

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201890630 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.10.31

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

(22) Дата подачи заявки
2016.09.01

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/212,851; 62/216,043; 62/257,195

(32) 2015.09.01; 2015.09.09; 2015.11.18

(33) US

(86) PCT/US2016/049913

(87) WO 2017/040790 2017.03.09

(71) Заявитель:

ЭЙДЖЕНУС ИНК. (US); ЛЮДВИГ
ИНСТИТЮТ ФОР КЭНСЕР
РИСЕРЧ ЛТД (CH); МЕМОРИАЛ
СЛОАН КЕТТЕРИНГ КЭНСЕР
СЕНТЕР (US)

(72) Изобретатель:

Ван Дейк Марк (NL), Мундт
Корнелия Анне (DE), Риггер Герт,
Волчок Джедд Дэвид, Мергхуб Таха,
Заппасоди Роберта, Холмгард Рикке
Бек, Шаер Дэвид, Савицкий Дэвид
Адам, Уилсон Николас Стюарт (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим такие антитела, нуклеиновым кислотам, кодирующим такие антитела, экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких антител и способам лечения субъекта с использованием таких антител.

A1

201890630

201890630

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-548112EA/061

АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОПИСАНИЕ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка притязает на преимущество предварительных заявок на патент США №№ 62/212851, поданной 1 сентября 2015; 62/216043, поданной 9 сентября 2015; и 62/257195, поданной 18 ноября 2015, каждая из которых полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1, и способам их применения.

2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1) является ингибирующим членом семейства рецепторов CD28. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata et al. (1996), *Int. Immunol.*, 8: 765-72; Okazaki et al. (2002), *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 391779-82; Bennett et al. (2003), *J. Immunol.*, 170: 711-8). PD-1 представляет собой трансмембранный белок типа 1 в 55 кДа, который является частью суперсемейства генов Ig и содержит мембранный проксимальный иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) и переключающий мотив на основе мембранного дистального тирозина (ITSM) (Thomas M. L. (1995), *J. Exp. Med.*, 181: 1953-6; Vivier E. and Daeron M. (1997), *Immunol. Today*, 18: 286-91). Идентифицированы два лиганда для PD-1 PD-L1 и PD-L2, которые, как показано, даунрегулируют активацию Т-клеток после связывания с PD-1 (Freeman et al. (2000), *J. Exp. Med.*, 192: 1027-34; Latchman et al. (2001), *Nat. Immunol.*, 2: 261-8; Carter et al. (2002), *Eur. J. Immunol.*, 32: 634-43). PD-L1 часто встречается при многих онкозаболеваниях человека (Dong et al. (2002), *Nat. Med.*, 8: 787-9). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к снижению опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, снижению пролиферации, опосредуемой Т-клеточными рецепторами, и избеганию

раковыми клетками иммунного надзора (Dong et al. (2003), *J. Mol. Med.*, 81: 281-7; Blank et al. (2005), *Cancer Immunol. Immunother.*, 54: 307-314; Konishi et al. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10: 5094-100). Такую иммуносупрессию можно реверсировать путем ингибирования локального взаимодействия PD-1 с PD-L1, и эффект является аддитивным, когда также блокируется взаимодействие PD-1 с PD-L2 (Iwai et al. (2002), *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 99: 12293-7; Brown et al. (2003), *J. Immunol.*, 170: 1257-66).

[0003] PD-1 является ингибирующей молекулой иммунных клеток. У животных с недостатком PD-1 развиваются различные аутоиммунные фенотипы, включая аутоиммунную кардиомиопатию и волчаночноподобный синдром с артритом и нефритом (Nishimura et al. (1999), *Immunity*, 11: 141-51; Nishimura et al. (2001), *Science*, 291: 319-22). Кроме того, также обнаружено, что PD-1 играет некую роль в аутоиммунном энцефаломиелите, системной красной волчанке, болезни «трансплантат против хозяина» (GVHD), диабете типа I и ревматоидном артрите (Salama et al. (2003), *J. Exp. Med.*, 198: 71-78; Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004), *Hum. Mol. Genet.*, 13: R143; Nielsen et al. (2004), *Lupus*, 13: 510). Показано, что в линии мышинных опухолевых В-клеток ITSM PD-1 существенен для блокады BCR-опосредованного потока Ca^{2+} и фосфорилирования тирозина следующих далее эффекторных молекул (Okazaki et al. (2001), *PNAS*, 98: 13866-71).

[0004] Принимая во внимание роль человеческого PD-1 в модулирующих иммунных реакций, терапевтические средства, созданные для антагонизации передачи сигнала PD-1, считаются весьма перспективными для лечения заболеваний, которые включают иммуносупрессию, опосредуемую PD-1.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1, например, опосредуемую PD-1 иммуносупрессию. Настоящее раскрытие также относится к фармацевтическим композициям, включающим такие антитела, нуклеиновым кислотам, кодирующим такие антитела, экспрессирующим векторам и клеткам-

хозяевам для получения таких антител, и способам лечения пациента с использованием таких антител. Антитела, раскрытые в настоящем описании, особенно применимы для усиления активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и/или ослабления Treg-опосредуемой иммуносупрессии и, следовательно, для лечения или предупреждения инфекционного заболевания у субъекта.

[0006] Соответственно, в одном аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем (a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1); (b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), где X₁ представляет собой Y или F; X₂ представляет собой K или E; и X₃ представляет собой K или M; (c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), где X₁ представляет собой G или V; и X₂ представляет собой H или Y; (d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); (e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и (f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[0007] В некоторых воплощениях CDRH2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 34-46.

[0008] В некоторых воплощениях CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 7 и 37.

[0009] В некоторых воплощениях CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 1, 2 и 7; 1, 2 и 37; 1, 34 и 7; 1, 35 и 7 или 1, 36 и 7.

[0010] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие

комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно.

[0011] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 7, 4, 5 и 6, соответственно.

[0012] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

[0013] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую вариабельный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

[0014] В некоторых воплощениях антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33 (например, IGHV3-33*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50).

[0015] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях переменный участок легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0016] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15 (например, IGKV3-15*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51).

[0017] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, где переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, соответственно, включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16; 17 и 16; 26 и 16; 27 и 16; 28 и 16; 29 и 16; 30 и 16 или 31 и 16.

[0018] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0019] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0020] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 16.

[0021] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0022] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0023] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0024] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0025] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антители или изолированному антители, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33 (например, IGHV3-33*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50), и (b) переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15 (например, IGKV3-15*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51).

[0026] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к

антителу или изолированному антителу, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0027] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31.

[0028] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0029] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0030] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0031] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0032] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0033] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую

цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0034] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0035] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0036] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0037] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0038] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0039] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем (a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1); (b) CDRH2 включает

аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), где X₁ представляет собой Y или F; X₂ представляет собой K или E; и X₃ представляет собой K или M; (c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), где X₁ представляет собой G или V; и X₂ представляет собой H или Y; (d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); (e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и (f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[0040] В некоторых воплощениях CDRH2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 34-36.

[0041] В некоторых воплощениях CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 7 и 37.

[0042] В некоторых воплощениях CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 1, 2 и 7;; 1, 2 и 37;; 1, 34 и 7;; 1, 35 и 7 или 1, 36 и 7.

[0043] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно.

[0044] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 7, 4, 5 и 6, соответственно.

[0045] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

[0046] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых воплощениях переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых воплощениях

антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

[0047] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33 (например, IGHV3-33*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50).

[0048] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях переменный участок легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0049] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15 (например, IGKV3-15*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51).

[0050] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой

цепи, где переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, соответственно, включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16; 17 и 16; 26 и 16; 27 и 16; 28 и 16; 29 и 16; 30 и 16 или 31 и 16.

[0051] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (а) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и (б) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0052] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (а) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и (б) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0053] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (а) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и (б) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0054] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (а) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и (б) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0055] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (а) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 28, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0056] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0057] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0058] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и (b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0059] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33 (например, IGHV3-33*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50), и (b) переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15 (например, IGKV3-15*01, например, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51).

[0060] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к

антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31.

[0061] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0062] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0063] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0064] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0065] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0066] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически

связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0067] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0068] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0069] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0070] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0071] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему (a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и (b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[0072] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое перекрестно

конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с любым антителом, раскрытым в настоящем описании. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается, с эпитопом человеческого PD-1. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 107-122 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 107-122 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 5-22 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 5-22 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 130-138 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 130-138 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74. В некоторых воплощениях антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74.

[0074] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу, для которого, после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 107-122 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий. В другом аспекте настоящее раскрытие относится

к антителу, для которого, после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 5-22 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий.

[0075] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и любое антитело по настоящему изобретению. В предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 107-122 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 107-122 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 5-22 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 5-22 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 130-138 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 106-138 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74. В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74.

В другом предпочтительном воплощении антитело связывается с эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74, и/или эпитопом человеческого PD-1, включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 130-138 SEQ ID NO: 74, и/или включающим, состоящим по существу или состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74. Связывание с эпитопом предпочтительно определяют анализом Перscan, в частности, как описано в примерах. Например, связывание с более чем одной из вышеуказанных последовательностей эпитопов человеческого PD-1 может происходить в случае прерывистых эпитопов.

[0076] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и любое антитело по настоящему изобретению, для которого, после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 107-122 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и любое антитело по настоящему изобретению, для которого, после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 5-22 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий. В более предпочтительном воплощении после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 107-122 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно

обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий, и после связывания антитела с человеческим белком PD-1 с последующим добавлением дейтерия, обмен водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в участке, включающем остатки 5-22 SEQ ID NO: 74, существенно снижен относительно обмена водорода в человеческом белке PD-1 на дейтерий в том же участке в отсутствие антитела при определении путем обмена водород/дейтерий. Например, связывание с более чем одной из вышеуказанных последовательностей эпитопов человеческого PD-1 может происходить в случае прерывистых эпитопов.

[0077] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к антителу или изолированному антителу, которое связывается, например, специфически связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и любое антитело по настоящему изобретению, причем эпитоп определяют по обмену водород-дейтерий (HDX), в частности, как описано в примерах, или анализом Pepscan, в частности, как описано в примерах, предпочтительнее по обмену водород-дейтерий.

[0078] Следующие далее воплощения применимы ко всем вышеуказанным аспектам.

[0079] В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, включающей человеческие IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, который теряет гликановую группу в позиции N297 согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающего мутацию N297A согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающего мутацию N297Q согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающего мутацию D265A согласно нумерации системы EU. В некоторых

воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₄, включающего мутацию S228P согласно нумерации системы EU.

[0080] В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG, который является вариантом константного участка тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа, причем вариантный константный участок тяжелой цепи человеческого IgG связывается с человеческим Fc-рецептором с меньшей аффинностью, чем связывается константный участок тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа с человеческим Fc-рецептором. В некоторых воплощениях человеческий Fc-рецептор представляет собой FcγR. В некоторых воплощениях FcγR представляет собой FcγRIIB. В некоторых воплощениях FcγR экспрессируется на клетке, выбранной из группы, включающей дендритные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, гранулоциты, В-клетки и природные киллерные клетки. В некоторых воплощениях вариантный константный участок тяжелой цепи человеческого IgG представляет собой вариант константного участка тяжелой цепи человеческого IgG₁, вариант константного участка тяжелой цепи человеческого IgG₂ или вариант константного участка тяжелой цепи человеческого IgG₄. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из человеческих IgGκ IgGλ.

[0081] В некоторых воплощениях антитело представляет собой человеческое антитело. В некоторых воплощениях антитело является антагонистичным к человеческому PD-1. В некоторых воплощениях антитело дезактивирует, снижает или ингибирует активность человеческого PD-1. В некоторых воплощениях антитело ингибирует связывание человеческого PD-1 с человеческим PD-L1 или с человеческим PD-L2. В некоторых воплощениях антитело повышает продуцирование IL-2 мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), стимулированными стафилококковым энтеротоксином А (SEA). В некоторых воплощениях антитело повышает продуцирование IFNγ совместной культурой человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток. В некоторых воплощениях антитело повышает

пролиферацию анти-CD3-антителостимулированных CD4+ или CD8+ Т-клеток, культивированных вместе с асцитической жидкостью при раке яичников. В некоторых воплощениях антитело усиливает передачу сигнала NFAT в PD-1-экспрессирующих NFAT-люциферазных репортерных клетках, культивированных совместно с PD-L1-экспрессирующими клетками-мишенями.

[0082] В некоторых воплощениях антитело, раскрытое в настоящем описании, конъюгируют с цитотоксическим агентом, цитостатическим агентом, токсином, радионуклеидом или детектируемой меткой.

[0083] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к фармацевтической композиции, включающей антитело, раскрытое в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

[0084] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к полинуклеотиду или изолированному полинуклеотиду, кодирующему тяжелую и/или легкую цепь антитела, раскрытого в настоящем описании. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к вектору, включающему полинуклеотид. В еще одном аспекте настоящее раскрытие относится к рекомбинантной клетке-хозяину, включающей полинуклеотид или вектор. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу получения антитела, которое связывается с человеческим PD-1, причем способ включает культивирование клетки-хозяина таким образом, что экспрессируется полинуклеотид и продуцируется антитело. В предпочтительном воплощении способ является способом *in vitro*.

[0085] В одном воплощении настоящее изобретение относится к антителу по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению или полинуклеотиду по изобретению или вектору по изобретению или рекомбинантной клетке-хозяину по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

[0086] В одном воплощении настоящее изобретение относится к антителу по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению или полинуклеотиду по изобретению или вектору по изобретению или рекомбинантной клетке-хозяину по изобретению для применения в качестве диагностического средства.

[0087] В одном воплощении настоящее изобретение относится к применению антитела по настоящему изобретению для получения фармацевтических композиций или лекарственных средств для иммунотерапии. Предпочтительно иммунотерапия предназначена для повышения активности Т-клеток, необязательно, для лечения рака или лечения или предупреждения инфекционного заболевания.

[0088] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании.

[0089] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу лечения рака у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, не-мелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых). В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию вводят подкожно или внутривенно. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию вводят интратуморально. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию доставляют в дренирующий опухоль лимфоузел. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию вводят

интраартериально.

[0090] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген.

[0091] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта.

[0092] В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта.

[0093] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для применения в способе повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по изобретению.

[0094] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака, причем предпочтительно рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, не-мелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания,

раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

[0095] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака у субъекта, причем предпочтительно рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, не-мелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (T-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

[0096] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака у субъекта, включающем введение субъекту эффективного количества антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по изобретению, причем предпочтительно рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, не-мелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный

рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

[0097] В предпочтительном воплощении антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию, предпочтительно антитело или фармацевтическую композицию, вводят подкожно или внутривенно. В другом предпочтительном воплощении антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению, антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию, предпочтительно антитело или фармацевтическую композицию, вводят интратуморально или интраартериально.

[0098] В некоторых воплощениях вышеуказанные способы также включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства. Поэтому, в одном предпочтительном воплощении антитела, полинуклеотида, вектора, рекомбинантной клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции для применения в способе по настоящему изобретению способ также включает введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

[0099] В одном аспекте настоящее изобретение относится к (a) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для

применения в качестве лекарственного средства.

[00100] В одном аспекте настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в способе лечения рака.

[00101] В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплекту частей, включающим (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) дополнительное терапевтическое средство.

[00102] В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое или средство, направленно воздействующее на контрольную точку. В некоторых воплощениях средство, направленно воздействующее на контрольную точку, выбирают из группы, включающей антагонистическое анти-PD-1 антитело, антагонистическое анти-PD-L1 антитело, антагонистическое анти-PD-L2 антитело, антагонистическое анти-CTLA-4 антитело, антагонистическое анти-TIM-3 антитело, антагонистическое анти-LAG-3 антитело, антагонистическое анти-CEACAM1 антитело, антагонистическое анти-TIGIT антитело, антагонистическое анти-CD137 антитело, антагонистическое анти-ICOS антитело, антагонистическое анти-GITR антитело и антагонистическое анти-OX40 антитело. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). В некоторых воплощениях ингибитор выбирают из группы, включающей эпакадостат, F001287, индоксимод и NLG919. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой вакцину. В некоторых воплощениях вакцина включает комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В некоторых воплощениях белком теплового шока является hsc70 и находится в комплексе с опухоль-ассоциированным антигенным пептидом. В некоторых воплощениях белком теплового шока является белок gp96 и находится в комплексе с опухоль-ассоциированным антигенным

пептидом, причем HSPPC происходит из опухоли, полученной от субъекта. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство включает TCR. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой растворимый TCR. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой клетку, экспрессирующую TCR. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело, которое специфически связывается с комплексом пептид-МНС. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство представляет собой адъювант. В одном аспекте настоящее изобретение относится к (а) антителу, полинуклеотиду, вектору, рекомбинантной клетке-хозяину и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, а также их применению для получения лекарственных средств, и (b) вакцине для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в способе лечения рака, причем предпочтительно вакцина включает комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплекту частей, включающим (а) антитело, полинуклеотид, вектор, рекомбинантную клетку-хозяина и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) вакцину, причем предпочтительно вакцина включает комплекс белка теплового шока с пептидом (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00103] **Фигуры 1A, 1B, 1C и 1D** представляют собой графики, показывающие связывание анти-PD-1 антител с активированными первичными Т-клетками человека или яванского макака при измерении проточной цитометрией. Вычисляют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) и строят график зависимости от интервала концентраций антител. На фигуре 1A измеряют связывание AGEN2046w, AGEN2047w и изотипического контрольного человеческого

IgG₁ с человеческими CD4⁺ Т-клетками, стимулированными стафилококковым энтеротоксином А (SEA). AGEN2034w и изотипический контрольный человеческий IgG₄ испытывают против человеческих CD4⁺ Т-клеток, стимулированных SEA (фигуры 1B и 1D), и CD4⁺ Т-клеток яванского макака, стимулированных стафилококковым энтеротоксином В (SEB) (фигура 1C).

[00104] **Фигура 2** представляет собой график, показывающий связывание AGEN2034w с человеческим PD-1-Fc, человеческим ROBO2-Fc, человеческим B7-H7-Fc или SIRPγ-His. Взаимодействие измеряют по технологии «suspension array», и строят график зависимости средней интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации антитела.

[00105] **фигуры 3A, 3B, 3C, 3D, 3E и 3F** представляют собой графики, показывающие процент связывания рекомбинатных PD-L1-Fc и/или PD-L2-Fc с гранулами, связанными с PD-1, в присутствии титрования дозы анти-PD-1 антител. На фигурах 3A, 3B, 3C и 3D испытываемыми анти-PD-1 антителами являются AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w, соответственно. На фигурах 3E и 3F подобные результаты показаны для AGEN2034w и изотипического контрольного антитела.

[00106] **фигуры 4A, 4B, 4C, 4D, 4E и 4F** представляют собой графики, отображающие функциональную активность анти-PD-1 антител на культурах первичных человеческих PBMC после стимуляции SEA. Фигура 4A представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2, индуцированное анти-PD-1 антителами AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w и изотипическим контрольным IgG₁. Показаны средние величины (величины ошибок) секретированного IL-2. Фигура 4B представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2 в присутствии титрования дозы AGEN2034w по сравнению с изотипическим контролем. Величины ошибок представляют стандартное отклонение. AGEN2034w или контрольное изотипическое антитело проверяют в присутствии или в отсутствие анти-CTLA-4 антитела ипилимумаба (фигура 4C), анти-TIGIT антитела rab2197 или rab2196 (фигура 4D), анти-CD137 антитела rab2225 (фигура 4E) или анти-OX40

антитела rab1928 (фигура 4F).

[00107] **Фигуры 5А, 5В и 5С** являются результатами исследований при проверке влияния сцепления рецептора Fc-гамма (FcγR) на антагонистическую активность анти-PD-1 антител в отношении первичных человеческих PBMC после стимуляции SEA. Фигура 5А представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2, стимулированное эталонным анти-PD-1 антителом или изотипическим контролем в присутствии или в отсутствие анти-CD16 антитела. Фигура 5В является результатом подобного исследования по проверке секреции IL-2, индуцированной AGEN2034w или изотипическим контролем в присутствии изотипического контроля, анти-CD16 антитела, анти-CD32 антитела или анти-CD64 антитела. Фигура 5С представляет собой график, показывающий продуцирование IL-2, индуцированное AGEN2047w с Fc-участком человеческого IgG₁ дикого типа, тремя соответствующими мутантами Fc (N297A, S267E/L328F и S239D/A330L/I332E) и их соответствующими изотипическими контролями. Показаны средние величины (величины ошибок) секретированного IL-2.

