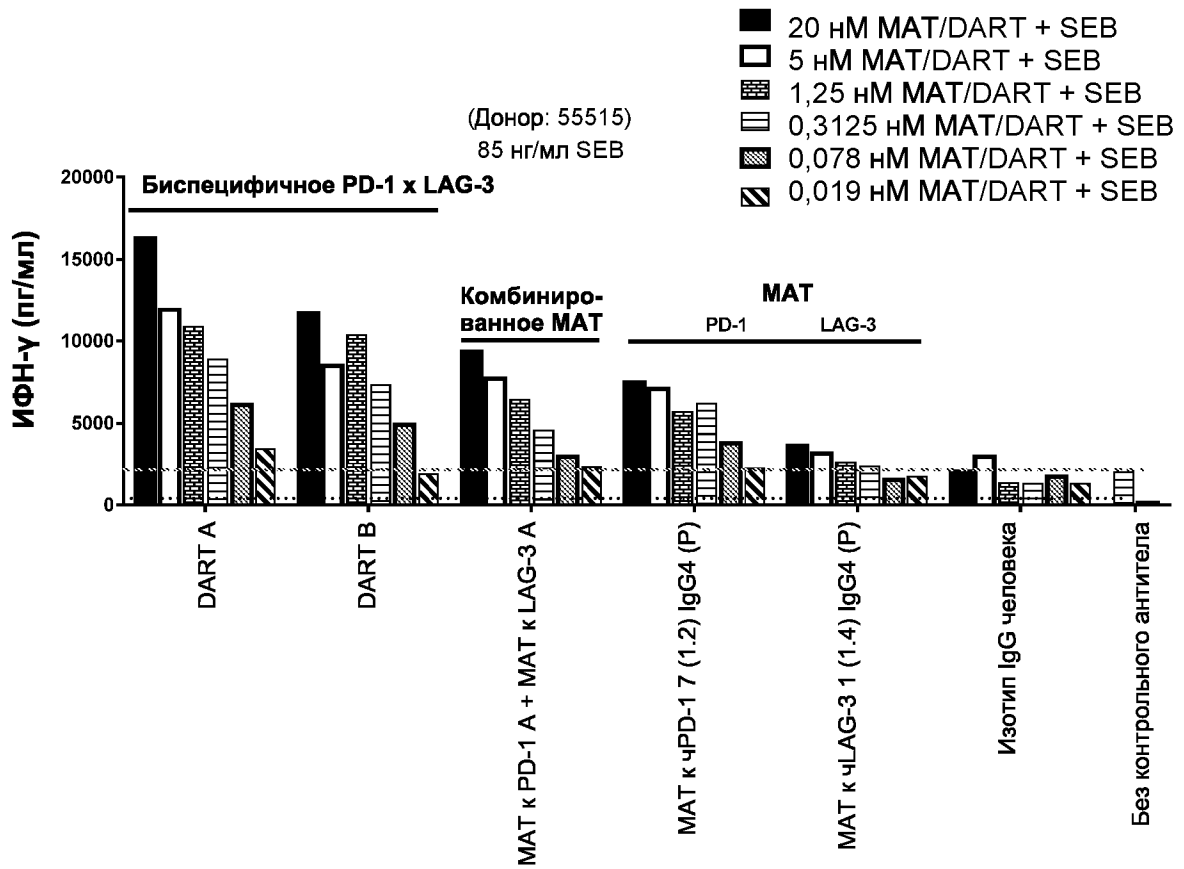


Фигура 16А

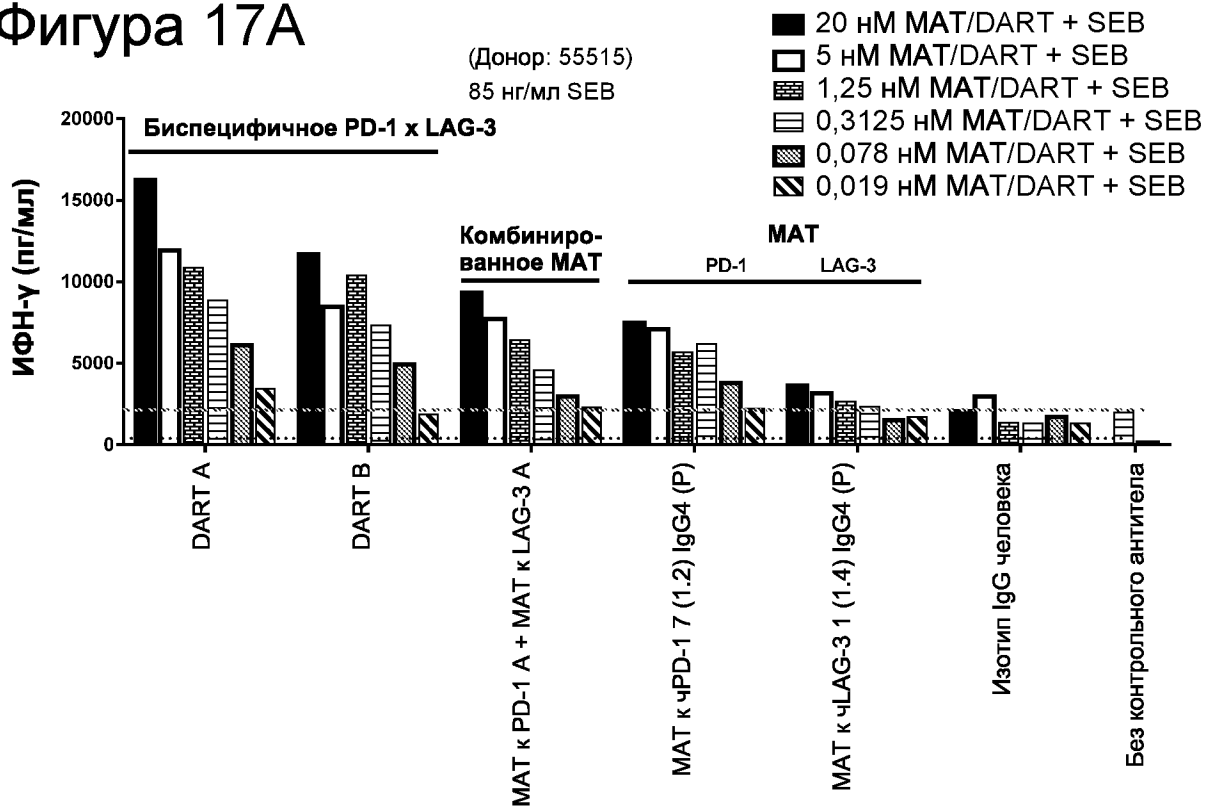
(Донор: 59697)