[00108] **Фигура 6** представляет собой график, показывающий продуцирование IFNγ совместной культурой человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток в отсутствие какого-либо антитела или в присутствии изотипического контрольного антитела или анти-PD-1 антитела AGEN2034w. Показаны средние величины (величины ошибок) IFNγ.

[00109] **Фигуры 7А, 7В и 7С** являются результатами анализов по измерению пролиферации стимулированных анти-CD3-антителом Т-клеток после совместного культивирования с асцитической жидкостью при раке яичников в присутствии AGEN2034w или изотипического контрольного антитела. Фигуры 7А и 7В представляют собой характерные гистограммы, показывающие флуоресценцию CFSE от CD4+ и CD8+ Т-клеток, соответственно, в присутствии AGEN2034w или изотипического контрольного антитела в концентрации 10 мкг/мл. Фигура 7С представляет собой график, показывающий результаты подобного исследования. На фигуре 7С пролиферация CD4+ Т-клеток при измерении путем разведения CFSE

нормализована к пролиферации CD4+ Т-клеток в отсутствие асцитической жидкости при раке яичников, и построен график в зависимости от концентраций антитела.

[00110] **Фигура 8** представляет собой график, показывающий реакцию в репортерном анализе Юрката-NFAT-люцифераза, вызванную анти-PD-1 антителом AGEN2034w или изотипическим контрольным антителом IgG₄. Реакцию, измеренную по экспрессии люциферазы, нормализуют к реакции, вызванной в присутствии изотипического контрольного антитела при наименьшей испытываемой концентрации (свернутая индукция), и строят график в зависимости от концентраций антитела.

[00111] **Фигуры 9А, 9В, 9С, 9D, 9Е и 9F** представляют собой графики, показывающие процент связывания рекомбинантных PD-L1-Fc и PD-L2-Fc с гранулами, соединенными с PD-1, в присутствии титрования дозы анти-PD-1 антител AGEN2001w (фигура 9А), AGEN2002w (фигура 9В), EP11_p11_B03 (фигура 9С), EP11_p11_B05 (фигура 9D), EP11_p11_C02 (фигура 9Е) или EP11_p11_C03 (фигура 9F).

[00112] **Фигура 10** представляет собой график, отображающий функциональную активность анти-PD-1 антитела AGEN2002w или изотипического контрольного IgG₁ на культурах первичных человеческих PBMC после стимуляции SEA, показанной по продуцированию IL-2. Показаны средние величины (величины ошибок) секретированного IL-2.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00113] Настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1, например, опосредованную PD-1 иммуносупрессию. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим такие антитела, нуклеиновым кислотам, кодирующим такие антитела, экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких антител и способам лечения субъекта с использованием таких антител. Антитела, раскрытые в настоящем описании, особенно применимы для усиления активации Т-клеток в ответ на антиген (например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания) и, следовательно, для лечения рака у

субъекта или лечения или предупреждения инфекционного заболевания у субъекта. Все примеры «изолированных антител», описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как антитела, которые можно изолировать, но не без необходимости. Все примеры «изолированных полинуклеотидов», описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как полинуклеотиды, которые можно изолировать, но не без необходимости. Все примеры «антител», описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как антитела, которые можно изолировать, но не без необходимости. Все примеры «полинуклеотидов», описанные в настоящем описании, дополнительно рассматриваются как полинуклеотиды, которые можно изолировать, но не без необходимости.

5.1. Определения

[00114] Используемые в настоящем описании термины «примерно» и «приблизительно», когда используются для модификации числовой величины или числового интервала, показывают, что отклонения в до 5%-10% выше и до 5%-10% ниже величины или интервала остаются в рамках предполагаемого значения названной величины или интервала.

[00115] Используемый в настоящем описании термин «PD-1» относится к белку программируемой гибели клеток 1. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности PD-1 хорошо известны в технике. Пример аминокислотной последовательности человеческого PD-1 представлен в депозите GenBank GI: 167857792.

[00116] Используемые в настоящем описании термины «антитело» и «антитела» включают полноразмерные антитела, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных антител и молекулы, включающие участки антитела CDR, VH или VL. Примеры антител включают моноклональные антитела, полученные рекомбинантно антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, включающие молекулы с двумя тяжелыми цепями и двумя легкими цепями, легкоцепной мономер антитела, тяжелоцепной мономер

антитела, легкоцепной димер антитела, тяжелоцепной димер антитела, пару легкоцепное-тяжелоцепное антитело, интрацелл, гетероконъюгаты антител, конъюгаты антитело-лекарство, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепные антитела или одноцепные Fvs (scFV), камелизованные антитела, аффитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab)'₂, дисульфидсоединенные Fvs (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, антианти-Id антитела) и антигенсвязывающие фрагменты любых из указанных выше антител. В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела могут быть любым типом (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любым классом (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любым подклассом (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}) молекулы иммуноглобулина. В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, являются антителами IgG или его класса (например, человеческим IgG₁ или IgG₄) или подкласса. В конкретном воплощении антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. В конкретном воплощении антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело. В некоторых воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, представляет собой антитело IgG₁ или IgG₂.

[00117] Используемые в настоящем описании термины «VH участок» и «VL участок» относятся к отдельным переменным участкам тяжелой и легкой цепи антитела, соответственно, включая FR (каркасные участки) 1, 2, 3 и 4 и CDR (определяющие комплементарность участки) 1, 2 и 3 (см. статью Kabat *et al.*, (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки).

[00118] Используемый в настоящем описании термин «CDR» или «определяющий комплементарность участок» обозначает непоследовательные антигенсвязывающие сайты, обнаруженные в переменном участке как тяжелоцепных, так и легкоцепных полипептидов. Такие определенные участки описаны в статьях Kabat

et al., J. Biol. Chem., 252, 6609-6616 (1977), и Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest (1991); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987), и MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol., 262: 732-745 (1996), полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок, где определения включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении одних с другими. Предпочтительно термин «CDR» относится к CDR по определению Кабат, основанном на сравнениях последовательностей. CDRH1, CDRH2 и CDRH3 обозначают CDR тяжелой цепи, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 обозначают CDR легкой цепи.

[00119] Используемый в настоящем описании термин «нумерация системы EU» относится к решению EU по нумерации для константных участков антитела, описанному в Edelman G.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969), и Kabat *et al.*, в «Sequences of Proteins of Immunological Interest», U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991, полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок.

[00120] Используемый в настоящем описании термин «аминокислотные остатки каркаса (FR)» относится к аминокислотам в каркасном участке цепи иммуноглобулина. Термин «каркасный участок» или «FR участок», используемый в настоящем описании, включает аминокислотные остатки, которые являются частью переменного участка, но не являются частью CDR (например, с использованием определения CDR по Кабат).

[00121] Используемые в настоящем описании термины «переменный участок» и «переменный домен» используются взаимозаменяемо и являются обычными в технике. Переменный участок типично относится к части антитела, как правило, части легкой или тяжелой цепи, типично, примерно 110-125 аминоконцевым аминокислотам в зрелой тяжелой цепи и примерно 90-115 аминокислотам в зрелой легкой цепи, которые значительно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности определенного антитела для его определенного антигена. Переменность в последовательности концентрируется в таких участках, называемых определяющими комплементарность участками (CDR), в то время как более

консервативные участки в переменном домене называют каркасными участками (FR). В некоторых воплощениях переменный участок является человеческим переменным участком. В некоторых воплощениях переменный участок включает CDR грызуна или мыши и человеческие каркасные участки (FR). В отдельных воплощениях переменный участок является переменным участком примата (например, примата, не являющегося человеком). В некоторых воплощениях переменный участок включает CDR грызуна или мыши и каркасные участки примата (FR) (например, примата, не являющегося человеком).

[00122] Термины «VL» и «VL домен» используются взаимозаменяемо в отношении переменного участка легкой цепи антитела.

[00123] Термины «VH» и «VH домен» используются взаимозаменяемо в отношении переменного участка тяжелой цепи антитела.

[00124] Используемый в настоящем описании термин «константный участок» и «константный домен» используются взаимозаменяемо и являются обычными в технике. Константный участок представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, который не вовлекается непосредственно в связывание антитела с антигеном, но который может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc рецептором (например, с Fc-гамма рецептором). Константный участок молекулы иммуноглобулина как правило имеет более консервативную аминокислотную последовательность относительно переменного домена иммуноглобулина.

[00125] Используемый в настоящем описании термин «тяжелая цепь», когда используется в отношении антитела, может относиться к любому определенному типу, например, альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основании аминокислотной последовательности константного домена, который дает начало классам IgA, IgD, IgE, IgG и IgM антител, соответственно, включая подклассы IgG, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ and IgG₄.

[00126] Используемый в настоящем описании термин «легкая цепь», когда используется в отношении антитела, может относиться к любому определенному типу, например, каппа (κ) или лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легких цепей хорошо известны в технике. В конкретных воплощениях легкая цепь является человеческой легкой цепью.

[00127] «Аффинность связывания» обычно относится к силе суммы всех нековалентных взаимодействий между отдельным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, при использовании в настоящем описании «аффинность связывания» относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении его партнера Y можно, как правило, представить константой диссоциации (K_D). Аффинность можно измерить и/или выразить рядом путей, известных в технике, включая, но без ограничения, константу равновесия диссоциации (K_D), и константу равновесия ассоциации (K_A). K_D вычисляют из отношения k_{off}/k_{on} , в то время, как K_A вычисляют из отношения k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, и k_{off} относится к константе скорости диссоциации, например, антитела с антигеном. Определить k_{on} и k_{off} можно методами, известными специалисту в данной области техники, такими как BIAcore® или KinExA.

[00128] Используемый в настоящем описании термин «специфически связывается с» относится к способности антитела связываться с антигеном с константой диссоциации (K_d) по меньшей мере примерно 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-10} М, 1×10^{-11} М, 1×10^{-12} М или меньше, и/или связываться с антигеном с аффинностью по меньшей мере в два раза большей, чем его аффинность в отношении неспецифического антигена. В одном воплощении молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или

полипептидами, как правило, с меньшей аффинностью при определении, например, иммуноанализами, BIAcore®, с прибором KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или другими анализами, известными в технике. В одном воплощении молекула, которая специфически связывается с антигеном, связывается с антигеном с константой ассоциации (K_A), которая по меньшей мере в $\log 2$, $\log 2,5$, $\log 3$, $\log 4$ или больше раз больше, чем K_A , когда молекула связывается неспецифически с другим антигеном. В другом воплощении молекула, которая специфически связывается с антигеном, связывается с антигеном с K_d 1×10^{-6} М или меньше, 1×10^{-7} М или меньше, 1×10^{-8} М или меньше, 1×10^{-9} М или меньше, 1×10^{-10} М или меньше, 1×10^{-11} М или меньше или 1×10^{-12} М или меньше.

[00129] В другом конкретном воплощении молекулы, которые специфически связываются с антигеном, не взаимодействуют перекрестно с другими белками в схожих условиях связывания. В другом конкретном воплощении молекулы, которые специфически связываются с PD-1, не взаимодействуют перекрестно с другими не-PD-1 белками. В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1) с большей аффинностью, чем с другим неродственным антигеном. В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1) с аффинностью на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше более высокой, чем с другим неродственным антигеном при измерении, например, методом радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или кинетического эксклюзионного анализа. В конкретном воплощении степень связывания анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании, с неродственным не-PD-1 белком, меньше на 10%, 15% или 20% связывания антитела с белком PD-1 при измерении, например, методом радиоиммуноанализа.

[00130] При использовании в настоящем описании «эпитоп» является термином, известным в технике, и относится к локализованному участку антигена, с которым может специфически

связываться антитело. Эпитоп может представлять собой, например, последовательные аминокислоты полипептида (линейный или последовательный эпитоп), или эпитоп может, например, получаться вместе из двух или большего числа непоследовательных участков полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный или непоследовательный эпитоп). В некоторых воплощениях эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить с помощью, например, ЯМР спектроскопии, исследований методом рентгеновской кристаллографии, анализов ELISA, обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с распылением электронов), сканирующего анализа с олигопептидами на основе матрицы (например, ограничивающими пептидами с использованием CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds) для картирования прерывистых или конформационных эпитопов) и/или картирования при мутагенезе (например, картирование при сайтнаправленном мутагенезе). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно выполнять с использованием любого метода, известного в технике (например, Giegé R. *et al.* (1994), *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50(Pt 4): 339-350; McPherson A. (1990), *Eur. J. Biochem.*, 189: 1-23; Chayen NE (1997), *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A. (1976), *J. Biol. Chem.*, 251: 6300-6303, все работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Кристаллы антитело:антиген можно исследовать с использованием хорошо известных методов рентгенографии и можно уточнить с использованием компьютерной программы, такой как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяемой Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth. Enzymol.* (1985), volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; U.S. 2004/0014194), и BUSTER (Bricogne G. (1993), *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G. (1997), *Meth. Enzymol.*, 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P. *et al.* (2000), *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 56(Pt 10): 1316-1323, все работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Исследование картированием при мутагенезе можно выполнять с использованием любого метода, известно специалисту в данной

области техники. См., например, Champe M. *et al.* (1995), *J. Biol. Chem.*, 270: 1388-1394; и Cunningham BC & Wells JA (1989), *Science*, 244: 1081-1085, обе работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок, на предмет описания методов мутагенеза, включая методы сканирования аланином при мутагенезе. CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds) является технологией для представления одного или нескольких пептидов в структурно ограниченной конфигурации, с поведением функциональных миметиков комплексных белковых доменов. См., например, публикации заявок на патент США №№ US 2008/0139407 A1 и US 2007/099240 A1, и патент США № 7972993, полностью включенные в настоящее описание в качестве ссылок. В конкретном воплощении эпитоп антитела определяют с использованием исследований мутагенеза сканированием аланином. В конкретном воплощении эпитоп антитела определяют с использованием обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией. В конкретном воплощении эпитоп антитела определяют с использованием технологии картирования эпитопов CLIPS Epitope Mapping Technology от Pepscan Therapeutics.

[001] Используемые в настоящем описании термины «Т-клеточный рецептор» и «TCR» используются взаимозаменяемо и относятся к полноразмерным $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ TCR, антигенсвязывающим фрагментам полноразмерных TCR и молекулам, включающим CDR или переменные участки TCR. Примеры TCR включают, но без ограничения, полноразмерные TCR, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных TCR, растворимые TCR, утрачивающие трансмембранные и цитоплазматические участки, одноцепные TCR, содержащие переменные участки TCR, соединенные гибким линкером, цепи TCR, соединенные инженерной дисульфидной связью, моноспецифические TCR, мультиспецифические TCR (включая биспецифические TCR), гибриды TCR, человеческие TCR, гуманизированные TCR, полученные рекомбинатно TCR и синтетические TCR. Термин охватывает TCR дикого типа и TCR, полученные генной инженерией (например, химерные TCR, включающие химерную цепь TCR, которая включает первую часть из TCR первого

вида и вторую часть из TCR второго вида).

[002] Используемые в настоящем описании термины «главный комплекс гистосовместимости» и «МНС» используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле класса I МНС и/или молекуле класса II МНС.

[003] Используемый в настоящем описании термин «комплекс пептид-МНС» относится к молекуле МНС (МНС класса I или МНС класса II) с пептидом, привязанным в узнаваемом пептидсвязывающем участке МНС.

[00131] Используемые в настоящем описании термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к терапевтическим или превентивным мерам, описанным в настоящем описании. В способах «лечения» используется введение антитела субъекту с заболеванием или расстройством или с предположением о наличии такого заболевания или расстройства для предотвращения, излечения, замедления, уменьшения тяжести или ослабления одного или нескольких симптомов заболевания или расстройства или рецидивирующего заболевания или расстройства, или для того, чтобы пролонгировать продолжительность существования субъекта сверх ожидаемого в отсутствие такого лечения.

[00132] Используемый в настоящем описании термин «эффективное количество» в контексте назначения терапии субъекту относится к количеству терапии, с которым достигается желательное профилактическое или терапевтическое действие.

[00133] Используемый в настоящем описании термин «субъект» включает любого человека или животное, не являющееся человеком. В предпочтительном воплощении субъектом является человек или млекопитающее, не являющееся человеком, предпочтительнее человек.

[00134] Определение «процентной идентичности» между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или нуклеотидными последовательностями) можно выполнить с использованием математического алгоритма. Конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin S. & Altschul SF (1990), PNAS, 87: 2264-2268,

модифицированный в Karlin S. & Altschul SF (1993), PNAS, 90: 5873-5877, включенных полностью в настоящее описание в качестве ссылок. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, Altschul SF *et al.*, (1990), J. Mol. Biol., 215: 403, полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Поиск нуклеотидов в BLAST можно выполнить с набором параметров программы нуклеотидов NBLAST, например, для оценки=100, длина слова=12, и получить нуклеотидные последовательности, гомологичные молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в настоящем описании. Поиск белков в BLAST можно выполнить с набором параметров программы XBLAST, например, для оценки 50, длина слова=3, и получить аминокислотные последовательности, гомологичные молекулам белков, описанным в настоящем описании. Для того, чтобы получить выравнивания с добавлением гэпов для целей сравнения, можно использовать BLAST с добавлением гэпов, как описано в статье Altschul SF *et al.* (1997), Nuc. Acids Res., 25: 3389-3402, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. С другой стороны, можно использовать PSI BLAST для выполнения повторного поиска, который обнаруживает слабые соотношения между молекулами (там же). Когда используют программы BLAST, BLAST с добавлением гэпов и PSI Blast, можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, National Center for Biotechnology Information (NCBI) во всемирной паутине, ncbi.nlm.nih.gov). Другим конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Маерса и Миллера, 1988, CABIOS, 4:11-17, работа полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ для выравнивания последовательностей GCG. Когда программу ALIGN используют для сравнения аминокислотных последовательностей, можно использовать таблицу взвешенных остатков PAM120, штраф за длину гэта 12 и штраф за гэта 4.

[00135] Процентную идентичность между двумя последовательностями можно определить с использованием методов,

схожих с методами, описанными выше, с или без учета гэпов. При вычислении процентной идентичности типично посчитывают только точные совпадения.

5.2. Анти-PD-1 антитела

[00136] В одном аспекте настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и антагонизируют функцию PD-1. Аминокислотные последовательности примеров антител приводятся в настоящем описании в таблицах 1-6.

Таблица 1. Последовательности переменных участков, CDR и FR примеров анти-PD-1 антител

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
1	AGEN2033w, Кабат CDRH1	SYGMH
2	AGEN2033w, Кабат CDRH2	VIWYDGSNKYYADSVKG
3	AGEN2033w, Кабат CDRH3	NVDY
4	AGEN2033w, Кабат CDRL1	RASQSVSSNLA
5	AGEN2033w, Кабат CDRL2	GASTRAT
6	AGEN2033w, Кабат CDRL3	QQYNNWPRT
7	AGEN2034w, Кабат CDRH3	NGDH
8	AGEN2033w IMGT CDRH1	GFTFSSYG
9	AGEN2033w IMGT CDRH2	IWYDGSNK
10	AGEN2033w IMGT CDRH3	ASNVDY
11	AGEN2033w IMGT CDRL1	QSVSSN
12	AGEN2033w IMGT CDRL2	GAS
13	AGEN2033w IMGT CDRL3	QQYNNWPRT
14	AGEN2034w IMGT CDRH3	ASNGDH
15	AGEN2033w, AGEN2046w VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNVDYWGQ GTLVTVSS

16	AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPRTFGQGTKVE IK
17	AGEN2034w, AGEN2047w VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSS
18	AGEN2033w, тяжелая цепь IgG4 S228P	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
52	AGEN2033w, тяжелая цепь IgG4 S228P (без C- концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG
19	AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w, легкая цепь	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPRTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC

20	AGEN2034w, тяжелая цепь IgG4 S228P	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLS SSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTP EVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
53	AGEN2034w, тяжелая цепь IgG4 S228P (без С- концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLS SSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTP EVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG
21	AGEN2046w, тяжелая цепь IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNVDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLS SSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	AGEN2046w, тяжелая цепь IgG1 (без С-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNVDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLS SSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

22	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLS SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
55	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 (без С-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLS SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
23	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 N297A	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLS SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 N297A (без С- концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YLS SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

24	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S267E/L328F	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWDGSGNKKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKAFPPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S267E/L328F (без С-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWDGSGNKKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKAFPPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
25	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S239D/A330L/I332E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWDGSGNKKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTIKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
58	AGEN2047w, тяжелая цепь IgG1 S239D/A330L/I332E (без С-концевого лизина)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWDGSGNKKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTIKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

26	AGEN2001w (BADD426-2614)	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCATNGDYWGQ GTLVTVSS
27	AGEN2002w (BADD426-2615)	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDYWGQ GTLVTVSS
28	EP11_p11_B03 (BADD438-2743)		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNEYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSS
29	EP11_p11_B05 (BADD438-2745)		QVQLVESGGGMVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WFDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSS
30	EP11_p11_C02 (BADD438-2746)		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGH GTLVTVSS
31	EP11_p11_C03 (BADD438-2747)		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVMGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSS
32	Консенсус CDRH2		VIWX ₁ DGSNX ₂ YYADSVX ₃ G X ₁ является Y или F; X ₂ является K или E; и X ₃ является K или M
33	Консенсус CDRH3		NX ₁ DX ₂ X1 является G или V; и X2 является H или Y
34	CDRH2		VIWYDGSNEYADSVKG
35	CDRH2		VIWFDGSNKYYADSVKG
36	CDRH2		VIWYDGSNKYYADSVMG
37	CDRH3		NGDY
38	VH FR1		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFS
39	VH FR1		QVQLVESGGGMVQPGRSLRLS CAASGFTFS
40	VH FR2		WVRQAPGKGLEWVA
41	VH FR3		RFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS
42	VH FR3		RFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAT
43	VH FR4		WGQGTLVTVSS
44	VH FR4		WGHGTLVTVSS
45	VL FR1		EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
46	VL FR2		WYQQKPGQAPRLLIY
47	VL FR3		GIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLSQSEDAVYYC
48	VL FR4		FGQGTKVEIK

49	Консенсусная последовательность VH	QVQLVESGGGX ₁ VQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWX ₂ DGSNX ₃ YYADSVX ₄ GR FTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAX ₅ NX ₆ D X ₇ WX ₈ GTLVTVSS X ₁ является V или M, X ₂ является Y или F, X ₃ является K или E, X ₄ является K или M, X ₅ является S или T, X ₆ является G или V, X ₇ является H или Y, и X ₈ является Q или H
50	IGHV3-33*01, зародышевая последовательность	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR
51	IGKV3-15*01, зародышевая последовательность	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP
59	Аллотип G1m3 человеческого IgG1 (без C-концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
60	Аллотип G1m3 человеческого IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
61	IgG1 N297A (без C-концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG

62	IgG1 N297A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTF EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
63	IgG4 S228P (без С-концевого лизина)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG
64	IgG4 S228P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK
65	Константный участок человеческой легкой цепи каппа IGKC*01, аллотип Km3	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC

Таблица 2. Последовательности CDR тяжелых цепей примеров анти-PD-1 антител¹

Антитело	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NVDY (3)
AGEN2034w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDH (7)
AGEN2001w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDY (37)
AGEN2002w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDY (37)
EP11_p11_B0 3	SYGMH (1)	VIWYDGSNEYADSVKG (34)	NGDH (7)

EP11_p11_B0 5	SYGMH (1)	VIWFDGSNKYYADSVKG (35)	NGDH (7)
EP11_p11_C0 2	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDH (7)
EP11_p11_C0 3	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVMG (36)	NGDH (7)

¹CDRs VH в таблице 2 определены по Кабат.

Таблица 3. Последовательности CDR легких цепей примеров анти-PD-1 антител²

Антитело	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2034w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2001w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2002w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_p11_B03	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_p11_B05	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_p11_C02	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_p11_C03	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)

²CDRs VL в таблице 3 определены по Кабат.

Таблица 4. Каркасные (FR) последовательности VH примеров анти-PD-1 антител³

Антитело	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN2033 w	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQ MNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGLVTV SS (43)
AGEN2034 w	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQ MNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGLVTV SS (43)
AGEN2001 w	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQ MNS LRAEDTAVYYCAT (42)	WGQGLVTV SS (43)
AGEN2002 w	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQ MNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGLVTV SS (43)

EP11_p11 _B03	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGLVTV SS (43)
EP11_p11 _B05	QVQLVESGGGMVQPGRS LRLSCAASGFTFS (39)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGLVTV SS (43)
EP11_p11 _C02	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGHGLVTV SS (44)
EP11_p11 _C03	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS (38)	WVRQAPGKGL EWVA (40)	RFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAS (41)	WGQGLVTV SS (43)

³Каркасные участки VH, описанные в таблице 4, определены на основе границ по системе нумерации по Кабат для CDR. Иными словами, CDR VH определены по Кабат, и каркасные участки представляют собой аминокислотные последовательности, окружающие CDR в переменном участке в формате FR1, CDRH1, FR2, CDRH2, FR3, CDRH3 и FR4.

Таблица 5. Каркасные (FR) последовательности VL примеров анти-PD-1 антител⁴

Антитело	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN2033 w	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2034 w	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2001 w	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2002 w	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11 _B03	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11 _B05	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC	FGQGTKVEIK (48)

			(47)	
EP11_p11 _C02	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11 _C03	EIVMTQSPATLSVSP GERATLSC (45)	WYQQKPGQAPR LLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)

⁴Каркасные участки VL, описанные в таблице 5, определены на основе границ по системе нумерации по Кабат для CDR. Иными словами, CDR VL определены по Кабат, и каркасные участки представляют собой аминокислотные последовательности, окружающие CDR в переменном участке в формате FR1, CDRL1, FR2, CDRL2, FR3, CDRL3 и FR4.

Таблица 6. Последовательности VH и VL примеров анти-PD-1 антител

Антитело	Вариабельный участок тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Вариабельный участок легкой цепи	SEQ ID NO:
AGEN2033w	BADD438-2742	15	3738	16
AGEN2034w	BADD438-2744	17	3738	16
AGEN2001w	BADD426-2614	26	3738	16
AGEN2002w	BADD426-2615	27	3738	16
EP11_p11_B03	BADD438-2743	28	3738	16
EP11_p11_B05	BADD438-2745	29	3738	16
EP11_p11_C02	BADD438-2746	30	3738	16
EP11_p11_C03	BADD438-2747	31	3738	16

Таблица 7. Примеры последовательностей PD-1

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
74	Пример зрелой последовательности PD-1	PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEDGNATFTCSFSN TSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFR VTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAI SLAPKAQI KESLRAELRVTEERRAEVPTAHPSPPRAGQFQTLVVG VVGLLGSLVLLVWVLAVICRAARGTIGARRTGQPLK EDPSAVPVFVSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEY ATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSW PL
75	Эпитоп PD-1 (остатки 107-122)	SLAPKAQIKESLRAEL

76	Эпитоп PD-1 (остатки 5-22)	LDSPDRPWNPPTFSPALL
77	Эпитоп PD-1 (остатки 6-15)	DSPDRPWNP
78	Эпитоп PD-1 (остатки 130-138)	EVPTAHNPSP
79	Эпитоп PD-1 (остатки 106-113)	ISLAPKAQ

[00137] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем

(a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1); и/или

(b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), в которой

X₁ является Y или F;

X₂ является K или E; и

X₃ является K или M; и/или

(c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), в которой

X₁ является G или V; и

X₂ является H или Y; и/или

(d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); и/или

(e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и/или

(f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[00138] В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH, описанные выше. В некоторых воплощениях антитело включает CDRH1 одного из антител из таблицы 2. В некоторых воплощениях антитело включает CDRH2 одного из антител из таблицы 2. В некоторых воплощениях антитело включает CDRH3 одного из антител из таблицы 2. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH одного из антител из таблицы 2 (например, CDR VH из одного ряда в таблице 2, например, все CDR VH из AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых

воплощениях антитело включает каркасные участки VH, описанные в настоящем описании. В некоторых воплощениях антитело включает каркасные участки VH антитела, представленные в таблице 4 (например, один, два, три или четыре каркасных участка из одного ряда в таблице 4).

[00139] В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VL, описанные выше. В некоторых воплощениях антитело включает CDRL1 одного из антител из таблицы 3. В некоторых воплощениях антитело включает CDRL2 одного из антител из таблицы 3. В некоторых воплощениях антитело включает CDRL3 одного из антител из таблицы 3. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VL одного из антител из таблицы 3 (например, CDR VL из одного ряда в таблице 3, например, все CDR VL из AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях антитело включает каркасные участки VL, описанные в настоящем описании. В некоторых воплощениях антитело включает каркасные участки (FR) VL антитела, представленные в таблице 5 (например, один, два, три или четыре каркасных участка из одного ряда в таблице 5).

[00140] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем

(a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1);

(b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), в которой

X₁ является Y или F;

X₂ является K или E; и

X₃ является K или M;

(c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), в которой

X₁ является G или V; и

X_2 является Нилиг Y;

(d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4);

(e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и

(f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[00141] В некоторых воплощениях CDRH2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 34-36. В некоторых воплощениях CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 7 и 37.

[00142] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариабельный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 1, 2 и 7 и 1, 2 и 37; 1, 34 и 7; 1, 35 и 7 или 1, 36 и 7.

[00143] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариабельный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, соответственно представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6; 1, 2, 7, 4, 5 и 6; 1, 2, 37, 4, 5 и 6; 1, 34, 7, 4, 5 и 6; 1, 35, 7, 4, 5 и 6 или 1, 36, 7, 4, 5 и 6, соответственно.

[00144] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему

(a) CDRH1, включающий аминокислотную последовательность

SYGMH (SEQ ID NO: 1); и/или

(b) CDRH2, включающий аминокислотную последовательность VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); и/или

(c) CDRH3 включающий аминокислотную последовательность NVDY (SEQ ID NO: 3) или NGDH (SEQ ID NO: 7); и/или

(d) CDRL1, включающий аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); и/или

(e) CDRL2, включающий аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5); и/или

(f) CDRL3, включающий аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[00145] В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VH, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 7. В некоторых воплощениях антитело включает один, два или все три CDR VL, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6.

[00146] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариабельный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно.

[00147] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариабельный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 7, соответственно.

[00148] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему вариабельный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарность участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают

аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно.

[00149] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно.

[00150] В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 7, 4, 5 и 6, соответственно.

[00151] В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно схеме нумерации Хотиа, относящейся к местоположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C. & Lesk AM, (1987), *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917; Al-Lazikani B. *et al.* (1997), *J. Mol. Biol.*, 273: 927-948; Chothia C. *et al.* (1992), *J. Mol. Biol.*, 227: 799-817; Tramontano A. *et al.* (1990), *J. Mol. Biol.*, 215(1): 175-82; и патент США № 7709226, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Типично при использовании системы нумерации по Кабат петля Хотиа CDRH1 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 26-32, 33 или 34, петля Хотиа CDRH2 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 52-56, и петля Хотиа CDRH3 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи 95-102, в то время как петля Хотиа CDRL1 присутствует в аминокислотах легкой цепи 24-34, петля Хотиа CDRL2 присутствует в аминокислотах легкой цепи 50-56, и петля Хотиа CDRL3 присутствует в аминокислотах легкой цепи 89-97. Конец петли Хотиа CDRH1 при нумерации с использованием системы нумерации по Кабат, варьирует между H32 и H34, в зависимости от длины петли (это потому, что схема нумерации по Кабат помещает вставки в H35A и H35B; если ни H35A ни H35B не присутствует, петля заканчивается в 32; если присутствует только H35A, петля заканчивается в 33; если

присутствует как 35А, так и 35В, петля заканчивается в 34).

[00152] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему CDR VL по Хотиа VL антитела, раскрытого в настоящем описании в таблице 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает CDR VH по Хотиа антитела, раскрытого в настоящем описании в таблице 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает CDR VH по Хотиа и CDR VL по Хотиа антитела, раскрытых в настоящем описании в таблице 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w). В некоторых воплощениях антитела, которые специфически связываются с человеческим PD-1, включают один или больше CDR, в которых CDR Хотиа и Кабат имеют одну и ту же аминокислотную последовательность. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и включает комбинации CDR Хотиа и CDR Кабат.

[00153] В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно системе нумерации IMGT, описанной в Lefranc M-P, (1999), *The Immunologist.*, 7: 132-136, и в Lefranc M-P *et al.* (1999), *Nucleic Acids Res.*, 27: 209-212, полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок. Согласно системе нумерации IMGT, CDRH1 находится в позициях 26-35, CDRH2 находится в позициях 51-57, CDRH3 находится в позициях 93-102, CDRL1 находится в позициях 27-32, CDRL2 находится в позициях 50-52, и CDRL3 находится в позициях 89-97. В отдельном воплощении настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и включают CDR антитела, раскрытого в настоящем описании в таблице 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w), определенного по системе нумерации IMGT, например, как описано в Lefranc M-P (1999), *цит. выше*, и в

Lefranc M-P *et al.* (1999) *цит. выше.*

[00154] В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно работе MacCallum RM *et al.* (1996), *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. См. также, например, труд Martin A. «Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains», в *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001), полностью включенный в настоящее описание в качестве ссылки. В отдельном воплощении настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и включают CDR антитела, раскрытого в настоящем описании в таблице 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w), определенные методом по MacCallum RM *et al.* (1996), *цит. выше.*

[00155] В некоторых воплощениях CDR антитела можно определить согласно системе нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным участкам AbM, которая представляет собой компромисс между CDR по Кабат и структурными петлями по Хотиа, и использована в Оксфордской программе молекулярного моделирования AbM (Oxford Molecular Group, Inc.), полностью включенный в настоящее описание в качестве ссылки. В отдельном воплощении настоящее раскрытие относится к антителам, которые специфически связываются с человеческим PD-1 и включают CDR антитела, раскрытого в настоящем описании в таблице 6 (например, AGEN2033w или AGEN2034w), определенные по схеме нумерации AbM.

[00156] Соответственно, в некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности участков CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 15, и аминокислотные последовательности участков CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 16, причем каждый CDR определен согласно определению по Кабат, определению по Хотиа, комбинации определения по Кабат и определения по Хотиа, системе нумерации IMGT, определению AbM или контактному определению CDR.

[00157] Соответственно, в некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотные последовательности участков CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные в SEQ ID NO: 17, и аминокислотные последовательности участков CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные в SEQ ID NO: 16, причем каждый CDR определен согласно определению по Кабат, определению по Хотиа, комбинации определения по Кабат и определения по Хотиа, системе нумерации IMGT, определению AbM или контактному определению CDR.

[00158] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 и 13, соответственно.

[00159] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем участки CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8, 9, 14, 11, 12 и 13, соответственно.

[00160] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49.

[00161] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически

связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33. Один или несколько участков, выбранных из каркаса 1, каркаса 2, каркаса 3, CDRH1 и CDRH2 (например, два, три, четыре или пять таких участков), могут быть получены из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33. В одном воплощении каркас 1, каркас 2, каркас 3, CDRH1 и CDRH2 все получены из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NOs: 15, 17 и 26-31. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29. В некоторых воплощениях антитело

[00162] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15. Один или несколько участков, выбранных из каркаса 1, каркаса 2, каркаса 3, CDRL1 и CDRL2 (например, два, три, четыре или пять таких участков), могут быть получены из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15. В одном воплощении каркас 1, каркас 2, каркас 3, CDRL1 и CDRL2 все получены из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19.

[00163] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающему переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17, и переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, представленной

в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

[00164] В некоторых воплощениях антитело включает аминокислотные последовательности переменного участка тяжелой цепи и переменного участка легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16; 17 и 16; 26 и 16; 27 и 16; 28 и 16; 29 и 16; 30 и 16 или 31 и 16, соответственно. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16. В некоторых воплощениях антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, и переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, представленную

NO: 19. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых воплощениях антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

[00165] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16, соответственно.

[00166] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16, соответственно.

[00167] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 17 и 16, соответственно.

[00168] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем

же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 17 и 16, соответственно.

[00169] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 26 и 16, соответственно.

[00170] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 26 и 16, соответственно.

[00171] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 27 и 16, соответственно.

[00172] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 27 и 16, соответственно.

[00173] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 28 и 16, соответственно.

[00174] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем

же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 28 и 16, соответственно.

[00175] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 29 и 16, соответственно.

[00176] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 29 и 16, соответственно.

[00177] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 30 и 16, соответственно.

[00178] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 30 и 16, соответственно.

[00179] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом, включающим аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 31 и 16, соответственно.

[00180] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое связывается с тем

же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело, включающее аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 31 и 16, соответственно.

[00181] Любой константный участок Ig можно использовать в антителах, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях участок Ig является человеческим константным участком тяжелой цепи IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. В некоторых воплощениях участок Ig является человеческим IgG₁. В некоторых воплощениях участок Ig является человеческим IgG₄. В некоторых воплощениях Ig (например, IgG₁) утрачивает N-соединенную гликановую группу, которая обычно присутствует в позиции N297 (согласно нумерации системы EU) в зрелых антителах IgG₁ дикого типа *in vivo*. Отсутствие гликана N297 приводит к существенной потере эффекторной функции. Устранения гликана N297 можно достигнуть с использованием любых методов, известных в технике. Например, в некоторых воплощениях устранения гликана N297 достигают мутацией остатка N297 для удаления сайта гликозилирования. Соответственно, в некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию N297A согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию N297Q согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию D265A согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитела, раскрытые в настоящем описании, включают константный участок тяжелой цепи (например, константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁), включающий мутацию S228P согласно нумерации системы EU.

[00182] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически

связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63, или 64. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

[00183] В некоторых воплощениях участки IgG антител, описанных в настоящем описании, имеют повышенную аффинность в отношении CD32B (также известного как FcγRIIB или FCGR2B),

например, по сравнению с антителом с Fc-участком дикого типа, например, IgG₁ Fc. В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, имеют селективно повышенную аффинность в отношении CD32B (FcγRIIB) как по сравнению с CD32A (FcγRIIA), так и CD16 (FcγRIIIA). Изменения последовательности, которые приводят к повышенной аффинности для CD32B, известны в технике, см., например, работы Mimoto *et al.*, *Protein Engineering, Design & Selection*, 10: 589-598 (2013); Chu *et al.*, *Molecular Immunology*, 45: 3926-3933 (2008), и Strohl, *Current Opinion in Biology* 20: 685-691 (2009), которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий мутацию, выбранную из группы, включающей G236D, P238D, S239D, S267E, L328F и L328E и их комбинации, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий замены S267E и L328F, нумерованные согласно системе нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий замены P238D и L328E, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий замену P238D и замены, выбранные из группы, включающей E233D, G237D, H268D, P271G, A330R и их комбинации, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий замены P238D, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий G236D и S267E, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи,

например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий S239D и S267E, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий V262E, S267E и L328F, нумерованные согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях антитело включает константный участок тяжелой цепи, например, константный участок IgG₁, или его фрагмент, включающий V264E, S267E и L328F, нумерованные согласно нумерации системы EU.

[00184] В некоторых воплощениях одну, две или больше мутаций (например, замен аминокислот) вводят в Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании (например, домен CH2 (остатки 231-340 человеческого IgG₁) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG₁) и/или шарнирный участок, нумерованные согласно нумерации системы EU), для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антигензависимая клеточная токсичность.

[00185] В некоторых воплощениях одну, две или больше мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в шарнирный участок Fc-участка (домен CH1) так, что изменяется число цистеиновых остатков в шарнирном участке (например, возрастает или снижается), как описано, например, в патенте США № 5677425, полностью включенном в настоящее описание в качестве ссылки. Число цистеиновых остатков в шарнирном участке может быть изменено для того, чтобы, например, облегчить сборку легкой и тяжелой цепей или изменить (например, повысить или снизить) устойчивость антитела.