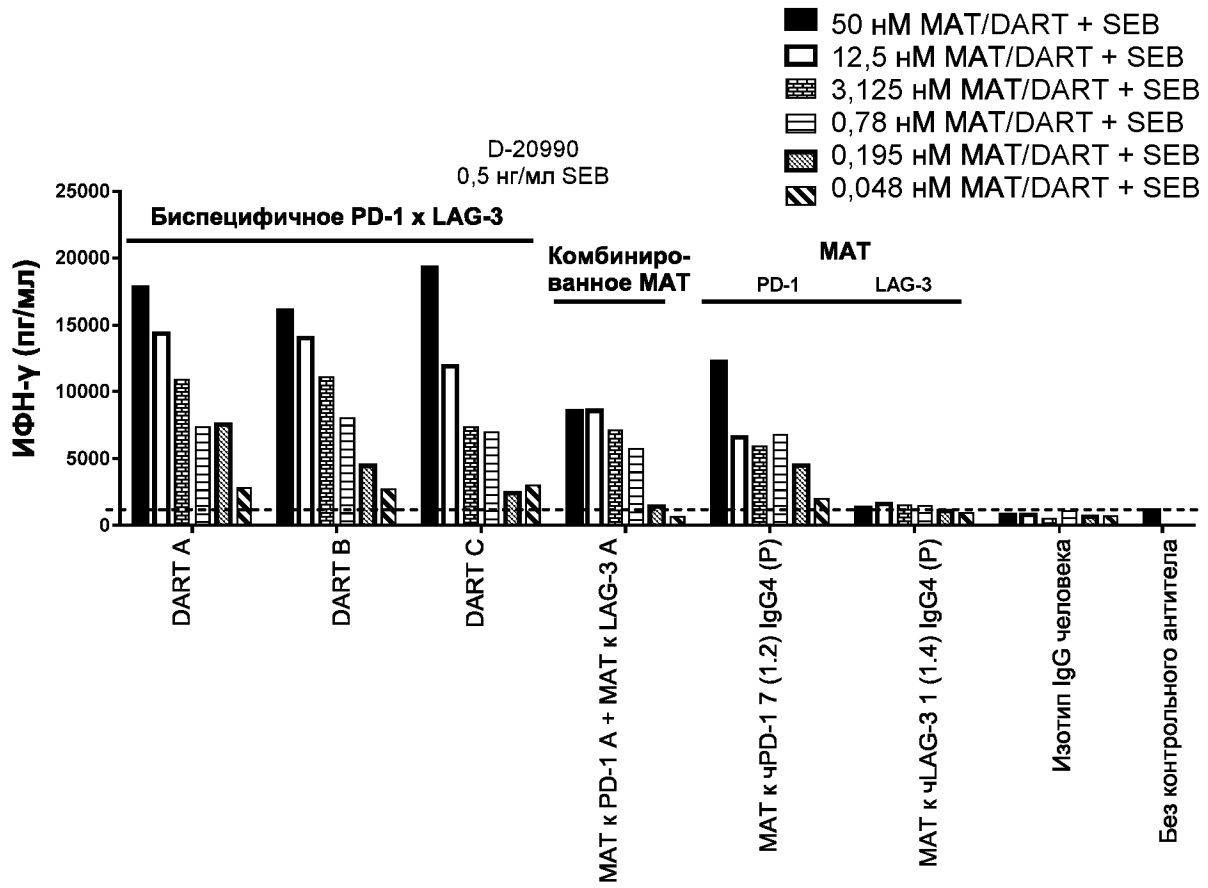
Фигура 16В



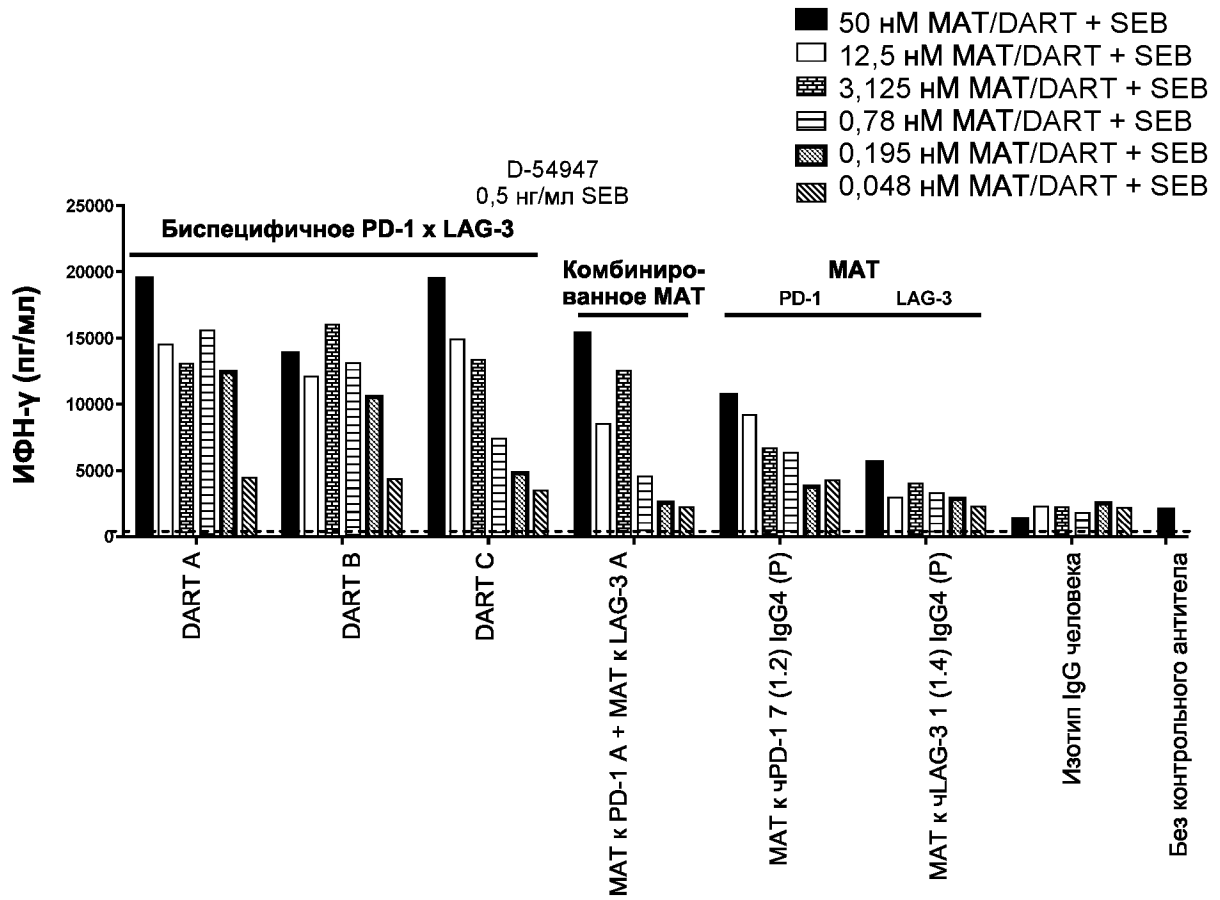
Фигура 17А



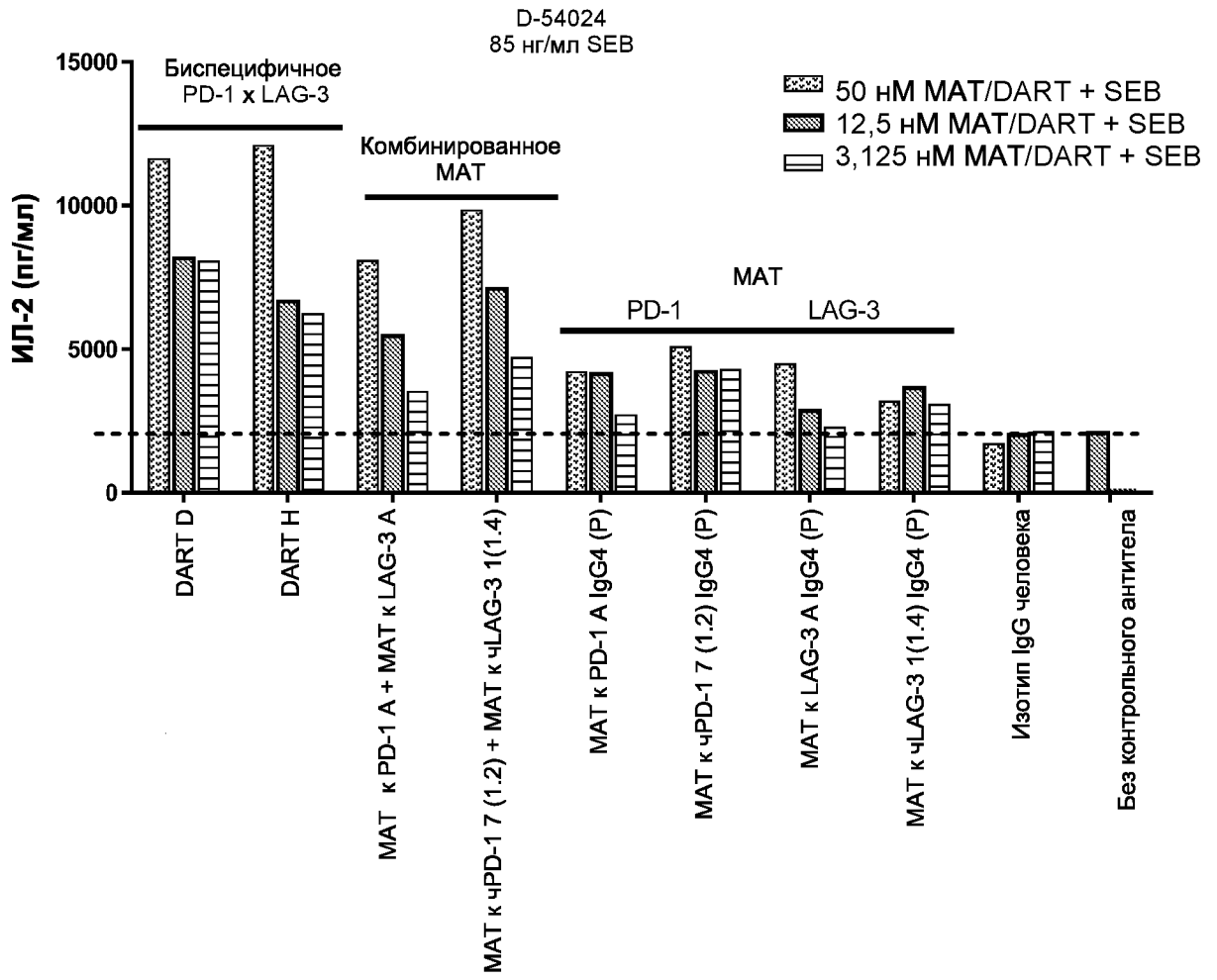
Фигура 17В



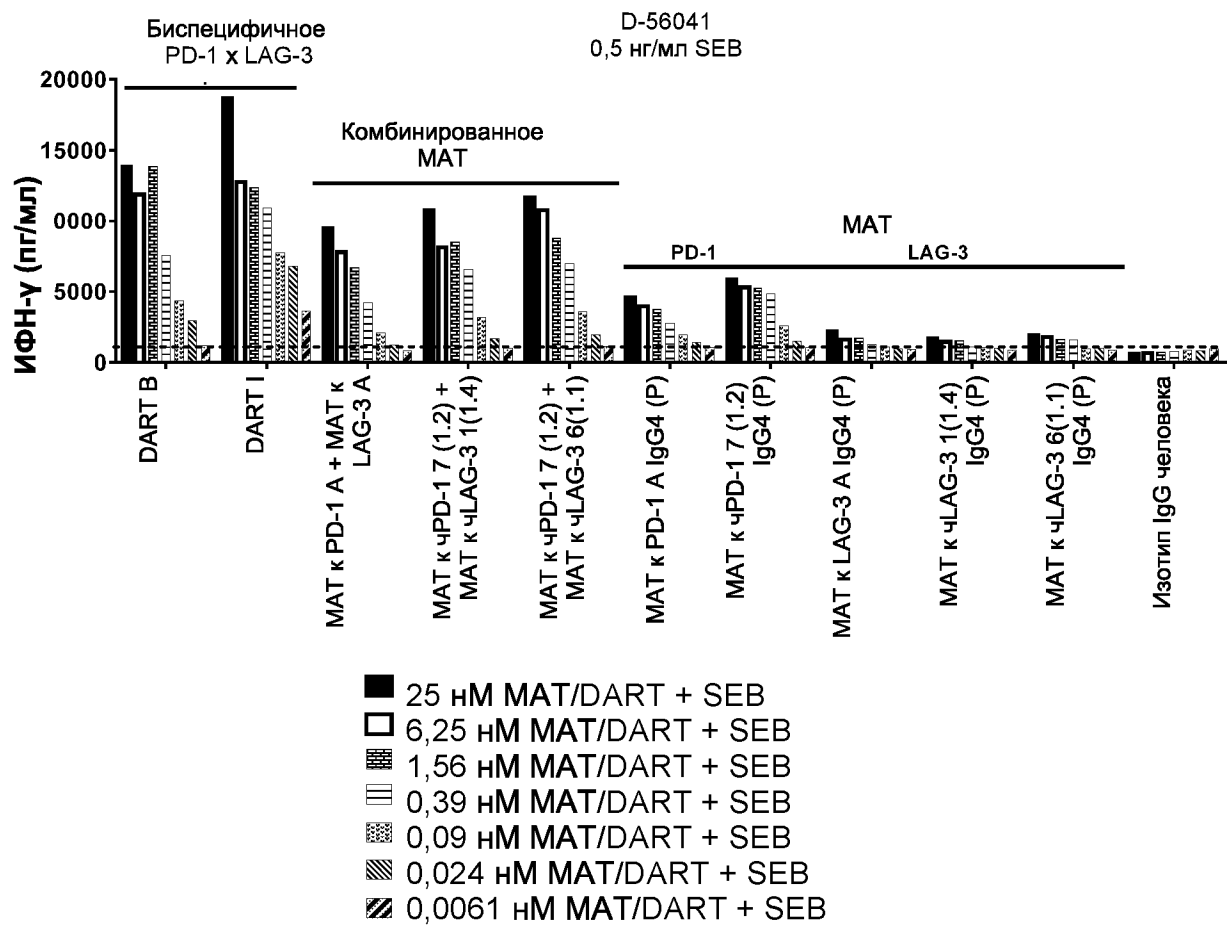