[00186] В конкретном воплощении одну, две или больше мутаций по аминокислотам (например, аминокислотных замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно шарнирный домен Fc или фрагмент шарнирного домена Fc) для изменения (например, снижения или повышения) времени полужизни антитела *in vivo*. См., например, международные публикации №№ WO 02/060919, WO 98/23289 и WO 97/34631 и патенты США №№ 5869046, 6121022, 6277375 и

6165745, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок, например, на предмет примеров мутаций, которые будут изменять (например, снижать или повышать) время полужизни антитела *in vivo*. В некоторых воплощениях одну, две или больше мутаций по аминокислотам (например, аминокислотных замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно шарнирный домен Fc или фрагмент шарнирного домена Fc) для снижения времени полужизни антитела *in vivo*. В других воплощениях одну, две или больше мутаций по аминокислотам (например, аминокислотных замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно шарнирный домен Fc или фрагмент шарнирного домена Fc) для повышения времени полужизни антитела *in vivo*. В конкретном воплощении антитела могут иметь одну или несколько мутаций по аминокислотам (например, замен) во втором константном (CH2) домене (остатки 231-340 человеческого IgG₁) и/или третьем (CH3) домене (остатки 341-447 человеческого IgG₁), нумерованы согласно нумерации системы EU. В конкретном воплощении константный участок IgG₁ антитела, описанного в настоящем описании, включает замену метионина (M) на тирозин (Y) в позиции 252, замену серина (S) на треонин (T) в позиции 254 и замену треонина (T) на глутаминовую кислоту (E) в позиции 256, при нумерации согласно нумерации системы EU. См. патент США № 7658921, полностью включенный в настоящее описание в качестве ссылки. Показано, что такой тип мутантного IgG, называемого «мутант YTE», отображает время полужизни, возросшее в четыре раза по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. статью Dall'Acqua WF *et al.* (2006), J. Biol. Chem., 281: 23514-24, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки). В некоторых воплощениях антитело включает константный домен IgG, включающий одну, две, три или больше аминокислотных замен аминокислотных остатков в позициях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, нумерованных согласно нумерации системы EU.

[00187] В некоторых воплощениях одну, две или больше

мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании (например, домен CH2 (остатки 231-340 человеческого IgG₁) и/или домен CH3 (остатки 341-447 человеческого IgG₁) и/или шарнирный участок, нумерованные согласно нумерации системы EU), для повышения или снижения аффинности антитела в отношении Fc-рецептора (например, активированного Fc-рецептора) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-участке антитела, которые снижают или повышают аффинность антитела в отношении Fc-рецептора, и методы введения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалисту в данной области техники. Примеры мутаций Fc-рецептора антитела, которые можно осуществить для изменения аффинности антитела в отношении Fc-рецептора описаны в, например, Smith P. *et al.* (2012), PNAS, 109: 6181-6186; патенте США № 6737056 и Международных публикациях №№ WO 02/060919, WO 98/23289 и WO 97/34631, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00188] В другом воплощении одну, две или больше аминокислотных замен вводят в Fc-участок константного домена IgG для изменения функции(й) антитела. Например, одну, две или больше аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, нумерованных согласно нумерации системы EU, можно заменить другим аминокислотным остатком так, что антитело имеет измененную аффинность в отношении эффекторного лиганда, но сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменилась, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 комплемента. Такой подход описан в деталях в патентах США №№ 5624821 и 5648260, которые оба полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В некоторых воплощениях делеция или инактивация (через точечную мутацию или иными способами) константного домена может ослабить связывание Fc-рецептора циркулирующим антителом, причем посредством этого усиливается локализация опухоли. См., например, патенты США №№ 5585097 и 8591886, каждый из которых полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки, где

описаны мутации, которые делегируют или инактивируют константный домен и посредством этого усиливают локализацию опухоли. В некоторых воплощениях одна, две или больше аминокислотных замен могут быть введены в Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании, для удаления возможных сайтов гликозилирования в Fc-участке, которые могут ослабить связывание Fc-рецептора (см., например, Shields RL *et al.* (2001), *J. Biol. Chem.*, 276: 6591-604, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки). В различных воплощениях в константном участке антитела, описанного в настоящем описании, можно осуществить одну или несколько следующих мутаций: замена N297A; замена N297Q; замена L235A и L237A; замена L234A и L235A; замена E233P; замена L234V; замена L235A; делеция C236; замена P238A; замена D265A; замена A327Q или замена P329A, нумерация согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях в константном участке антитела, описанного в настоящем описании, может быть осуществлена мутация, выбранная из группы, включающей D265A, P329A и их комбинацию, при нумерации согласно нумерации системы EU.

[00189] В конкретном воплощении антитело, описанное в настоящем описании, включает константный домен IgG₁ с аминокислотной заменой N297Q или N297A при нумерации согласно нумерации системы EU. В одном воплощении антитело, описанное в настоящем описании, включает константный домен IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, включающей D265A, P329A и их комбинацию при нумерации согласно нумерации системы EU. В другом воплощении антитело, описанное в настоящем описании, включает константный домен IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, включающей L234A, L235A и их комбинацию при нумерации согласно нумерации системы EU. В некоторых воплощениях аминокислотные остатки в константном участке антитела, описанного в настоящем описании, в позициях, соответствующих позициям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG₁, при нумерации согласно нумерации системы EU, не являются L, L и D, соответственно. Такой подход описан подробно в международной публикации № WO 14/108483, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В отдельном воплощении аминокислоты, соответствующие позициям

L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG₁, представляют собой F, E и A или A, A и A, соответственно, при нумерации согласно нумерации системы EU.

[00190] В некоторых воплощениях одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 433 в константном участке антитела, описанного в настоящем описании, при нумерации согласно нумерации системы EU, могут быть заменены другим аминокислотным остатком так, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или пониженную или отмененную комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Такой подход подробнее описан в патенте США № 6194551 (*Idusogie et al.*), который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых воплощениях один или несколько аминокислотных остатков в аминокислотных позициях 231-238 в N-концевом участке домена CH2 антитела, описанного в настоящем описании, изменены для того, чтобы посредством этого изменить способность антитела фиксировать комплемент, при нумерации согласно нумерации системы EU. Такой подход дополнительно описан в международной публикации № WO 94/29351, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых воплощениях Fc-участок антитела, описанного в настоящем описании, модифицирован для усиления способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или повышения аффинности антитела в отношении Fcγ-рецептора путем мутирования одной или нескольких аминокислот (например, введения аминокислотных замен) в следующих позициях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439, нумерованных согласно нумерации системы EU. Такой подход дополнительно описан в международной публикации № WO 00/42072, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[00191] В некоторых воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, включает константный участок антитела IgG₄, и серин в аминокислотном остатке 228 тяжелой цепи, нумерованный согласно нумерации системы EU, заменен на пролин. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

[00192] В некоторых воплощениях любую из мутаций или модификаций константного участка, описанных в настоящем описании, можно внести в один или два константных участка антитела, описанного в настоящем описании, имеющего два константных участка тяжелой цепи.

[00193] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и функционирует как антагонист.

[00194] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает активность PD-1 по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании, и/или известными специалисту в данной области техники, относительно активности PD-1 без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое неспецифически связывается с человеческим PD-1). В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает активность PD-1 по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20

раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании, и/или известными специалисту в данной области техники, относительно активности PD-1 без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). Неограничивающие примеры активности PD-1 могут включать передачу сигнала PD-1, связывание PD-1 с лигандом PD-1 (например, PD-L1 или PD-L2), ингибирование продуцирования цитокинов (например, IL-2 или IFN γ) и ингибирование пролиферации Т-клеток. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и дезактивирует, снижает или ингибирует активность PD-1. В конкретных воплощениях активность PD-1 оценивают так, как описано в примерах, см. ниже.

[00195] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает связывание PD-1 с его лигандом (например, PD-L1 или PD-L2) по меньшей мере примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно связывания PD-1 с его лигандом (например, PD-L1 или PD-L2) без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и снижает связывание PD-1 с его лигандом (например, PD-L1 или PD-L2) по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно связывания PD-1 с его

лигандом (например, PD-L1 или PD-L2) без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00196] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2 или IL- γ) по меньшей мере примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2 или IFN γ) по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже) или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00197] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1, и или одно или в комбинации с анти-CTLA-4 антителом (например, ипилимумабом или тремелимумабом), анти-TIGIT антителом, анти-CD137 антителом (например, урелумабом или утомилумабом) или анти-OX40 антителом (например, погализумабом или таволиксизумабом) повышает продуцирование IL-2 в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC) в ответ на стимуляцию стафилококковым

энтеротоксином А (SEA), по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования IL-2 без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00198] В некоторых воплощениях мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), стимулированные стафилококковым энтеротоксином А (SEA), в присутствии антитела, описанного в настоящем описании, которое специфически связывается с человеческим PD-1, или одного или в комбинации с анти-CTLA-4 антителом (например, ипилимумабом или тремелиумабом), анти-TIGIT антителом, анти-CD137 антителом (например, урелумабом или утомилумабом) или анти-OX40 антителом (например, погализумабом или таволиксизумабом), имеют продуцирование IL-2, повышенное примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз относительно PBMC, стимулированных только SEA без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1), при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники.

[00199] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает продуцирование IFN γ совместной культуры человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза,

4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно продуцирования IFN γ совместной культуры человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00200] В некоторых воплощениях совместная культура человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток в присутствии антитела, описанного в настоящем описании, которое специфически связывается с человеческим PD-1, имеет продуцирование IFN γ , повышенное по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз относительно совместной культуры человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1), при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники.

[00201] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает пролиферацию Т-клеток по меньшей мере примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно пролиферации Т-клеток без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1). В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к

изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает пролиферацию Т-клеток по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно пролиферации Т-клеток без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00202] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и повышает пролиферацию стимулированных анти-CD3-антителом CD4+ или CD8+ Т-клеток, культивированных совместно с асцитической жидкостью при раке яичников, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно пролиферации стимулированных анти-CD3-антителом CD4+ или CD8+ Т-клеток, культивированных совместно с асцитической жидкостью при раке яичников, без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

[00203] В конкретных воплощениях настоящее раскрытие относится к изолированному антителу, которое специфически связывается с человеческим PD-1 и усиливает передачу сигнала NFAT в PD-1-экспрессирующих NFAT-люциферазы репортерных клетках, культивированных совместно с PD-1-экспрессирующими клетками-мишенями, по меньшей мере примерно в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100

раз, при оценке методами, описанными в настоящем описании (см. примеры ниже), или известными специалисту в данной области техники, относительно передачи сигнала NFAT в PD-1-экспрессирующих NFAT-люциферазы репортерных клетках, культивированных совместно с PD-1-экспрессирующими клетками-мишенями, без какого-либо антитела или с нерелевантным антителом (например, антителом, которое не связывается специфически с человеческим PD-1).

5.3. Фармацевтические композиции

[00204] Настоящее изобретение относится к композициям, включающим анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, имеющее желательную степень чистоты, в физиологически приемлемом носителе, эксципиенте или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы в используемых концентрациях являются нетоксичными для реципиентов и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин, резорцин, циклогесанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы белков с Zn) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как твинTM, плюроникиTM или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[00205] В конкретном воплощении фармацевтические композиции включают анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, и необязательно одно или несколько дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретном воплощении фармацевтические композиции включают эффективное количество антитела, описанного в настоящем описании, и необязательно одно или несколько дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых воплощениях только антитело является активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, могут применяться при ингибировании активности PD-1 и лечении состояния, такого как рак или инфекционное заболевание. В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включающей анти-PD-1 антитело по настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака или инфекционного заболевания. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-PD-1 антитела по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для лечения рака или инфекционного заболевания.

[00206] Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные среды, неводные среды, противомикробные средства, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие вещества, эмульгаторы, секвестирующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных сред включают растворы для инъекции хлорида натрия, Рингера, изотонические растворы декстрозы, стерильную воду для инъекции, раствор декстрозы и лактированный раствор Рингера для инъекции. Неводные парентеральные среды включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, сезамовое масло и арахисовое масло. В

парентеральные препараты, упакованные в многодозовые контейнеры, в бактериостатических или фунгистатических концентрациях могут добавляться противомикробные средства, которые включают фенолы или крезолы, ртутные препараты, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый эфиры п-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают гидрохлорид прокаина. Суспендирующие и диспергирующие агенты включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают полисорбат 80 (твин™ 80). Секвестирующий или хелатирующий агент ионов металлов включает ЭДТК. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой сред и гидроксид натрия, хлороводородную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH.

[00207] Фармацевтическую композицию можно составить для любого пути введения субъекту. Конкретные пути введения включают интраназальный, пероральный, легочный, трансдермальный, интрадермальный и парентеральный. Парентеральное введение, описываемое подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекцией, также предполагается в настоящем описании. Препараты для инъекции можно получить в обычных формах в виде жидких растворов или суспензий, твердых формах, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, или эмульсиях. Препараты для инъекции, растворы и эмульсии также содержат один или несколько эксципиентов. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, если желательно, фармацевтические композиции для введения также могут содержать небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачиватели или эмульгаторы, pH-буферирующие агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие агенты, как например, ацетат натрия, монолаурат сорбитана, олеат

триэтаноламина и циклодекстрины.

[00208] Препараты для парентерального введения антитела включают стерильные растворы, готовые для инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные продукты, готовые для соединения с растворителем непосредственно перед применением, включая таблетки для подкожных инъекций, стерильные суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для соединения со средой непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть или водными или неводными.

[00209] Если введение внутривенное, подходящие носители включают физиологический раствор или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) и растворы, содержащие загустители и солюбилизаторы, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, и их смеси.

[00210] Топические смеси, включающие антитело, получают так, как это описано для местного и системного введения. Полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или подобное и может быть составлена в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, тинктур, паст, пенки, аэрозолей, промываний, спреев, суппозиторий, бандажей, дермальных пэтчей или любых других препаратов, подходящих для топического введения.

[00211] Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, можно получить в виде аэрозоля для топического применения, например, ингаляцией (см., например, патенты США №№ 4044120, 4414209 и 4364923, в которых описываются аэрозоли для доставки стероидов, применимых для лечения воспалительных заболеваний, в частности, астмы, и которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Такие композиции для введения в дыхательные пути могут находиться в форме аэрозоля или раствора для небулайзера или в виде микротонкого порошка для инсуффляции одни или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы композиции будут в одном воплощении иметь диаметр менее 50 микрон, в одном воплощении менее 10 микрон.

[00212] Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании,

можно получить для местного или топического применения, например, для топического применения к коже и слизистым оболочкам, например, глазам, в форме гелей, кремов и лосьонов, и для применения к глазу или для интрацистернального или интраспинального применения. Топическое введение рассматривается для трансдермальной доставки и также для введения в глаза или слизистую оболочку или для ингаляционных терапий. Также можно вводить назальные растворы антитела одного или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

[00213] Трансдермальные пэтки, включая устройства для ионофореза и электрофореза, хорошо известны специалистам в данной области техники, и могут использоваться для введения антитела. Например, такие пэтки раскрыты в патентах США №№ 6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 и 5,860,957, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00214] В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, включающая антитело, описанное в настоящем описании, представляет собой лиофилизированный порошок, который можно восстановить для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Его также можно восстанавливать и получать в виде твердых веществ или гелей. Лيوфилизированный порошок получают путем растворения антитела, описанного в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемого производного в подходящем растворителе. В некоторых воплощениях лиофилизированный порошок является стерильным. Растворитель может содержать эксципиент, который улучшает устойчивость, или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, полученного из порошка. Эксципиенты, которые можно использовать, включают, но без ограничения, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другой подходящий агент. Растворитель также может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия или другой подобный буфер, известный специалистам в данной области техники, в одном воплощении примерно с нейтральным рН. Последующая стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях,

известных специалистам в данной области техники, дает желательную композицию. В одном воплощении полученный раствор будет распределен во флаконы для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать одну дозу или несколько доз соединения. Лиофилизованный порошок можно хранить в соответствующих условиях, таких как примерно от 4°C до комнатной температуры. Восстановление такого лиофилизованного порошка водой для инъекции дает композицию для применения при парентеральном введении. Для восстановления лиофилизованный порошок добавляют к стерильной воде или другому подходящему носителю. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество можно определить эмпирически.

[00215] Анти-PD-1 антитела, описанные в настоящем описании, и другие композиции, описанные в настоящем описании, также можно получить для направленного воздействия на определенную ткань, рецептор или другую область организма субъекта, которого лечат. Многие такие методы направленного воздействия хорошо известны специалистам в данной области техники. Все такие методы направленного воздействия рассматриваются в настоящем описании для применения в композициях по настоящему изобретению. Как примеры методов направленного воздействия, не являющиеся ограничивающими, см., например, патенты США №№ 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5,709,874, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В конкретном воплощении антитело, описанное в настоящем описании, направленно воздействует на опухоль.

[00216] Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это легко осуществить путем фильтрации через, например, мембраны для стерильной фильтрации.

5.4. Способы применения и применения

[00217] В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способу лечения субъекта с использованием анти-PD-1 антител, раскрытых в настоящем описании. Любое заболевание или

расстройство, при которых будет благоприятным ингибирование функции PD-1, можно лечить с использованием анти-PD-1 антител, раскрытых в настоящем описании. Анти-PD-1 антитела, раскрытые в настоящем описании, особенно применимы для ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям и соответственно могут использоваться как иммунотерапия для субъекта, больного раком. Например, в некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу усиления Т-клеточной активации у субъекта в ответ на антиген, причем способ включает введение субъекту эффективного количества анти-PD-1 антитела или его фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу лечения рака у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества анти-PD-1 антитела или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. Раковые заболевания, которые можно лечить анти-PD-1 антителами или фармацевтической композицией, раскрытыми в настоящем описании, включают, без ограничения, меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых). Следовательно, настоящее изобретение относится, в одном воплощении, к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к

применению антитела и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для применения в способе лечения рака у субъекта и/или для применения для ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям и/или для применения в иммунотерапии для субъекта, имеющего рак, и/или для применения в способе усиления Т-клеточной активации у субъекта в ответ на антиген. В предпочтительном воплощении рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак молочной железы (например, устойчивый к герцептину рак молочной железы и устойчивый к трастузумабу-DM1 (Т-DM1) рак молочной железы), рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, цервикальный рак, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз (например, лейкоз у пожилых, острый миелоидный лейкоз (AML) и AML у пожилых).

[00218] Другие раковые заболевания, которые можно лечить анти-PD-1 антителами или фармацевтическими композициями, раскрытыми в настоящем описании, включают, без ограничения, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому и злокачественную меланому кожи или внутриглазную злокачественную меланому), рак почек (например, светлоклеточный рак), рак предстательной железы (например, гормонорефрактерную аденокарциному предстательной железы), рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легких (например, немелкоклеточный рак легких), рак костей, панкреатический рак, рак кожи, рак головы и шеи, рак матки, рак яичников, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, тестикулярный рак, рак фаллопиевой трубы, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному

влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, не-ходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак парашитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягкой ткани, рак уретры, рак пениса, хронические или острые лейкозы, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, солидные опухоли у детей, лимфоцитарный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак почек или мочеточника, карциному почечных лоханок, неоплазму центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль позвоночника, глиому мозгового ствола, глиому, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, раковые заболевания, вызванные окружающей средой, включая заболевания, вызванные асбестом, эзофагеальный рак, рак печени, рефрактерные или рецидивирующие злокачественности, метастатические раковые заболевания, раковые заболевания, при которых экспрессируется PD-L1, и комбинации указанных раковых заболеваний.

[00219] В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу предупреждения или лечения инфекционного заболевания у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества анти-PD-1 антитела или его фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании. Одно воплощение относится к способам предупреждения и/или лечения инфекции (например, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, протозойной инфекции или паразитарной инфекции). Инфекция, предупреждаемая или подвергающаяся лечению согласно способам, может быть вызвана инфекционным агентом, идентифицированным в настоящем описании. В конкретном воплощении анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его композиция, являются единственными активными агентами, вводимыми субъекту. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его композицию используют для лечения инфекционных заболеваний в комбинации с противoinфекционными корректирующими средствами (например, противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми или

антигельминтными). Поэтому в предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к антителу, применению такого антитела для получения фармацевтической композиции и/или фармацевтическим композициям по настоящему изобретению для применения в способе предупреждения и/или лечения инфекционного заболевания, причем предпочтительнее антитело или фармацевтическая композиция являются единственными активными агентами, вводимыми субъекту, или антитело или фармацевтическую композицию используют в комбинации с противoinфекционными корректирующими средствами.