Фигура 18А



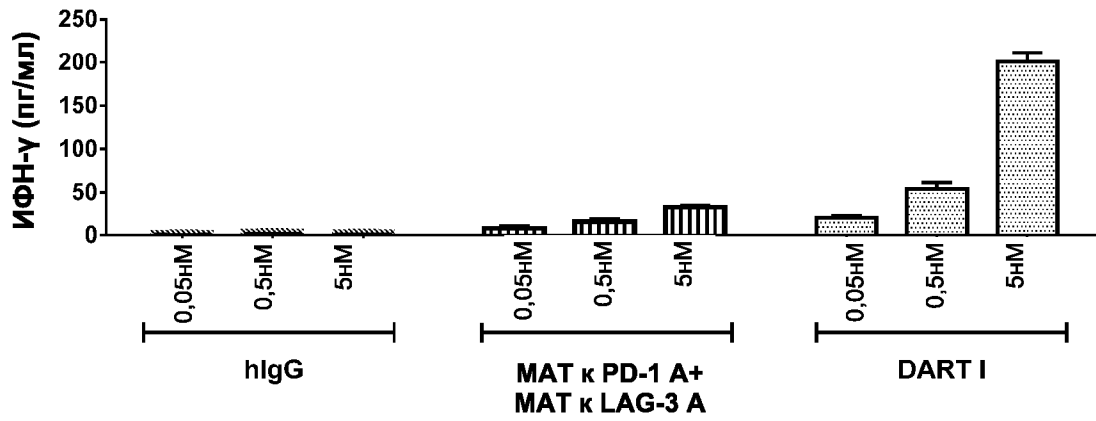
Фигура 18В



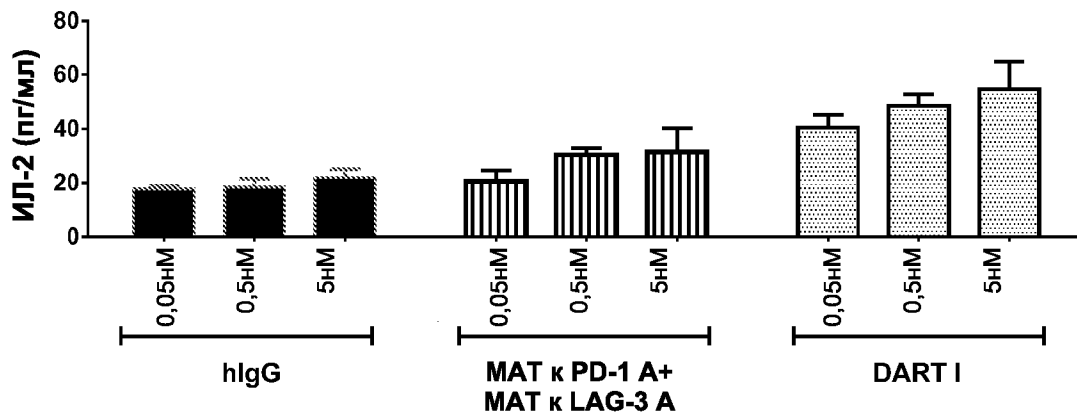
Фигура 19



Фигура 20



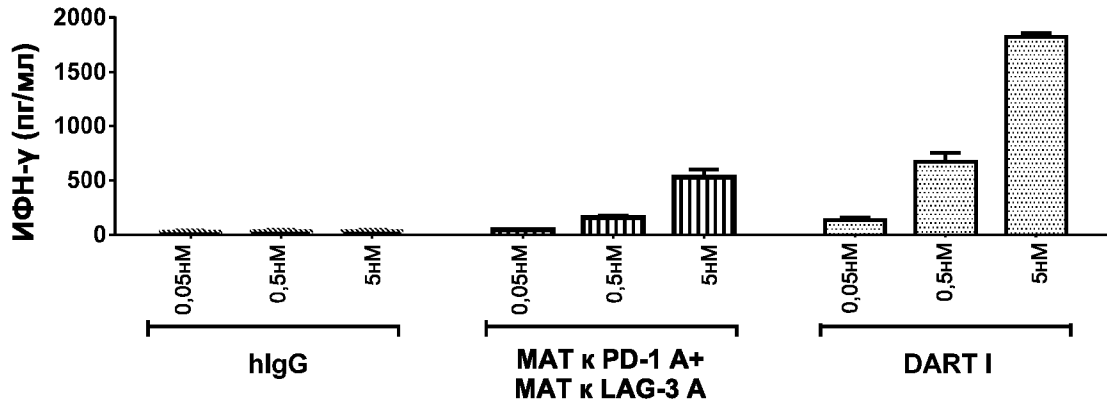
Фигура 21А



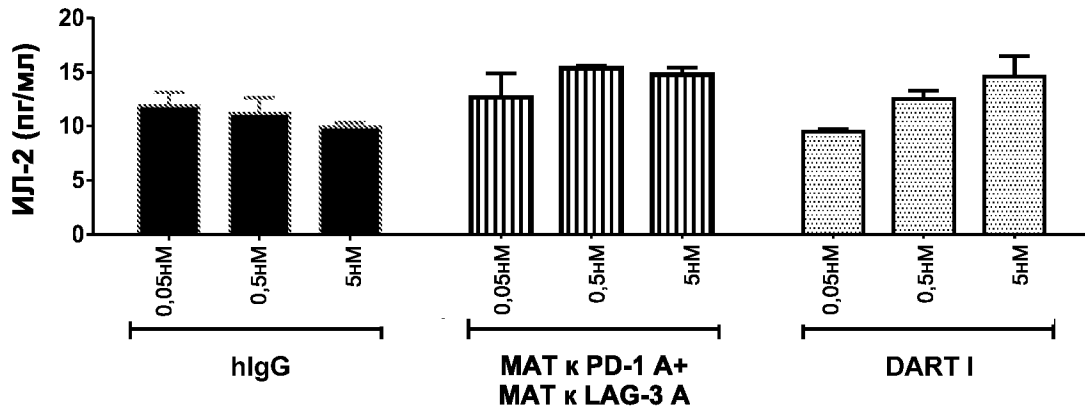