[00220] Инфекционные заболевания, которые можно лечить и/или предупреждать с помощью анти-PD-1 антител или фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем описании, вызываются инфекционными агентами, включающими, но без ограничения, бактерии, паразитов, грибы, простейших и вирусы. В конкретном воплощении инфекционное заболевание, которое лечат и/или предупреждают с помощью анти-PD-1 антител или фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем описании, вызывается вирусом. Вирусные заболевания или вирусные инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить согласно способам, описанным в настоящем описании, включают, но без ограничения, заболевания, вызванные вирусом гепатита типа А, гепатита типа В, гепатита типа С, гриппа (например, гриппа А или гриппа В), ветряной оспы, аденовирусом, вирусом простого герпеса типа I (HSV-I), вирусом простого герпеса типа II (HSV-II), чумы рогатого скота, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторно-сенцитиальным вирусом, вирусом папилломы, паповавирусом, цитомегаловирусом, Echinovirus, арбовирусом, хантавирусом, вирусом Коксаки, свинки, кори, коревой краснухи, полиомиелита, натуральной оспы, вирусом Эпштейна-Барра, вирусом иммунодефицита человека типа I (ВИЧ-I), вирусом иммунодефицита человека типа II (ВИЧ-II), и агентами вирусных заболеваний, таких как вирусный менингит, энцефалит, денге или натуральная оспа.

[00221] Бактериальные инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить, включают инфекции, вызванные *Escherichia coli*,

Klebsiella pneumoniae, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериальные заболевания, вызванные бактериями (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridians* и *Pseudomonas aeruginosa*), которые можно предупреждать и/или лечить согласно способам, описанным в настоящем описании, включают, но без ограничения, микобактериальный риккетсиоз, микоплазмоз, нейссерии, пневмонию, болезнь, вызванную *Borrelia burgdorferi* (болезнь Лайма), болезнь, вызванную *Bacillus anthracis* (сибирская язва), столбняк, болезнь, вызванную *Streptococcus*, *Staphylococcus*, микобактериями, коклюш, холеру, чуму, дифтерию, хламидиоз, болезнь, вызванную *S. aureus*, и болезнь легионеров.

[00222] Протозойные заболевания или протозойные инфекции, вызванные простейшими, которые можно предупреждать и/или лечить способами, описанными в настоящем описании, включают, но без ограничения, лейшманиоз, кокцидиоз, трипаносомоз, шистосомоз или малярию. Паразитарные заболевания или паразитарные инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить согласно способам, описанным в настоящем описании, включают, но без ограничения, хламидиоз и риккетсиоз.

[00223] Грибковые заболевания или грибковые инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить способами, описанными в настоящем описании, включают, но без ограничения, заболевания, вызванные *Candida infections*, зигомикоз, *Candida* мастит, прогрессирующий диссеминированный трихоспороноз с латентной трихоспоронемией, диссеминированный кандидоз, параккокцидиоидомикоз легких, аспергиллез легких, пневмонию, вызванную *Pneumocystis carinii*, криптококковый менингит, кокцидиоидный менингоэнцефалит и цереброспинальный васкулит, инфекцию *Aspergillus niger*, *Fusarium keratitis*, микозы параназальных синусов, эндокардит, вызванный *Aspergillus fumigatus*, дисхондроплазию большеберцовой кости, вагинит, вызванный *Candida glabrata*, орофарингеальный кандидоз, X-сцепленную хроническую гранулематозную болезнь, эпидермофитию

стоп, кандидоз кожи, микотический плацентит, диссеминированный трихоспороноз, аллергический бронхолегочный аспергиллез, микотический кератит, инфекцию *Cryptococcus neoformans*, грибковый перитонит, инфекцию *Curvularia geniculata*, стафилококковый эндофтальмин, споротрихоз и дерматофитию.

[00224] В некоторых воплощениях такие способы также включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства. В некоторых воплощениях дополнительное терапевтическое средство является химиотерапевтическим, радиотерапевтическим или средством, направленно воздействующее на контрольную точку. В некоторых воплощениях средство, направленно воздействующее на контрольную точку, выбирают из группы, включающей антагонистическое анти-CTLA-4 антитело, антагонистическое анти-PD-L1 антитело, антагонистическое анти-PD-L2 антитело, антагонистическое анти-PD-1 антитело, антагонистическое анти-TIM-3 антитело, антагонистическое анти-LAG-3 антитело, антагонистическое анти-CEACAM-1 антитело, антагонистическое анти-TIGIT антитело, агонистическое анти-CD137 антитело, агонистическое анти-ICOS антитело, агонистическое анти-GITR антитело и агонистическое анти-OX40 антитело. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с антагонистическим анти-CTLA-4 антителом и агонистическим анти-ICOS антителом. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с антагонистическим анти-CTLA-4 антителом. В некоторых воплощениях настоящее раскрытие относится к способу лечения рака у субъекта, причем способ включает введение субъекту анти-PD-1 антитела или его фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем описании, в комбинации с антагонистическим анти-CTLA-4 антителом или его фармацевтической композицией, причем рак выбирают из группы, включающей рак легких (например, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), например, NSCLC первой линии), меланому (например, меланому первой линии) и рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи (SCCHN), например, SCCHN первой линии).

[00225] В предпочтительном воплощении настоящее изобретение

относится к антителу, применению такого антитела для получения фармацевтических композиций, и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе по настоящему изобретению, причем способ также включает введение субъекту дополнительного терапевтического средства. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к (a) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в качестве лекарственного средства. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к (a) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в способе лечения рака. В другом воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплекту частей, включающему (a) антитело и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) дополнительное терапевтическое средство. В одном более предпочтительном воплощении дополнительное терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое, радиотерапевтическое или средство, направленно воздействующее на контрольную точку.

[00226] В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело используют в способах, раскрытых в настоящем описании. В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипилимумаб, разработанный Bristol-Myers Squibb. В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело представляет собой тремелимумаб, разработанный Pfizer и Medimmune. В некоторых воплощениях анти-CTLA-4 антитело представляет собой Probody, направленно воздействующее на CTLA-4, разработанное CytomX и Bristol-Myers Squibb.

[00227] Примеры анти-CTLA-4 антител, которые можно использовать в способах лечения, раскрытых в настоящем описании, раскрываются, без ограничения, в следующих патентах и заявках на патент, которые все полностью включены в настоящее описание: патент США № 6984720; патент США № 7411057; патент США № 7034121; патент США № 8697845; патент США № 8518404; публикация

заявки на патент США № US 2009/0123477 A1; публикация заявки на патент США № US 2014/0105914 A1; публикация заявки на патент США № US 2013/0267688 A1; публикация заявки на патент США № US 2016/0145355 A1; публикация PCT № WO 2014/207064 A1 и публикация PCT № WO 2016/015675 A1.

[00228] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с соединением, которое направленно воздействует на иммуномодулирующий(ие) фермент(ы), такие как IDO (индоламин-(2,3)-диоксигеназа) и/или TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа). Следовательно, в другом более предпочтительном воплощении дополнительным терапевтическим средством является соединение, которое направленно воздействует иммуномодулирующий(ие) фермент(ы), даже предпочтительнее, ингибитор индоламин-(2,3)-диоксигеназы (IDO). В некоторых воплощениях такое соединение выбирают из группы, включающей эпикадостат (Incyte Corp; см., например, WO 2010/005958, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), F001287 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), индоксимод (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). В одном воплощении соединение представляет собой эпикадостат. В другом воплощении соединение представляет собой F001287. В другом воплощении соединение представляет собой индоксимод. В другом воплощении соединение представляет собой NLG919.

[00229] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с вакциной. Вакцина может представлять собой, например, пептидную вакцину, ДНК-вакцину или РНК-вакцину. В некоторых воплощениях вакцина является противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока или вакциной против патогенов на основе белков теплового шока. В конкретном воплощении анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока. Белки теплового шока (HSP) являются семейством высоко консервативных белков, обнаруженных повсеместно во всех видах. Их экспрессия может быть индуцирована в сильной степени до более

высоких уровней в результате теплового шока или других форм стресса, включая воздействие токсинов, окислительный стресс или глюкозную депривацию. По молекулярной массе классифицировано пять семейств: HSP-110, -90, -70, -60 и -28. HSP доставляют иммуногенные пептиды по пути кросс-презентации в антигенпредставляющие клетки (APC), такие как макрофаги и дендритные клетки (DC), приводя к Т-клеточной активации. HSP функционируют как носители шаперонов опухольассоциированных антигенных пептидов, образующих комплексы, способные индуцировать опухольспецифический иммунитет. После высвобождения из погибающих опухолевых клеток комплексы HSP-антиген процессируются в пептиды, которые связывают молекулы MHC класса I и класса II, что ведет к активации противоопухолевых CD8+ и CD4+ Т-клеток. Иммунитет, выявленный комплексами HSP, полученными из опухолевых препаратов, специфически направлен против уникального репертуара антигенных пептидов, экспрессированных при раке у каждого субъекта. Следовательно, в другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к (а) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) вакцине для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в способе лечения рака. В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплекту частей, включающим (а) антитело и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) вакцину. В другом предпочтительном воплощении вакцина является противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока или вакциной против патогенов на основе белков теплового шока, предпочтительнее противоопухолевой вакциной на основе белков теплового шока.

[00230] Комплекс белков теплового шока с пептидами (HSPPC) представляет собой белково-пептидный комплекс, состоящий из белка теплового шока в нековалентном комплексе с антигенными пептидами. HSPPC выявляет как врожденные, так и приобретенные иммунные реакции. В конкретном воплощении антигенный(е) пептид(ы) отображает(ют) антигенность для рака, от которого лечат. HSPPC эффективно захватываются APC через мембранные

рецепторы (главным образом CD91) или путем связывания с толл-подобными рецепторами. Интернализация HSPPC приводит к функциональному созреванию APC с продуцированием хемокинов и цитокинов, ведущим к активации природных клеток-киллеров (NK), моноцитов и Th-1- и Th-2-опосредованным иммунным реакциям. В некоторых воплощениях HSPPC, используемые в способах, раскрытых в настоящем описании, включают один или несколько белков теплового шока из семейства hsp60, hsp70 или hsp90 стрессовых белков в комплексе с антигенными пептидами. В некоторых воплощениях HSPPC включают hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, grp96, кальретикулин или комбинации двух или большего их числа.

[00231] В конкретном воплощении комплекс белков теплового шока с пептидами (HSPPC) включает рекомбинантные белки теплового шока (например, hsp70 или hsc70) или их пептидсвязывающие домены в комплексе с рекомбинантными антигенными пептидами. Рекомбинантные белки теплового шока можно получить технологией рекомбинантных ДНК, например, с использованием последовательности hsc70, как описано в Dworniczak and Mirault, *Nucleic Acids Res.*, 15: 5181-5197 (1987), и GenBank, инвентарный номер P11142 и/или Y00371, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В некоторых воплощениях последовательности Hsp70 такие, как описанные в работах Hunt and Morimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 (19), 6455-6459 (1985), и GenBank, инвентарный номер P0DMV8 и/или M11717, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Антигенные пептиды также можно получить методами рекомбинантных ДНК, известными в технике.

[00232] В некоторых воплощениях антигенные пептиды включают модифицированную аминокислоту. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота включает посттрансляционную модификацию. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота включает имитацию посттрансляционной модификации. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота представляет собой Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которая фосфорилирована по гидроксилу или амину боковой цепи. В некоторых воплощениях модифицированная аминокислота представляет собой миметик

аминокислоты Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которая фосфорилирована по гидроксилу или амину боковой цепи.

[00233] В конкретном воплощении анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с комплексом белков теплового шока с пептидами (HSPPC), например, комплексом белков теплового шока с пептидами 96 (HSPPC-96), для лечения рака. HSPPC-96 включает белок теплового шока в 96 кДа (Hsp), gp96, в комплексе с антигенными пептидами. HSPPC-96 является средством противораковой иммунотерапии, полученным из опухоли субъекта, и содержит антигенный «отпечаток» рака. В некоторых воплощениях такой отпечаток содержит уникальные антигены, которые присутствуют только в конкретных раковых клетках определенного субъекта, и предполагается, что инъекция вакцины стимулирует иммунную систему субъекта для узнавания и атаки любых клеток со специфическим раковым отпечатком. Следовательно, в еще одном предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в комбинации с комплексом белков теплового шока с пептидами (HSPPC) для применения в качестве лекарственного средства и/или для применения в способе лечения рака.

[00234] В некоторых воплощениях HSPPC, например, HSPPC-96, получают из опухолевой ткани субъекта. В конкретном воплощении HSPPC (например, HSPPC-96) получают из опухоли типа рака, от которого лечат, или его метастаз. В другом конкретном воплощении HSPPC (например, HSPPC-96) является аутологичным для субъекта, которого лечат. В некоторых воплощениях опухолевая ткань является не-некротической опухолевой тканью. В некоторых воплощениях по меньшей мере 1 грамм (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 граммов) не-некротической опухолевой ткани используют для получения режима вакцины. В некоторых воплощениях после хирургической резекции не-некротическую опухолевую ткань замораживают перед применением при получении вакцины. В некоторых воплощениях HSPPC, например,

HSPPC-96, выделяют из опухолевой ткани методами очистки, фильтруют и готовят для вакцины для инъекции. В некоторых воплощениях субъекту вводят 6-12 доз HSPPC, например, HSPCC-96. В таких воплощениях дозы HSPPC, например, HSPPC-96, могут вводиться еженедельно в случае первых 4 доз и затем раз в две недели в случае дополнительных 2-8 доз.

[00235] Другие примеры HSPPC, которые можно использовать согласно способам, описанным в настоящем описании, раскрываются в следующих патентах и заявках на патент: патенты США №№ 6391306, 6383492, 6403095, 6410026, 6436404, 6447780, 6447781 и 6610659, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00236] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с адъювантом. Можно использовать различные адъюванты в зависимости от контекста лечения. Неограничивающие примеры соответствующих адъювантов включают, но без ограничения, полный адъювант Фрейнда (CFA), неполный адъювант Фрейнда (IFA), монтанид ISA (неполный адъювант от Seppic), адъювантную систему Ribi (RAS), Titer Max, мурамилпептиды, адъювантный препарат Syntex (SAF), алюмин (гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия), адъюванты соли алюминия, адъюванты Gerbu®, антиген, абсорбированный нитроцеллюлозой, инкасулированный или захваченный антиген, 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3 D-MPL), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, лиганды толл-подобных рецепторов (TLR), лиганды маннансвязывающего лектина (MBL), агонисты STING, иммуностимулирующие комплексы, такие как сапонины, Quil A, QS-21, QS-7, ISCOMATRIX и другие. Другие адъюванты включают CpG-олигонуклеотиды и молекулы двухцепочечной РНК, такие как поли(А) и поли(У). Также можно использовать комбинации вышеназванных адъювантов. См., например, патенты США №№ 6645495, 7029678 и 7858589, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. В одном воплощении адъювантом, используемым в настоящем изобретении, является QS-21 STIMULON.

[00237] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, включающим TCR. В некоторых воплощениях дополнительным терапевтическим средством является растворимый TCR. В некоторых воплощениях дополнительным терапевтическим средством является клетка, экспрессирующая TCR. Следовательно, в еще одном предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, включающим TCR, для применения в качестве лекарственного средства и/или для применения в способе лечения рака.

[00238] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых воплощениях клетка является Т-клеткой.

[00239] В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело, раскрытое в настоящем описании, вводят субъекту в комбинации с имитирующим TCR антителом. В некоторых воплощениях имитирующим TCR антителом является антитело, которое специфически связывается с комплексом пептид-МНС. Примеры имитирующих TCR антител, но без ограничения, см., например, в патенте США № 9074000 и публикациях заявок на патент США №№ US 2009/0304679 A1 и US 2014/0134191 A1, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00240] Анти-PD-1 антитело и дополнительное терапевтическое средство (например, химиотерапевтическое, радиотерапевтическое, средство, направленно воздействующее на контрольную точку, ингибитор IDO, вакцину, растворимый TCR, клетку, экспрессирующую TCR, клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, и/или имитирующее TCR антитело) можно вводить отдельно, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. В одном воплощении анти-PD-1 антитело вводят парентерально, и ингибитор IDO вводят перорально.

[00241] Антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, можно доставить субъекту различными

путями. Они включают, без ограничения, парентеральный, интраназальный, интратекальный, пероральный, интрадермальный, конъюнктивальный, интраартериальный и подкожный пути. Также можно использовать легочное введение, например, с использованием ингалятора или небулайзера, и препарата с образующим аэрозоль агентом для применения в виде спрея. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют подкожно или внутривенно. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют интраартериально. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют интратуморально. В некоторых воплощениях антитело или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем описании, доставляют в лимфоузел, дренирующий опухоль.

[00242] Количество антитела или композиции, которое будет эффективным при лечении и/или предупреждении состояния, будет зависеть от характера заболевания и может быть определено обычными клиническими методами.

[00243] Точная доза, используемая в композиции, также будет зависеть от пути введения и тяжести инфекции или заболевания, вызванного ею, и должна определяться согласно представлению лечащего врача и особенностей каждого субъекта. Например, эффективные дозы также могут изменяться в зависимости от способов введения, места-мишени, физиологического состояния пациента (включая возраст, массу тела и состояние здоровья), является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарств, или является лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, пациентом является человек, но также можно лечить млекопитающих, не являющихся людьми, включая трансгенных млекопитающих. Лечебные дозировки оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

[00244] Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, также можно использовать для анализа уровней белка PD-1 в биологическом образце с использованием классических иммуногистологических методов, известных специалистам в данной

области техники, включая иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализов с антителами известны в технике и включают ферментные метки, такие как глюкозооксидаза, радиоизотопы, такие как иод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие метки можно использовать для мечения антитела, описанного в настоящем описании. С другой стороны, можно пометить второе антитело, которое узнает анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, и использовать в комбинации с анти-PD-1 антителом для детекции уровней белка PD-1. Следовательно, в одном воплощении настоящее изобретение относится к применению антитела по настоящему изобретению для детекции *in vitro* белка человеческого PD-1 в биологическом образце. В другом воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-PD-1 антитела по настоящему изобретению для анализа и/или детекции уровней белка человеческого PD-1 в биологическом анализе *in vitro*, причем предпочтительно анти-PD-1 антитело конъюгировано с радионуклеидом или детектируемой меткой и/или содержит метку, описанную в настоящем описании, и/или при этом используют иммуногистологический метод.

[00245] Предполагается, что анализ уровня экспрессии белка PD-1 включает качественное или количественное измерение или оценку уровня белка PD-1 в первом биологическом образце непосредственно (например, путем определения или оценки абсолютного уровня белка) или относительно (например, путем сравнения с уровнем белка, ассоциированного с заболеванием, во втором биологическом образце). Уровень экспрессии полипептида PD-1 в первом биологическом образце можно измерить или оценить и сравнить со стандартным уровнем белка PD-1, причем стандартный уровень берут из второго биологического образца, полученного от индивидуума, не имеющего расстройства, или определяют путем усреднения уровня у популяции индивидуумов, не имеющих расстройства. Как будет принято в технике, так как «стандартный» уровень полипептида PD-1 известен, его можно использовать

повторно как стандарт для сравнения. Следовательно, в другом воплощении настоящее изобретение относится к *in vitro* способу анализа и/или детекции уровней белка PD-1, в частности, уровней человеческого белка PD-1, в биологическом образце, включающему качественное или количественное измерение или оценку уровня белка PD-1, в частности, человеческого белка PD-1, в биологическом образце иммуногистологическим методом.

[00246] Используемый в настоящем описании термин «биологический образец» относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта, клеточной линии, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих PD-1. Методы получения биопсий тканей и жидкостей организма от животных (например, людей) хорошо известны в технике. Биологические образцы включают периферические мононуклеарные клетки крови.

[00247] Анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, можно использовать для применений при прогнозировании, диагностике, мониторинге и скрининге, включая применения *in vitro* и *in vivo*, хорошо известные и стандартные для специалистов в данной области техники, и основанные на настоящем описании. Прогностические, диагностические, контролирующие и скринирующие анализы и наборы для суждения *in vitro* и оценки статуса иммунной системы и/или иммунной реакции можно использовать для предсказания, диагностики и мониторинга для оценки образцов пациента, включая пациентов, известных как имеющих или с предположением о наличии дисфункции иммунной системы, или в отношении ожидаемой или желательной реакции иммунной системы, реакции на антиген или реакции на вакцину. Суждение и оценка статуса иммунной системы и/или иммунной реакции также применимы при определении соответствия пациента для клинического испытания лекарственного средства или для введения определенного химиотерапевтического средства, радиотерапевтического средства или антитела, включая их комбинации, против другого средства или антитела. Такой тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки уже имеется в практике с использованием

антител против белка HER2 при раке молочной железы (HerceptTest™, Dako), где анализ также используют для оценки пациентов для терапии антителами с использованием герцептина®. Применения *in vivo* включают направленную клеточную терапию и модуляцию иммунной системы и радиоизображение иммунных реакций. Следовательно, в одном воплощении настоящее изобретение относится к анти-PD-1 антителу, применению такого антитела для получения фармацевтической композиции и/или фармацевтическим композициям по настоящему изобретению для применения в качестве диагностического средства. В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к анти-PD-1 антителу, применению такого антитела для получения фармацевтической композиции и/или фармацевтическим композициям по настоящему изобретению для применения в способе предсказания, диагностики и/или мониторинга субъекта, имеющего или предположительно имеющего дисфункцию иммунной системы, и/или в отношении ожидаемой или желательной реакции иммунной системы, реакции на антиген или реакции на вакцину. В другом воплощении настоящее изобретение относится к применению анти-PD-1 антитела по изобретению для предсказания, диагностики и/или мониторинга субъекта, имеющего или предположительно имеющего дисфункцию иммунной системы, и/или в отношении ожидаемой или желательной реакции иммунной системы, реакции на антиген или реакции на вакцину, путем анализа и/или детекции *in vitro* уровней человеческого белка PD-1 в биологическом образце субъекта.

[00248] В одном воплощении анти-PD-1 антитело можно использовать при иммуногистохимии образцов биопсии. Предпочтительно способ является методом *in vitro*. В другом воплощении анти-PD-1 антитело можно использовать для детекции уровней PD-1 или уровней клеток, которые содержат PD-1 на поверхности своих мембран, и затем такие уровни можно связать с симптомами некоторых заболеваний. Анти-PD-1 антитела, описанные в настоящем описании, могут содержать детектируемую или функциональную метку и/или могут быть конъюгированы с радионуклеидом или детектируемой меткой. Когда используют

флуоресцентные метки, можно использовать доступные в настоящее время микроскопию и анализ с помощью флуоресцентно-активированного клеточного сортера (FACS) или комбинацию процедур обоих методов, известных в технике, для идентификации и количественного определения участников специфического связывания. Анти-PD-1 антитела, описанные в настоящем описании, могут содержать или могут быть конъюгированы с флуоресцентной меткой. Примеры флуоресцентных меток включают, например, реакционноспособные и конъюгированные зонды, например, аминокумарин, флуоресцеин и красители тexasский красный, Alexa Fluor, красители Cy и DyLight. Анти-PD-1 антитела могут содержать или могут быть конъюгированы с радиоактивной меткой или радионуклеидом, такими как изотопы ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{186}Re . Когда используют радиоактивные метки, можно использовать доступные в настоящее время процедуры подсчета, известные в технике, для идентификации и количественного определения специфического связывания анти-PD-1 антитела с PD-1 (например, человеческим PD-1). В случае, когда меткой является фермент, детекцию можно выполнить любыми используемыми в настоящее время колориметрическими, спектрофотометрическими, флуороспектрофотометрическими, амперометрическими или газометрическими методами, известными в технике. Этого можно достигнуть введением в контакт образца или контрольного образца с анти-PD-1 антителом в условиях, которые допускают образование комплекса между антителом и PD-1. Любые комплексы, образованные между антителом и PD-1, детектируют в образце и в контроле и сравнивают. В свете специфического связывания антител для PD-1, описанных в настоящем описании, антитела можно использовать специфически для детекции экспрессии PD-1 на поверхности клеток. Антитела, описанные в настоящем описании, также можно использовать для очистки PD-1 путем иммуноаффинной очистки. В настоящее описание также включается система анализа, которую можно получить в форме набора для анализа, набора или комплекта частей для количественного анализа предела присутствия, например, для PD-1 или комплексов PD-

1/лиганд PD-1. Система, набор для анализа, набор или комплект частей могут включать меченный компонент, например, меченное антитело, и один или несколько дополнительных иммунохимических реагентов.

5.5. Полинуклеотиды, векторы и способы получения анти-PD-1 антител

[00249] В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент (например, вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи), которые специфически связываются с антигеном PD-1 (например, человеческим PD-1), и векторам, например, векторам, включающим такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, клетках *E. coli* и млекопитающих). Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь любого из антител по настоящему изобретению, а также векторам, включающим такие нуклеотидные последовательности, например, экспрессирующим векторам, для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например, клетках млекопитающих.

[00250] При использовании в настоящем описании «изолированный» полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты является молекулой, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике (например, в организме мыши или человека) молекул нуклеиновой кислоты. Кроме того, «изолированная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула ДНК, может быть по существу свободна от другого клеточного материала или культуральной среды, когда получена рекомбинантными методами, или по существу свободна от химических предшественников или других химических соединений, когда синтезирована химически. Например, выражение «по существу свободный» включает препараты полинуклеотида или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющие менее примерно 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (в частности, менее примерно 10%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды,

других молекул нуклеиновой кислоты, химических предшественников и/или других химических соединений. В конкретном воплощении молекула (ы) нуклеиновой кислоты, кодирующая (ие) антитело, описанное в настоящем описании, является (ются) изолированной (ыми) или очищенной (ыми).

[00251] В отдельных аспектах настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, которые специфически связываются с полипептидом PD-1 (например, человеческим PD-1) и включают аминокислотную последовательность, описанную в настоящем описании, а также антитела, которые конкурируют с такими антителами за связывание с полипептидом PD-1 (например, в зависимости от дозы), или которые связываются с тем же эпитопом, что и такие антитела.

[00252] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь антитела, описанного в настоящем описании. Полинуклеотиды могут включать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, включающую FR и CDR VL антител, описанных в настоящем описании (см., например, таблицы 3 и 5), или нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, включающую FR и CDR VH антител, описанных в настоящем описании (см., например, таблицы 2 и 4).

[00253] Настоящее изобретение также относится к анти-PD-1 антителам, которые оптимизированы, например, путем оптимизации кодон/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и элиминации элементов неустойчивости мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих анти-PD-1 антитело или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, домен VH, домен VL), для рекомбинантной экспрессии путем включения изменений кодона и/или элиминации ингибирующих участков в мРНК, можно осуществить путем адаптации способов, описанных в, например, патентах США №№ 5965726, 6174666, 6291664, 6414132 и 6794498, соответственно, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Например, потенциальные сайты сплайсинга и элементы неустойчивости (например, обогащенные A/T или A/U элементы) в РНК могут быть мутированы без изменения аминокислот, кодированных нуклеотидными последовательностями, для усиления устойчивости РНК для рекомбинантной экспрессии. Изменения используют вырождение генетического кода, например, с использованием альтернативного кодона для идентичной аминокислоты. В некоторых воплощениях может быть желательно изменение одного или нескольких кодонов для кодирования консервативной мутации, например, схожей аминокислоты со схожей химической структурой и свойствами и/или функцией как у исходной аминокислоты. Такие способы могут повысить экспрессию анти-PD-1 антитела или его фрагмента по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или больше относительно экспрессии анти-PD-1 антитела, кодированного полинуклеотидами, которые не оптимизированы.

[00254] В некоторых воплощениях оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH), может гибридизировать с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH). В конкретных воплощениях оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент, гибридизирует в условиях высокой строгости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. В конкретном воплощении оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, гибридизирует в условиях гибридизации высокой строгости, промежуточной или более низкой строгости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной

последовательности, кодирующей анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. Информация, касающаяся условий гибридизации, имеется, см., например, публикацию заявки на патент США № US 2005/0048549 (например, абзацы 72-73), включенную полностью в настоящее описание в качестве ссылки.

[00255] Полинуклеотиды можно получить и определить нуклеотидную последовательность полинуклеотидов любым методом, известным в технике. Нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, описанные в настоящем описании, например, антитела, описанные в таблицах 1-6, и модифицированные версии таких антител, можно определить с использованием методов, известных в технике, т.е., кодоны нуклеотидов, известные как кодирующие определенные аминокислоты, собирают таким образом, что получают нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, можно собрать из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier G. et al. (1994), *BioTechniques*, 17: 242-6, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки), когда, коротко, вовлекается синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование таких олигонуклеотидов и последующая амплификация лигированных олигонуклеотидов методом ПЦР.

[00256] С другой стороны, полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящем описании, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием методов, хорошо известных в технике (например, ПЦР и других методов молекулярного клонирования). Например, амплификацию ПЦР с использованием синтетических праймеров, способных к гибридизации по 3'- и 5'-концам известной последовательности, можно выполнить с использованием геномной ДНК, полученной из клеток гибридом, продуцирующих антитело, представляющее интерес. Такие методы амплификации ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, включающих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие методы амплификации ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, включающих последовательность,

кодирующую переменный участок легкой цепи и/или переменный участок тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для получения химерных и гуманизированных антител.

[00257] Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую определенное антитело, недоступен, но последовательность молекулы антитела известна, нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин, можно синтезировать химически или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител или библиотеки кДНК, созданной из, или нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли А+ РНК, выделенной из, любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело, таких как клетки гибридомы, выбранные для экспрессии антитела, описанного в настоящем описании) амплификацией ПЦР с использованием синтетических праймеров, способных к гибридизации по 3'- и 5'-концам последовательности, или клонированием с использованием олигонуклеотидного зонда, специфического для определенной последовательности, для идентификации, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, которая кодирует антитело. Затем полученные ПЦР амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в способные к репликации клонирующие векторы с использованием любого метода, хорошо известного в технике.

[00258] ДНК, кодирующую анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, можно легко изолировать и секвенировать с использованием обычных процедур (например, используя олигонуклеотидные зонды, которые способны связываться специфически с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи анти-PD-1 антител). Клетки гибридомы могут служить в качестве источника такой ДНК. После изоляции ДНК можно поместить в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяев, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьяны COS, клетки яичников китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO от CHO GS System™ (Lonza)) или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулин, и осуществить синтез анти-PD-1

антител в рекомбинантных клетках-хозяевах.

[00259] Для того, чтобы получить целые антитела, праймеры ПЦР, включающие нуклеотидные последовательности VL или VH, сайт рестрикции и фланкирующие последовательности для защиты сайта рестрикции, можно использовать для амплификации последовательностей VL или VH в клонах scFv. С использованием методов клонирования, известных специалистам в данной области техники, VH домены, амплифицированные ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный участок тяжелой цепи, например, человеческий константный участок гамма 4, и VL домены, амплифицированные ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный участок легкой цепи, например, человеческие константные участки каппа или лямбда. В некоторых воплощениях векторы для экспрессии VH или VL доменов включают промотор EF-1 α , сигнал секреции, сайт клонирования для переменного участка, константные домены и маркер селекции, такой как неомицин. VH и VL домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные участки. Затем векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники, трансфицируют в клеточные линии для получения устойчивых или транзистентных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG.

[00260] ДНК также можно модифицировать, например, путем замены кодирующей последовательностью для константных доменов человеческой тяжелой и легкой цепи мышиных последовательностей или путем ковалентного соединения с кодирующей последовательностью иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности для полипептида неиммуноглобулина.

[00261] Изобретение также относится к полинуклеотидам, которые гибридизируют в условиях очень строгой, умеренной или более мягкой гибридизации с полинуклеотидами, которые кодируют антитело, описанное в настоящем описании. В конкретных воплощениях полинуклеотиды, описанные в настоящем описании, гибридизируют в условиях очень строгой, умеренной или более

мягкой гибридизации с полинуклеотидами, кодирующими VH домен и/или VL домен, раскрытые в настоящем описании.

[00262] Условия гибридизации описаны в технике и известны специалисту в данной области техники. Например, гибридизация в строгих условиях может заключаться в гибридизации со связанной с фильтром ДНК в 6х растворе хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) при примерно 45°C с последующими одной или несколькими промывками в 0,2хSSC/0,1% SDS при примерно 50-65°C; гибридизация в высоко строгих условиях может заключаться в гибридизации со связанной с фильтром нуклеиновой кислотой в 6хSSC при примерно 45°C с последующими одной или несколькими промывками в 0,1хSSC/0,2% SDS при примерно 68°C. Гибридизации в других строгих условиях известны специалистам в данной области техники и описаны, см., например, Ausubel FM *et al.*, eds. (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., и John Wiley & Sons, Inc., New York, at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3, включенные полностью в настоящее описание в качестве ссылок.

[00263] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к клеткам (например, клеткам-хозяевам), экспрессирующим (например, рекомбинантно) антитела, описанные в настоящем описании, которые специфически связываются с PD-1 (например, человеческим PD-1), и родственным полинуклеотидам и экспрессирующим векторам. Настоящее изобретение относится к векторам (например, экспрессирующим векторам), включающим полинуклеотиды, включающие нуклеотидные последовательности, кодирующие анти-PD-1 антитела или фрагменты, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих. Настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, включающим такие векторы для рекомбинантной экспрессии анти-PD-1 антител, описанных в настоящем описании (например, человеческого или гуманизированного антитела). Отдельный аспект относится к способам получения антитела, описанного в настоящем описании, включающим экспрессию такого антитела в клетке-хозяине.

[00264] Рекомбинантная экспрессия антитела, описанного в настоящем описании (например, полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела или одноцепного антитела, описанного в настоящем описании), которое специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1), включает конструирование вектора, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитело. Как только полинуклеотид, кодирующий молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела или его фрагмент (например, переменные участки тяжелой и/или легкой цепи), описанные в настоящем описании, получен, можно получать вектор для продуцирования молекулы антитела по технологии рекомбинантных ДНК с использованием методов, известных в технике. Таким образом, в настоящем описании описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего антитело или фрагмент антитела (например, легкой цепи или тяжелой цепи), кодирующего нуклеотидную последовательность. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, можно использовать для конструирования экспрессирующих векторов, содержащих антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), кодирующих последовательностей и соответствующих сигналов контроля транскрипции и трансляции. Такие способы включают, например, методы рекомбинантных ДНК *in vitro*, методы синтеза и генетической рекомбинации *in vivo*. Изобретение также относится к реплицируемым векторам, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, описанного в настоящем описании, тяжелую или легкую цепь антитела, переменный участок тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмент, или CDR тяжелой или легкой цепи, операбельно соединенный с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константный участок молекулы антитела (см., например, международные публикации №№ WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464, которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок), и переменные участки антитела могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии полной тяжелой, полной легкой цепи или как полной тяжелой, так и полной легкой цепи.

[00265] Экспрессирующий вектор можно перенести в клетку (например, клетку-хозяина) обычными методами, и затем полученные клетки можно культивировать обычными методами и получить антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. Таким образом, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь или их фрагменты или одноцепное антитело, описанное в настоящем описании, операбельно связанное с промотором, для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В некоторых воплощениях для экспрессии двухцепочечных антител векторы, кодирующие как тяжелые, так и легкие цепи, по отдельности могут быть коэкспрессированы в клетке-хозяине для экспрессии полной молекулы иммуноглобулина, что подробно описано ниже. В некоторых воплощениях клетка-хозяин содержит вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий как тяжелую, так и легкую цепь антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента. В конкретных воплощениях клетка-хозяин содержит два различных вектора, причем первый вектор включает полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменный участок тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента, и второй вектор включает полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменный участок легкой цепи антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента. В других воплощениях первая клетка-хозяин включает первый вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменный участок тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем описании, или его фрагмента, и вторая клетка-хозяин включает второй вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменный участок легкой цепи антитела, описанного в настоящем описании. В конкретных воплощениях тяжелая цепь/переменный участок тяжелой цепи, экспрессированные первой клеткой, ассоциируются с легкой цепью/переменным участком легкой цепи второй клетки с образованием анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании. Некоторые воплощения относятся к популяции клеток-хозяев, включающей такую первую клетку-

хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

[00266] Отдельное воплощение относится к популяции векторов, включающих первый вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/вариабельный участок легкой цепи анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании, и второй вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельный участок тяжелой цепи анти-PD-1 антитела, описанного в настоящем описании.

[00267] Ряд систем хозяин-экспрессирующий вектор можно использовать для экспрессии молекул антител, описанных в настоящем описании (см., например, патент США № 5807715, который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки). Такие системы хозяин-экспрессирующий вектор представляют собой среды, с помощью которых можно получить и затем очистить интересующие кодирующие последовательности, но также представляют собой клетки, которые могут, когда трансформированы или трансфицированы соответствующими нуклеотидными последовательностями, экспрессировать *in situ* молекулы антитела, описанного в настоящем описании. Они включают, но без ограничения, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные экспрессирующими векторами рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими последовательности, кодирующие антитело; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессирующими векторами, содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, бакуловирусом), содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы клеток растений (например, зеленых водорослей, таких как (*Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты CaMV; вирусом мозаики табака TMV), или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессирующими векторами (например, плазмидой Ti), содержащими последовательности, кодирующие антитело; или системы клеток

млекопитающих (например, клетки COS (например, COS1 или COS), CHO, ВНК, MDCK, НЕК 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, НЕК-293Т, НерG2, SP210, R1.1, В-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), содержащие рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающего (например, металлотионеиновый промотор) или из вирусов млекопитающих (например, аденовирусный поздний промотор; промотор 7,5К вируса коровьей оспы). В конкретном воплощении клетками для экспрессии антител, описанных в настоящем описании, являются клетки CHO, например, клетки CHO из системы CHO GS System™ (Lonza). В отдельном воплощении клетками для экспрессии антител, описанных в настоящем описании, являются человеческие клетки, например, человеческие клеточные линии. В конкретном воплощении экспрессирующим вектором млекопитающего является pOptiVEC™ или pcDNA3.3. В отдельном воплощении для экспрессии рекомбинантной молекулы антитела используют бактериальные клетки, такие как клетки *Escherichia coli*, или эукариотные клетки (например, клетки млекопитающего), особенно для экспрессии целой рекомбинантной молекулы антитела. Например, клетки млекопитающего, такие как клетки яичников китайского хомячка (CHO), в конъюгации с вектором, таким как главный промежуточный элемент раннего генного промотора из цитомегаловируса у человека, является эффективной экспрессирующей системой для антител (Foeking MK & Hofstetter H. (1986), Gene 45: 101-5; и Cockett MI *et al.* (1990), Biotechnology, 8(7): 662-7, обе работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). В некоторых воплощениях антитела, описанные в настоящем описании, продуцируются клетками CHO или клетками NS0. В конкретном воплощении экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела, описанные в настоящем описании, которые специфически связывают PD-1 (например, человеческий PD-1), регулируется конститутивным промотором, индуцируемым промотором или тканеспецифическим промотором.

[00268] В бактериальных системах число экспрессирующих векторов может быть выгодно выбрано в зависимости от применения,

предназначенного для молекулы антитела, которое экспрессируется. Например, когда следует получить большое количество такого антитела для получения фармацевтической композиции с молекулами антитела, могут быть желательны векторы, которые управляют экспрессией высоких уровней продуктов слитых белков, которые легко очищаются. Такие векторы включают, но без ограничения, экспрессирующий вектор *E. coli* pUR278 (Ruether U. & Mueller-Hill B. (1983), EMBO J., 2: 1791-1794), в который кодирующая антитело последовательность может быть лигирована отдельно в вектор в рамке с lac Z кодирующим участком, так что продуцируется слитый белок; векторы pIN (Inouye S & Inouye M. (1985), Nuc. Acids Res., 13: 3101-3109; Van Heeke G. & Schuster SM (1989), J. Biol. Chem., 24: 5503-5509); и т.п., и все указанные работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Например, векторы pGEX также можно использовать для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-5-трансферазой (GST). Как правило, такие слитые белки являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизированных клеток путем абсорбции и связывания с гранулами глутатион-агарозной матрицы с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX создают для включения сайтов расщепления протеаз тромбина или фактора Ха, так что клонированный генный продукт-мишень может высвобождаться из частицы GST.

[00269] В системе насекомых вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV), например, можно использовать в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус размножается в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующую антитело последовательность можно клонировать отдельно в несущественные участки (например, ген полэдрина) вируса и поместить под контроль промотора AcNPV (например, полиэдринового промотора).