Фигура 21В



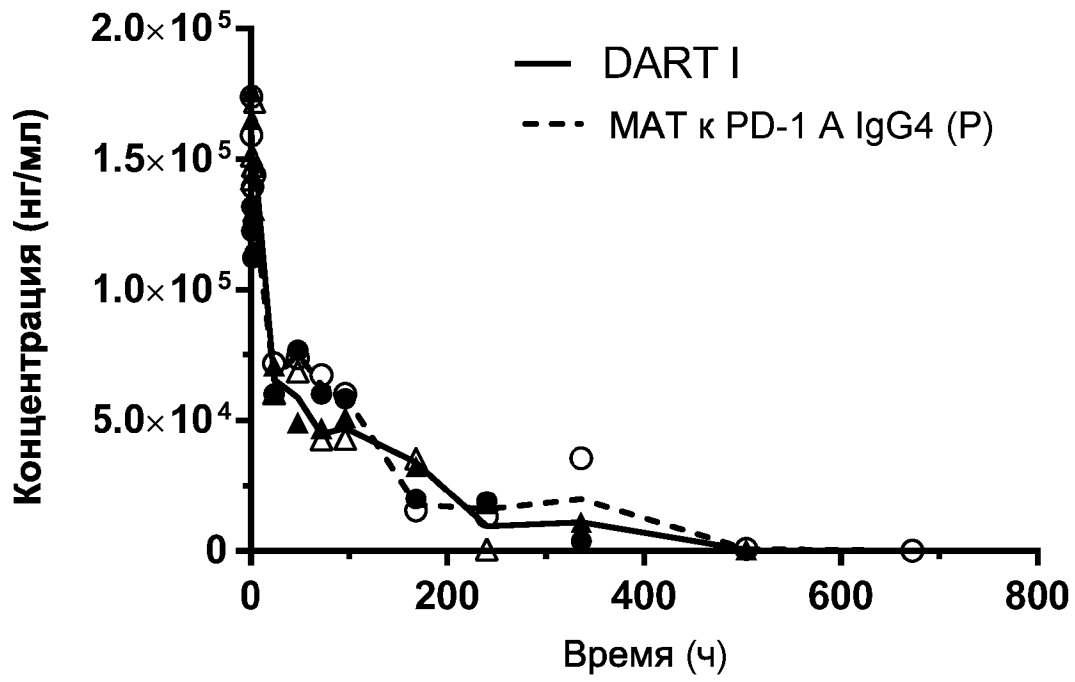
35/38



Фигура 21C