[00270] В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд экспрессирующих систем на основе вирусов. В случаях, когда используют аденовирус в качестве экспрессирующего вектора, интересующую кодирующую антитело последовательность можно лигировать с аденовирусным комплексом контроля

транскрипции/трансляции, например, поздним промотором, и трехчастной лидерной последовательностью. Затем такой химерный ген можно встроить в геном аденовируса рекомбинацией *in vitro* или *in vivo*. Вставка в несущественный участок вирусного генома (например, участок E1 или E3) приведет к рекомбинантному вирусу, который является жизнеспособным и способным к экспрессии молекулы антитела в инфицированных хозяевах (например, см. Logan J. & Shenk T. (1984), PNAS, 81(12): 3655-9, включенную полностью в настоящее описание в качестве ссылки). Для эффективной трансляции встроенных кодирующих антитело последовательностей также могут потребоваться специфические сигналы инициации. Такие сигналы включают иницирующий кодон ATG и соседние последовательности. Кроме того, иницирующий кодон должен находиться в фазе с рамкой считывания желательной кодирующей последовательности для гарантии трансляции полной вставки. Такие экзогенные сигналы контроля трансляции и иницирующие кодоны могут быть разного происхождения, как природного, так и синтетического. Эффективность экспрессии можно усилить путем инклюзии соответствующих энхансерных элементов транскрипции, терминаторов транскрипции и т.д. (см., например, Bitter G. et al. (1987), Methods Enzymol., 153: 516-544, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки).

[00271] Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или модифицирует и процессирует генный продукт определенного желательного типа. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессирование (например, расщепление) белковых продуктов может быть важным для функции белка. Охарактеризованы различные клетки-хозяева и специфические механизмы посттрансляционного процессирования и модификации белков и генных продуктов. Соответствующие клеточные линии или системы хозяев можно выбрать для гарантии правильной модификации и процессинга чужеродных экспрессированных белков. С этой целью можно использовать эукариотные клетки-хозяев, которые обладают клеточной механикой для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного

продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но без ограничения, клетки CHO, VERO, ВНК, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (клеточная линия мышины миеломы, которая эндогенно не продуцирует какие-либо цепи иммуноглобулина), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитела, описанные в настоящем описании, продуцируются в клетках млекопитающего, таких как клетки CHO.

[00272] В конкретном воплощении антитела, описанные в настоящем описании, имеют пониженное содержание фукозы или не содержат фукозу. Такие антитела можно получить с использованием методов, известных специалистам в данной области техники. Например, антитела можно экспрессировать в клетках с дефицитом или отсутствием способности к фукозилрованию. В конкретном примере клеточные линии с нокаутом обоих аллелей α -1,6-фукозилтрансферазы можно использовать для получения антител с пониженным содержанием фукозы. Система Potelligent® (Lonza) является примером такой системы, которую можно использовать для получения антител с пониженным содержанием фукозы.

[00273] Можно получить клетки, устойчиво экспрессирующие рекомбинантные белки с высоким выходом в течение длительного времени. Например, можно сконструировать клеточные линии, которые устойчиво экспрессируют анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании. В конкретных воплощениях клетка по настоящему изобретению устойчиво экспрессирует легкую цепь/вариабельный участок легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельный участок тяжелой цепи, которые ассоциируются с образованием антитела, описанного в настоящем описании.

[00274] В некоторых аспектах клетки-хозяева можно трансформировать не с использованием экспрессирующих векторов, которые содержат вирусные ориджины репликации, а с помощью ДНК, регулируемой соответствующими контролирующими экспрессию элементами (например, промотором, энхансером, последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами

полиаденелирования и т.д.) и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированные клетки можно оставить для роста в течение 1-2 дней в обогащенных средах и затем перевести в селективные среды. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает сопротивление селекции и позволяет клеткам устойчиво интегрировать плазмиду в их хромосомы и расти с образованием очагов, которые в свою очередь можно клонировать и размножать в клеточные линии. Такой метод можно выгодно использовать для инжиниринга клеточных линий, которые экспрессируют анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент. Такие сконструированные клеточные линии можно использовать особенно при скрининге и оценке композиций, которые прямо или косвенно взаимодействуют с молекулой антитела.

[00275] Можно использовать ряд систем селекции, включая, но без ограничения, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M. et al. (1977), Cell, 11(1): 223-32), гипоксантингуанинфосфорибозил-трансферазы (Szybalska EH & Szybalski W. (1962), PNAS, 48(12): 2026-2034) и аденинфосфорилрибозил-трансферазы (Lowy I. et al. (1980), Cell, 22(3): 817-23) в tk-, hgp^rt- или ap^rt-клетках, соответственно, все указанные работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Также устойчивость к антиметаболитам можно использовать как основу селекции для следующих генов: *dhfr*, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler M. et al. (1980), PNAS, 77(6): 3567-70; O'Hare K. et al. (1981), PNAS, 78: 1527-31); *gpt*, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan RC & Berg P. (1981), PNAS, 78(4): 2072-6); *neo*, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu GY & Wu CH (1991), Biotherapy, 3: 87-95; Tolstoshev P. (1993), Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32: 573-596; Mulligan RC (1993), Science, 260: 926-932; и Morgan RA & Anderson WF (1993), Ann. Rev. Biochem., 62: 191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993), Trends Biotechnol., 11(5): 211-5); и *hygro*, который придает устойчивость к гидромицину (Santerre RF et al. (1984), Gene, 30(1-3): 147-

56), все указанные работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Можно по традиции применить методы, обычно известных в технологии рекомбинантных ДНК для селекции желательного рекомбинантного клона, и такие методы описаны, например, в Ausubel FM *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M., *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); и в Chapters 12 and 13, Dracopoli NC *et al.* (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F. *et al.* (1981), *J. Mol. Biol.*, 150: 1-14, полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок.

[00276] Уровни экспрессии молекулы антитела можно повысить путем амплификации вектора (обзор см. в Bebbington CR & Hentschel CCG, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987), полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки). Когда маркер в векторной системе, экспрессирующей антитело, можно амплифицировать, возрастание уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет повышать число копий маркерного гена. Так как амплифицированный участок ассоциируется с геном антитела, продуцирование антитела также будет повышаться (Crouse GF *et al.* (1983), *Mol. Cell. Biol.*, 3: 257-66, статья полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[00277] Клетку-хозяина можно котрансфицировать двумя или больше экспрессирующими векторами, описанными в настоящем описании, причем первый вектор кодирует тяжелую цепь, происходящую из пептида, и второй вектор кодирует легкую цепь, происходящую из пептида. Два вектора могут содержать идентичные селективируемые маркеры, которые дают возможность равной экспрессии полипептидов тяжелой и легкой цепи. Клетки-хозяева можно котрансфицировать различными количествами двух или больше экспрессирующих векторов. Например, клетки-хозяева можно котрансфицировать при любом соотношении первого экспрессирующего вектора и второго экспрессирующего вектора из следующих: 1:1,

1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

[00278] С другой стороны, можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи. В таких ситуациях легкая цепь должна размещаться прежде тяжелой цепи для того, чтобы избежать избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot NJ (1986), Nature, 322: 562-565; и Köhler G. (1980), PNAS, 77: 2197-2199, обе работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок). Кодирующие последовательности для тяжелых и легких цепей могут включать кДНК или геномную ДНК. Экспрессирующий вектор может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше или в интервале 2-5, 5-10 или 10-20 генных/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может включать, в следующем порядке, промотор, первый ген (например, тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем описании) и второй ген (например, легкой цепи антитела, описанного в настоящем описании). В таком экспрессирующем векторе транскрипция обоих генов может управляться промотором, в то время как трансляция мРНК из первого гена может управляться кэп-зависимым сканирующим механизмом, и трансляция мРНК из второго гена может осуществляться с помощью кэп-зависимого механизма, например, с помощью IRES.

[00279] Как только молекула антитела, описанного в настоящем описании, получена рекомбинантной экспрессией, ее можно очистить любым методом, известным в технике для очистки молекулы иммуноглобулина, например, хроматографией (например, ионообменной, аффинной, в особенности аффинной для специфического антигена после белка А, и эксклюзионной колоночной хроматографией), центрифугированием, дифференцирующим растворением, или любым другим стандартным методом очистки белков. Кроме того, антитела, описанные в настоящем описании, можно слить с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в настоящем описании, или

иначе, что известно в технике для облегчения очистки.

[00280] В конкретных воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, изолируют или очищают. Как правило, изолированное антитело является антителом, которое по существу свободно от других антител с иной антигенной специфичностью, чем изолированное антитело. Например, в отдельном воплощении препарат антитела, описанного в настоящем описании, по существу свободен от клеточного материала и/или химических предшественников. Выражение «по существу свободен от клеточного материала» включает препараты антитела, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых его выделили, или в которых получили рекомбинантно. Таким образом, антитело, которое по существу свободно от клеточного материала, включает препараты антитела, имеющие менее примерно 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (на сухую массу) гетерологичного белка (также называемого в настоящем описании «загрязняющим белком») и/или вариантов антитела, например, различных посттрансляционных модифицированных форм антитела, или других версий антитела (например, фрагментов антитела). Когда антитело получено рекомбинантно, оно также, как правило, по существу свободно от культуральной среды, т.е., культуральная среда представляет менее примерно 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% объема белкового препарата. Когда антитело получено химическим синтезом, оно, как правило, по существу свободно от химических предшественников или других химических веществ, т.е., оно отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые участвовали в синтезе белка. Соответственно, такие препараты антитела имеют менее примерно 30%, 20%, 10% или 5% (на сухую массу) химических предшественников или соединений иных, чем интересующее антитело. В конкретном воплощении антитела, описанные в настоящем описании, являются изолированными или очищенными.

[00281] Антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с PD-1 (например, человеческим PD-1), можно получить любым способом, известным в технике для синтеза антител, например, химическим синтезом или методами рекомбинантной

экспрессии. В способах, описанных в настоящем описании, используются, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии, методологии, генетического анализа, рекомбинантных ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и областей, родственных данной области техники. Такие методы описаны, например, в ссылках, цитированных в настоящем описании, и в полной мере объяснены в литературе. См., например, Maniatis T. *et al.* (1982), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J. *et al.* (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J. *et al.* (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 ежегодные новости); Gait (ed.) (1984), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991); *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B *et al.*, (eds.) (1999; *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, все полностью включенные в настоящее описание в качестве ссылок.

[00282] В конкретном воплощении антитело, описанное в настоящем описании (например, рекомбинантное антитело), получают, экспрессируют, создают или очищают любыми способами, которые включают создание, например, через синтез, последовательностей ДНК методами генной инженерии. В некоторых воплощениях такое антитело включает последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые не существуют в природе в зародышевом репертуаре антител животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

[00283] Один аспект настоящего изобретения относится к способу получения антитела, которое специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1), включающему культивирование

клетки или клетки-хозяина, описанных в настоящем описании. Некоторый аспект настоящего изобретения относится к способу получения антитела, которое специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1), включающему экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела с использованием клетки или клетки-хозяина, описанных в настоящем описании (например, клетки или клетки-хозяина, включающих полинуклеотиды, кодирующие антитело, описанное в настоящем описании). В отдельном воплощении клетка является изолированной клеткой. В отдельном воплощении способ дополнительно включает стадию очистки антитела, полученного из клетки или клетки-хозяина.

[00284] Способы получения поликлональных антител известны в технике (см., например, главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology* (2002), 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, eds., John Wiley and Sons, New York, полностью включенную в настоящее описание в качестве ссылки).

[00285] Моноклональные антитела можно получить с использованием широкого ряда методов, известных в технике, включающих использование гибридом, рекомбинатов, и методы фагового дисплея, или их комбинации. Например, моноклональные антитела можно получить с использованием методов гибридом, включая методы, известные в технике, и описанные, например, в Harlow E & Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ *et al.*, в *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563, 681 (Elsevier, N.Y., 1981), полностью включенных в настоящее описание в качестве ссылок. Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем описании, не ограничивается антителами, полученными технологией гибридом. Например, моноклональные антитела можно получить рекомбинантно из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих антитело, описанное в настоящем описании, или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

[00286] В конкретном воплощении «моноклональное антитело» при использовании в настоящем описании является антителом, продуцированным одной клеткой (например, гибридомой или клеткой-

хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), причем антитело специфически связывается с PD-1 (например, человеческим PD-1) при определении ELISA или другим анализом связывания антигена или конкурентного связывания, известным в технике, или описанным в примерах в настоящем описании. В отдельных воплощениях моноклональное антитело может являться химерным антителом или гуманизированным антителом. В некоторых воплощениях моноклональное антитело представляет собой моновалентное антитело или поливалентное (например, бивалентное) антитело. В отдельных воплощениях моноклональное антитело является моноспецифическим или мультиспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом). Моноклональные антитела, описанные в настоящем описании, можно, например, получить методом гибридом, описанным в Kohler G. & Milstein C. (1975), *Nature*, 256: 495, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки, или можно, например, выделить из фаговых библиотек с использованием методов, описанных в настоящем описании, например. В технике хорошо известны другие способы получения клонированных клеточных линий и моноклональных антител, экспрессированных посредством их (см., главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology* (2002), 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, *цит. выше*).

[00287] Способы получения и скрининга специфических антител с использованием технологии гибридом являются рутинными и хорошо известны в технике. Например, в методе гибридом мышь или другое соответствующее животное-хозяина, такое как овца, коза, кролик, хомячок или обезьяна, иммунизируют для выявления лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком (например, PD-1 (например, человеческим PD-1)), используемым для иммунизации. С другой стороны, лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с использованием подходящего агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием клетки гибридомы (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986), полностью включена в настоящее описание в качестве

ссылки). Кроме того, для иммунизации животного можно использовать метод RIMMS (несколько мест повторной иммунизации) (Kilpatrick KE *et al.* (1997), *Hybridoma*, 16: 381-9, полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[00288] В некоторых воплощениях мышей (или других животных, таких как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомячки или собаки) можно иммунизировать антигеном (например, PD-1 (например, человеческим PD-1)), и как только иммунную реакцию детектируют, например, антитела, специфические для антигена, детектируют в мышинной сыворотке, селезенку мыши собирают, и изолируют спленоциты. Затем спленоциты сливают хорошо известными методами с какими-либо подходящими миеломными клетками, например, клетками из клеточной линии SP20, доступной от Американской коллекции типовых культур (ATCC) (Манассас, Виргиния), с образованием гибридом. Гибридомы отбирают и клонируют методом предельного разведения. В некоторых воплощениях собирают лимфоузлы иммунизированных мышей и сливают с миеломными клетками NS0.

[00289] Затем полученные клетки гибридомы высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых исходных клеток миеломы. Например, если исходные клетки миеломы утрачивают фермент гипоксантингуанинфосфорибозил-трансферазу (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом типично будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

[00290] В конкретных воплощениях используют миеломные клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают устойчивое на высоком уровне продуцирование антитела отобранными продуцирующими антитело клетками и чувствительны к среде, такой как среда HAT. К числу таких клеточных линий относятся клетки миеломы мышей, такие как клеточная линия NS0, или клетки, полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, доступные от Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA, и клетки SP-2 или X63-Ag8.653, доступные от Американской коллекции

типовых культур, MD, USA. Описаны также клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломные клетки мышцы-человека для получения человеческих моноклональных антител (Kozbor D. (1984), J. Immunol., 133: 3001-5; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок).

[00291] Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, оценивают на продуцирование моноклональных антител, направленных против PD-1 (например, человеческого PD-1). Специфичность связывания моноклональных антител, продуцированных клетками гибридомы, определяют методами, известными в технике, например, иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

[00292] После того, как идентифицированы клетки гибридомы, которые продуцируют антитела желательной специфичности, аффинности и/или активности, клоны можно субклонировать процедурами предельного разведения и выращивать стандартными методами (Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, *цит. выше*). Подходящие культуральные среды для такой цели включают, например, среду D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* как асцитические опухоли у животного.

[00293] Моноклональные антитела, секретированные субклонами, соответственно отделяют от культуральной среды, асцитической жидкости или сыворотки обычными процедурами очистки иммуноглобулина, такими как, например, хроматография на белок А-сефарозе, гидроксипатите, гелеэлектрофорез, диализ или аффинная хроматография.

[00294] Антитела, описанные в настоящем описании, включают фрагменты антитела, которые узнают специфический PD-1 (например, человеческий PD-1), и могут быть получены любым методом, известным специалистам в данной области техники. Например, фрагменты Fab и F(ab')₂, описанные в настоящем описании, можно

получить протеолитическим расщеплением молекул иммуноглобулина с использованием ферментов, таких как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов $F(ab')_2$). Фрагмент Fab соответствует одному из двух идентичных плечей молекулы антитела и содержит полную легкую цепь в паре с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. Фрагмент $F(ab')_2$ содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы антитела, соединенных дисульфидными связями в шарнирном участке.

[00295] Кроме того, антитела, описанные в настоящем описании, также можно получить с использованием различных методов фагового дисплея, известных в технике. В методах фагового дисплея функциональные домены антитела отображаются на поверхности фаговых частиц, которые содержат полинуклеотидные последовательности, кодирующие их. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, библиотек человеческих и мышинных кДНК пораженных тканей). ДНК, кодирующие домены VH и VL, рекомбинируют вместе с линкером scFv ПЦР и клонируют в фагемидный вектор. Вектор подвергают электропорации в *E. coli*, и *E. coli* инфицируют хелперным фагом. Фаги, используемые в таких методах, типично являются нитчатými фагами, включая fd и M13, и домены VH и VL обычно рекомбинантно сливаются с фаговым геном III или геном VIII. Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с определенным антигеном, можно отобрать или идентифицировать с помощью антигена, например, с использованием меченого антигена или антигена, связанного с или захваченного на твердой поверхности или грануле. Примеры методов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител, описанных в настоящем описании, включают методы, раскрытые в Brinkman U. *et al.* (1995), *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50; Ames RS *et al.* (1995), *J. Immunol. Methods*, 184: 177-186; Kettleborough CA *et al.* (1994), *Eur. J. Immunol.*, 24: 952-958; Persic L. *et al.* (1997), *Gene*, 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994), *Advan. Immunol.*, 57: 191-280; заявке РСТ № РСТ/GB91/001134; международных публикациях №№ WO 90/02809, WO

91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844; и патентах США №№ 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00296] Как описано в указанных выше ссылках, после селекции фага можно изолировать антителокодирующие участки из фага и использовать для получения целых антител, включая человеческие антитела, или любой другой желательный антигенсвязывающий фрагмент и экспрессировать в любом желательном хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, описанные ниже. Методы рекомбинантного продуцирования фрагментов антител, таких как фрагменты Fab, Fab' и F(ab')₂, также можно использовать с использованием методов, известных в технике, таких как методы, описанные в публикации PCT № WO 92/22324; в Mullinax RL *et al.* (1992), *BioTechniques*, 12(6): 864-9; Sawai H. *et al.* (1995), *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34: 26-34; и в Better M. *et al.* (1988), *Science*, 240: 1041-1043, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00297] В некоторых воплощениях для получения целых антител можно использовать праймеры ПЦР, включая нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции для амплификации последовательностей VH или VL из матрицы, например, клонов scFv. С использованием методов клонирования, известных специалистам в данной области техники, ПЦР-амплифицированные VH домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный VH участок, и ПЦР-амплифицированные VL домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный VL участок например, человеческие константные участки каппа или лямбда. VH и VL домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные участки. Затем векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи котрансфицируют в клеточные линии для получения устойчивых или транзистентных клеточных линий,

которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники.