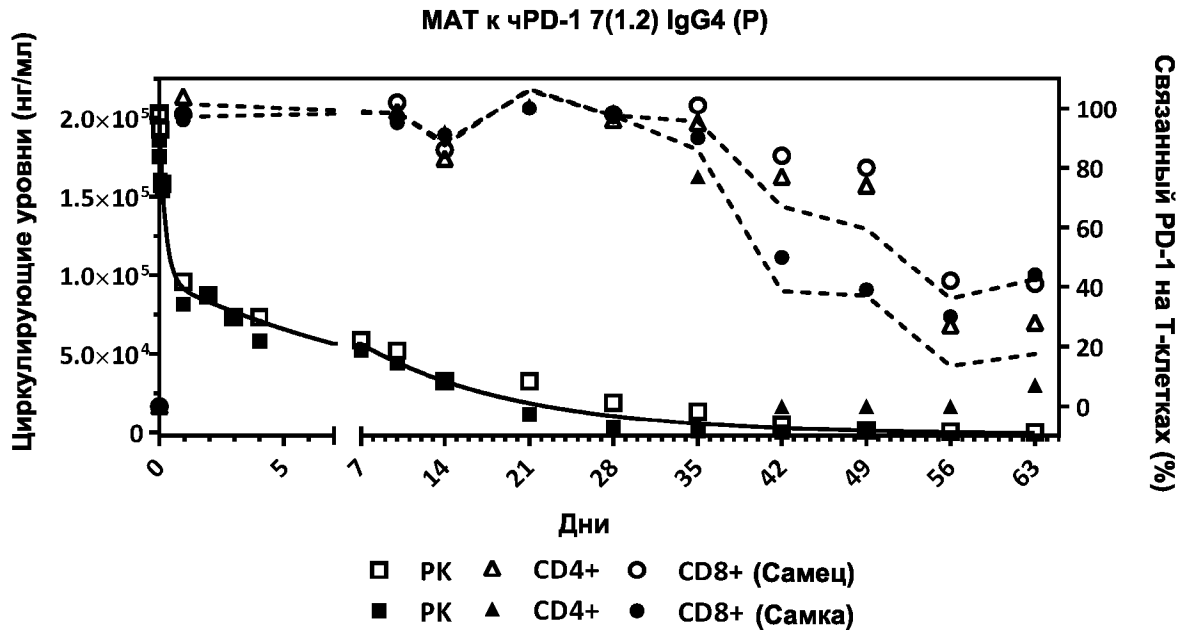


Фигура 21D

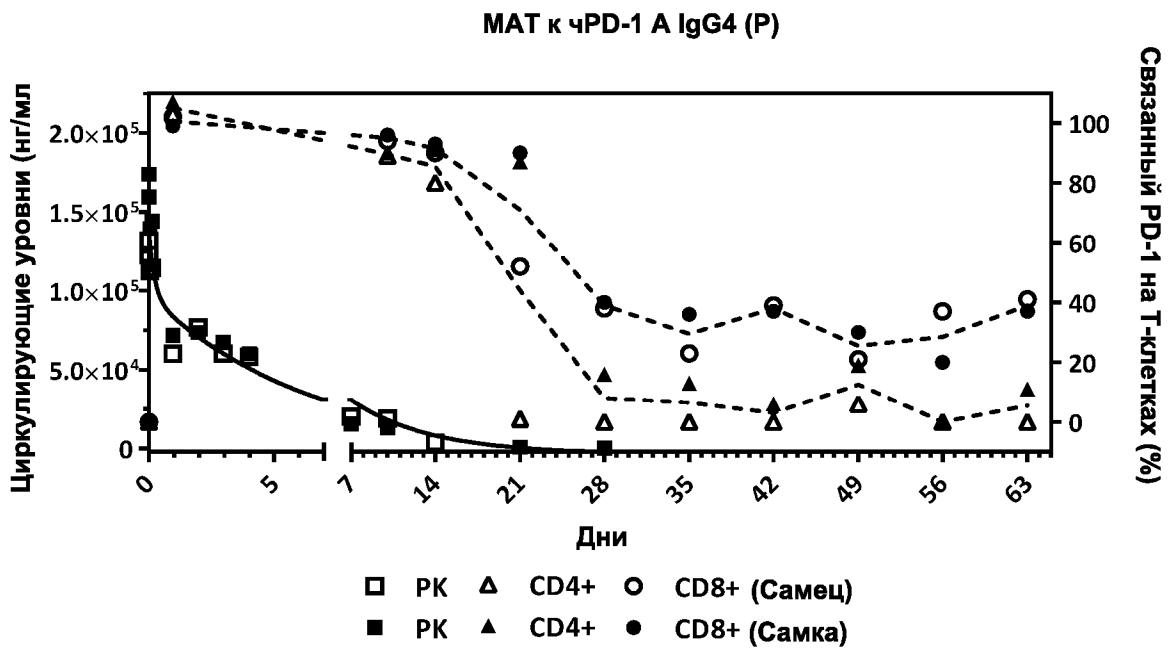


Фигура 22

37/38

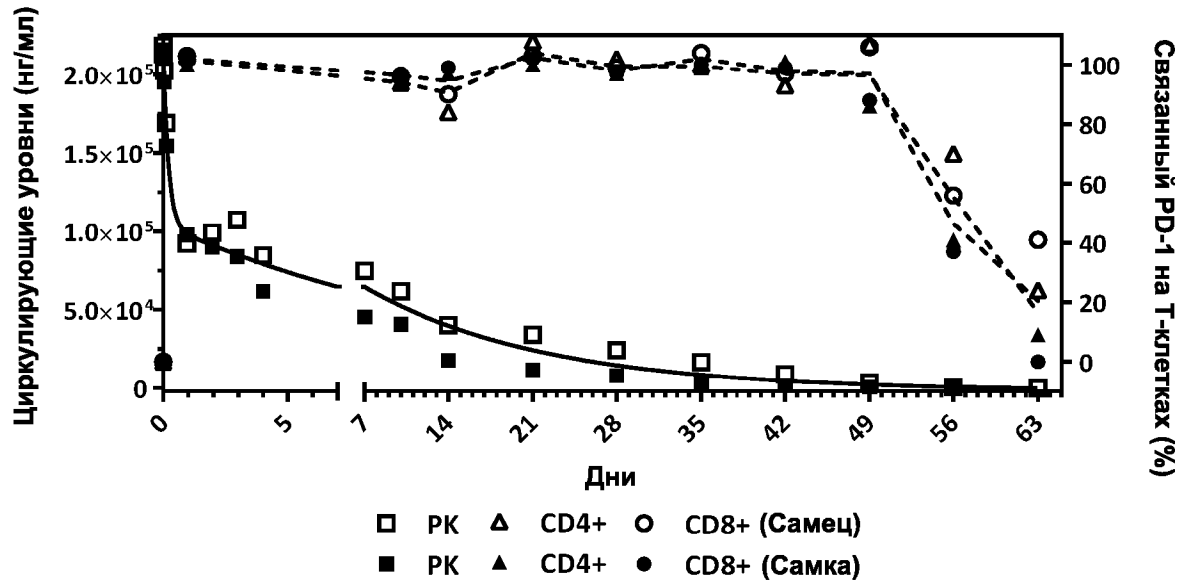


Фигура 23А



Фигура 23В

## МАТ к ЧРD-1 В IgG4 (P)



Фигура 23С