[00298] Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части антитела происходят из различных молекул иммуноглобулина. Например, химерное антитело может содержать переменный участок мышиного или крысиного антитела, слитый с константным участком человеческого антитела. Методы получения химерных антител известны в технике. См., например, Morrison SL (1985), *Science*, 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986), *BioTechniques*, 4: 214-221; Gillies SD et al. (1989), *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202; и патенты США №№ 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00299] Гуманизированное антитело способно связываться с заданным антигеном и включает каркасный участок, имеющий по существу аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина и CDR, имеющие по существу аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина (например, мышиного иммуноглобулина). В отдельных воплощениях гуманизированное антитело также включает по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), типично константного участка человеческого иммуноглобулина. Антитело также может включать CH1, шарнир, участки CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. Гуманизированное антитело можно выбрать из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA and IgE, и любого изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Гуманизированные антитела можно получить с использованием ряда методов, известных в технике, включая, но без ограничения, CDR-прививку (Европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967; и патенты США №№ 5225539, 5530101 и 5585089), вениринг или изменение поверхности (Европейские патенты №№ EP 592106 и EP 519596; Padlan EA (1991), *Mol. Immunol.*, 28(4/5): 489-498; Studnicka GM et al. (1994), *Prot. Engineering*, 7(6): 805-814; и Roguska MA et al. (1994), *PNAS*, 91: 969-973), перестановку цепей (патент США № 5565332), и методы, описанные, например, в патенте

США № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации № WO 93/17105; Tan P. *et al.* (2002), *J. Immunol.*, 169: 1119-25; Caldas C. *et al.* (2000), *Protein Eng.*, 13(5): 353-60; Morea V. *et al.* (2000), *Methods*, 20(3): 267-79; Baca M. *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, 272(16): 10678-84; Roguska MA *et al.* (1996), *Protein Eng.*, 9(10): 895-904; Couto JR *et al.* (1995), *Cancer Res.*, 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR *et al.* (1995), *Cancer Res.*, 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994), *Gene* 150(2): 409-10, и Pedersen JT *et al.* (1994), *J. Mol. Biol.*, 235(3): 959-73, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. См. также публикацию заявки на патент США № US 2005/0042664 A1 (24 февр. 2005), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[00300] Описаны методы получения мультиспецифических (например, биспецифических) антител, см., например, патенты США №№ 7951917, 7183076, 8227577, 5837242, 5989830, 5869620, 6132992 и 8586713, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00301] Однодоменные антитела, например, антитела, лишенные легких цепей, можно получить методами, хорошо известными в технике. См. Riechmann L. & Muyldermans S. (1999). *J. Immunol.*, 231: 25-38; Nuttall SD *et al.* (2000), *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 1(3): 253-263; Muyldermans S. (2001), *J. Biotechnol.*, 74(4): 277-302; патент США № 6005079; и международные публикации №№ WO 94/04678, WO 94/25591 и WO 01/44301, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00302] Кроме того, антитела, которые специфически связываются с антигеном PD-1, можно, в свою очередь, использовать для получения антиидиотипических антител, которые «имитируют» антиген, с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. См., например, Greenspan NS & Vona CA (1989), *FASEB J.*, 7(5): 437-444; и Nissinoff A. (1991), *J. Immunol.*, 147(8): 2429-2438, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00303] В отдельных воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, которое связывается с тем же эпитопом PD-1

(например, человеческого PD-1), что и анти-PD-1 антитело, описанное в настоящем описании, является человеческим антителом. В отдельных воплощениях антитело, описанное в настоящем описании, которое конкурентно блокирует (например, в зависимости от дозы) любое из антител, описанных в настоящем описании, от связывания с PD-1 (например, человеческим PD-1), является человеческим антителом. Человеческие антитела можно получить с использованием любого метода, известного в технике. Например, можно использовать трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены человеческого иммуноглобулина. В частности, комплексы генов человеческих тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина можно ввести случайно или путем гомологичной рекомбинации. С другой стороны, в эмбриональные стволовые клетки мыши, кроме генов человеческих тяжелой и легкой цепи, можно ввести человеческий переменный участок, константный участок и дополнительный участок. Гены мышиных тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина могут быть представлены нефункциональными отдельно или одновременно с введением локусов человеческого иммуноглобулина путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция участка J_H предотвращает продуцирование эндогенных антител. Выращивают модифицированные эмбриональные стволовые клетки и инъецируют в бластоциты, и получают химерных мышей. Затем химерных мышей размножают для получения гомозиготного потомства, которое экспрессирует антитела. Трансгенных мышей обычным образом иммунизируют выбранным антигеном, например, всем или частью антигена (например, PD-1). Моноклональные антитела, направленные против антигена, можно получить от иммунизированных трансгенных мышей с использованием обычной гибридомной технологии. Трансгены человеческого иммуноглобулина, укрытые трансгенными мышами, перестраиваются во время дифференцировки В-клеток и затем претерпевают переключение класса и соматическую мутацию. Таким образом, с использованием такого метода возможно получить терапевтически применимые антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор такой технологии для получения человеческих антител см. в

Lonberg N. & Huszar D. (1995), *Int. Rev. Immunol.*, 13: 65-93, полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Подробное раскрытие такой технологии для получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител и протоколы получения таких антител см., например, в международных публикациях №№ WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735 и патентах США №№ 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок. Примеры мышей, способных продуцировать человеческие антитела, включают Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; патенты США №№ 6075181 и 6150184), HuAb-Mouse™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; патенты США №№ 5545806 и 5569825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) и KM Mouse™ (Medarex/Kirin), где все работы полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00304] Человеческие антитела, которые специфически связываются с PD-1 (например, человеческим PD-1), можно получить рядом методов, известных в технике, включая методы фагового дисплея, описанные выше, с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. См. также патенты США №№ 4444887, 4716111 и 5885793; и международные публикации №№ WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741, которые все полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[00305] В некоторых воплощениях человеческие антитела можно получить с использованием гибридом мышь-человек. Например, лимфоциты периферической крови человека, трансформированные вирусом Эпштейна-Барра (EBV), можно слить с клетками миеломы мыши и получить гибридомы мышь-человек, секретирующие человеческие моноклональные антитела, и такие гибридомы мышь-человек можно скринировать для определения гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с антигеном-мишенью (например, PD-1 (например, человеческим PD-1)). Такие методы известны и описаны

в технике, см., например, Shinmoto H. *et al.* (2004), *Cytotechnology*, 46: 19-23; Naganawa Y. *et al.* (2005), *Human Antibodies*, 14: 27-31, которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок.

5.6. Наборы

[00306] Изобретение также относится к наборам, включающим одно или несколько антител, описанных в настоящем описании, или их фармацевтические композиции или конъюгаты. Конкретное воплощение относится к фармацевтической упаковке или набору, включающим один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в настоящем описании, такими как одно или несколько антител, описанных в настоящем описании. В некоторых воплощениях наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании, и любое профилактическое или терапевтическое средство, такое как описанные в настоящем описании. В некоторых воплощениях наборы могут содержать Т-клеточный митоген, такой как, например, фитогемагглютинин (РНА) и/или форболмиристатацетат (РМА), или антитело, стимулирующее ТСR-комплекс, такое как анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело. Необязательно в ассоциации с таким(и) контейнером(ами) может находиться уведомление в форме, предписанной правительственным учреждением, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, в котором отражено одобрение учреждением изготовления, применения или продажи для назначения человеку.

[00307] Изобретение также относится к наборам, которые можно использовать в описанных выше методах. В одном воплощении набор включает антитело, описанное в настоящем описании, предпочтительно очищенное антитело, в одном или нескольких контейнерах. В конкретном воплощении наборы, описанные в настоящем описании, содержат по существу изолированный антиген PD-1 (например, человеческий PD-1) как контроль. В другом конкретном воплощении наборы, описанные в настоящем описании, содержат контрольное антитело, которое не взаимодействует с антигеном PD-1. В другом конкретном воплощении наборы, описанные

в настоящем описании, содержат один или несколько элементов для детекции связывания антитела с антигеном PD-1 (например, антитело может быть конъюгировано с детектируемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или второе антитело, которое узнает первое антитело, может быть конъюгировано с детектируемым субстратом). В конкретных воплощениях набор, описанный в настоящем описании, может включать антиген PD-1, полученный рекомбинантно или синтезированный химически. Антиген PD-1, представленный в наборе, также может быть присоединен к твердой основе. В более конкретном воплощении средство для детекции в вышеописанном наборе включает твердую подложку, к которой присоединен антиген PD-1. Такой набор также может включать неприсоединенное репортерное меченное античеловеческое антитело или антимышиное/крысиное антитело. В таком воплощении связывание антитела с антигеном PD-1 можно обнаружить путем связывания указанного репортерного меченого антитела. В одном воплощении настоящее изобретение относится к применению набора по настоящему изобретению для *in vitro* анализа и/или детекции антигена PD-1 (например, человеческого PD-1) в биологическом образце.

6. ПРИМЕРЫ

[00308] Примеры в данном разделе (т.е., разделе 6) предлагаются для пояснения, но не для ограничения изобретения.

6.1. Пример 1. Характеризация анти-PD-1 антител

[00309] В этом примере описывается характеристика антител, которые специфически связываются с человеческим PD-1, в частности, антитела, обозначенные AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w. AGEN2033w и AGEN2046w разделяют одну и ту же аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO: 15) и одну и ту же аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 16). AGEN2034w и AGEN2047w разделяют одну и ту же аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO: 17) и одну и ту же аминокислотную последовательность

вариабельного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 16). AGEN2033w и AGEN2034w являются человеческими антителами IgG₄, содержащими мутацию S228P (т.е., замену серина на пролин в позиции 228 относительно константного участка IgG₄ дикого типа), согласно нумерации системы EU, в то время как AGEN2046w и AGEN2047w являются человеческими антителами IgG₁. Кроме того, также характеризуются три мутанта Fc AGEN2047w: мутант N297A, двойной мутант S267E/L328F и тройной мутант S239D/A330L/I332E, с нумерацией согласно нумерации системы EU.

6.1.1. Антитела, связывающиеся с PD-1, экспрессированным активированными T-клетками

[00310] Анти-PD-1 антитела AGEN2046w, AGEN2047w и AGEN2034w проверяют на связывание с активированными мононуклеарными клетками периферической крови (PBMCs) методом проточной цитометрии. Криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, каталожный номер (кат.№) 002), или криоконсервированные PBMC яванского макака (Worldwide Primates Inc., по заказу) высевают при 10⁵ клетки/лунка в среде RPMI1640 с добавлением нормоцина™ (InvivoGen, кат.№ ant-nr-1) и 10% инактивированной нагреванием FBS (Gibco, кат.№ 16140063) в 96-луночные планшеты с поверхностью NUNC LON delta (NUNC™). Клетки культивируют в присутствии 100 нг/мл стафилококкового энтеротоксина А (SEA; для человеческих PBMC) (Toxin Technologies, кат.№ at101red) или стафилококкового энтеротоксина В (SEB; для PBMC яванского макака) (Toxin Technology, кат.№ bt202red) в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Затем клетки промывают один раз буфером для образца (PBS+2% FBS+0,09% азида натрия) и инкубируют в темноте на льду со 100 мкл серийно разведенных антител или изотипических контролей (10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 и 0,0001 мкг/мл AGEN2046w, AGEN2047w или изотипического контрольного человеческого IgG₁ (LifeTein LLC, кат.№ LT12031); или 25, 5, 1, 0,2, 0,04, 0,008, 0,0016, 0,00032 и 0,000064 мкг/мл AGEN2034w или изотипического контрольного человеческого IgG₄ (LifeTein LLC, кат.№ LT12034)). Через 45 минут клетки дважды промывают буфером

для образца и затем инкубируют с красителем для мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (Life Technologies, кат.№ L10119), CD4-BV421 (Biolegend, кат.№ 317434) и козьим F(ab')₂ античеловеческим IgG+A+M, R-PE (Life Technologies, кат.№ AN11707) в течение 30 минут. Клетки дважды промывают буфером для образца и затем ресуспендируют в буфере для образца и анализируют с помощью цитометра FACS Fortessa (Becton Dickinson). CD4+ Т-клетки задерживают, и регистрируют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

[00311] Анти-PD-1 антитела AGEN2046w и AGEN2047w связывают с активированными человеческими CD4+ Т-клетками (фигура 1A). AGEN2034w связывают с активированными CD4+ Т-клетками человека и яванского макака (фигуры 1B и 1C).

[00312] Связывание AGEN2034w с активированными первичными человеческими Т-клетками измеряют снова в подобном анализе. Коротко, человеческие PBMC культивируют в присутствии 100 нг/мл пептида SEA в течение 5 суток и затем окрашивают серийно разведенным (50, 10, 2, 0,4, 0,080, 0,016, 0,0032, 0,00064, 0,000128, 0,0000256, 0,00000512 и 0,000001024 мкг/мл) AGEN2034w или изотипическим контрольным человеческим IgG₄. Клетки анализируют с помощью цитометра FACS Fortessa (Becton Dickinson). CD4+ Т-клетки задерживают, и регистрируют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

[00313] Как видно на фигуре 1D, AGEN2034w связывается с активированными первичными человеческими CD4+ Т-клетками.

6.1.2. Анализ на селективность антитела против PD-1

[00314] Селективность AGEN2034w в отношении PD-1 оценивают против гомологичных белков с использованием технологии «suspension array».

[00315] На основании гомологии их аминокислотных последовательностей с PD-1, отбирают белки суперсемейства Ig кольцевой гомолог 2 (ROBO2), B7 гомолог 7 (B7-H7) и сигнальный регуляторный белок гамма (SIRPγ) для оценки связывания AGEN2034w с использованием технологии «suspension array». ROBO2, B7-H7 и SIRPγ идентифицируют как гомологи PD-1, выравнивая белки с

применением средства поиска Basic Local Alignment (BLAST; NCBI). Гомология последовательностей человеческого PD-1 с его гомологами следующая: человеческого PD-1 *против* (*vs*) человеческого ROBO2: 27,9%; человеческого PD-1 *vs* человеческого SIRPγ (SIRPG_HUMAN): 24,8%; и человеческого PD-1 *vs* человеческого B7-H7: 22,6%.

[00316] Рекомбинантные белки химера человеческий ROBO2-Fc (R&D Systems, кат.№ 3147-RB-050), химера человеческий B7-H7-Fc (R&D Systems, кат.№ 8084-B7-050), химера человеческий SIRPγ-His (Sino Biologicals, кат.№ 11828-H08H) и химера человеческий PD-1-Fc (R&D Systems, кат.№ 1086-PD) вводят в сочетание с микросферами Luminox® (Luminox Corp., кат.№ LC10005-01, LC10022-01, LC10046-01, LC10048-01 и LC10059-01) с использованием химии сложных эфиров N-гидроксисукцинимиды (NHS) и инкубируют с титрованием дозы (7,5, 2,5, 0,833, 0,277, 0,0926, 0,0309, 0,0103, 0,0034, 0,0011, 0,0004, 0,0001 и 0,00004 мкг/мл) AGEN2034w. Затем для детекции AGEN2034w добавляют антитело античеловеческий IgG, меченный фикоэритрином (PE). Связывание оценивают с помощью системы детекции Luminox® 200.

[00317] Антитело AGEN2034w показывает специфическое связывание с человеческим PD-1 и в испытываемых концентрациях не обнаруживают существенного связывания с ROBO2, B7-H7 или SIRPγ (фигура 2).

6.1.3. Лигандблокирующая активность, определенная с помощью технологии «suspension array»

[00318] Для того, чтобы определить, блокируют ли анти-PD-1 антитела связывание лигандов PD-L1 и PD-L2, проводят вышеописанный анализ с использованием технологии suspension array. В каждую лунку на половине площади 96-луночных планшетов (Corning, Inc., кат.№ 3884) добавляют 1200 гранул Luminox® в 5 мкл буфера для анализа (Luminox Corp, кат.№ 48 LC10014-48). Гранулы соединяют с химерой антигена PD-1 PD-1-Fc (R&D Systems, кат.№ 1086-PD) через аминокислотное сочетание с COOH на поверхности гранул. Реакцию сочетания выполняют с использованием 50 мкг/мл антигена PD-1 и 1×10^7 гранул Luminox на мл. Используют

стандартную химию сложных эфиров NHS для образования карбодиимидных связей между первичными аминогруппами антигена и карбоксильными группами на поверхности гранул (Luminex Xmap cookbook, chapter 3).

[00319] Сочетание антигена с белками является простой двухстадийной процедурой для образования карбодиимидных связей, во время которой карбоксильные группы микросфер сначала активируются реагентом EDC (гидрохлорид 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида) в присутствии сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид) с образованием промежуточного сложного сульфо-NHS-эфира. Затем реакционноспособное промежуточное соединение восстанавливают путем взаимодействия с первичным амином молекулы-мишени (антитела, белка или пептида) с образованием ковалентной амидной связи. Гранулы для сочетания инкубируют с различными концентрациями анти-PD-1 антител при трехкратном повторе (конечные концентрации от 7,5 мкг/мл до 0,01 мкг/мл на лунку) в течение 1 часа при 20°C и 650 об/мин. Испытываемыми антителами являются AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w, изотипический контроль IgG₁ и изотипический контроль IgG₄. Затем в каждую лунку добавляют 30 мкл меченого R-PE PD-L1-Fc (системы R&D, кат.№ 156-B7) или PD-L2-Fc (системы R&D, кат.№ 1224-PL) в концентрации 1 нМ, получая общий объем в лунке 60 мкл (1200 гранул на лунку и конечная концентрация 0,5 нМ меченого PD-L1 или PD-L2). Мечение лиганда проводят с использованием наборов для мечения R-PE (AbDSerotec, LYNX Rapid RPE Antibody Conjugation Kit, кат.№ LNK023RPE) согласно протоколу изготовителя. Планшеты анализируют с использованием системы Luminex® 200 (Millipore). Насчитывают 100 гранул на лунку в образце 50 мкл. Лигандблокирующий потенциал вычисляют с использованием величин MFI неконкурирующего сигнала (100% связывание) только контрольного лиганда. Детектируемый сигнал PE показывает связывание лиганда с антигеном.

[00320] Все испытываемые анти-PD-1 антитела ингибируют связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1 (фигуры 3A-3D).

[00321] Измерение лигандблокирующей активности AGEN2034w

повторяют в подобном анализе. Коротко, рекомбинантную химеру PD-1-Fc (R&D Systems, кат.№ 1086-PD) сочетают с микросферами Luminex® (Luminex Corp, Кат.№ LC10048-01) с использованием химии сложных эфиров N-гидроксисукцинимид (NHS). Гранулы с присоединенным PD-1 инкубируют с титрованием дозы ($4,0 \times 10^{-5}$ -7,5 мкг/мл) AGEN2034w или изотипического контрольного антитела с последующей инкубацией флуоресцентно меченного PD-L1-Fc (R&D Systems, кат.№ 156-B7) или PD-L2-Fc (R&D Systems, кат.№ 1224-PL). Затем оценивают связывание PD-L1 или PD-L2 с гранулами с присоединенным PD-1 с использованием системы детекции Luminex® 200, и регистрируют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

[00322] Антитело AGEN2034w эффективно блокирует сцепление PD-1 с его лигандами PD-L1 (фигура 3E) и PD-L2 (фигура 3F).

6.1.4. Действие анти-PD-1 антител на человеческие PBMC после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEA)

[00323] Функциональную активность анти-PD-1 антител на первичных человеческих Т-клетках оценивают с использованием стимуляции SEA. Криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, кат.№ 002), высевают при 10^5 клетки/лунка в среде RPMI1640 с добавлением нормоцина™ (InvivoGen, кат.№ ant-nr-1) и 10% инактивированной нагреванием FBS (Gibco, кат.№ 16140063) в 96-луночные планшеты с поверхностью NUNC LON delta (NUNC™). Клетки культивируют в присутствии фиксированной концентрации (10 мкг/мл) или дозовых количеств антител (50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016 и 0,0032 мкг/мл) и фиксированного количества SEA (100 нг/мл, Toxin Technology, кат.№ at101red) в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Испытываемыми антителами являются AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w и изотипический контроль IgG₁. Супернатант собирают и хранят при -80°C до анализа. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

[00324] Как видно на фигурах 4A и 4B, анти-PD-1 антитела AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w и AGEN2047w повышают продуцирование IL-2 PBMC относительно изотипического контроля

при наличии стимуляции SEA.

[00325] Далее, проверяют антагонистическую активность AGEN2034w или одного или в комбинации с анти-CTLA-4, анти-TIGIT, анти-CD137 или анти-OX40 антителами в анализе первичных PBMC, описанном выше. Коротко, криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, кат.№ 002), культивируют с суперантигеном SEA (Toxin Technology, кат.№ at101red) (100 нг/мл на фигурах 4C, 4D и 4F; 200 нг/мл на фигуре 4E) и AGEN2034w (10 мкг/мл на фигурах 4C и 4E; 5 мкг/мл на фигуре 4D; интервал дозы 12, 6, 3, 0,3, 0,03, 0,003, 0,0003 и 0,0001 мкг/мл на фигуре 4F) или изотипическим контрольным антителом в присутствии 5 мкг/мл анти-CTLA-4 антитела ипилимумаба (Myoderm) (фигура 4C), 10 мкг/мл анти-TIGIT антитела rab2197 или rab2196 (фигура 4D), 5 мкг/мл анти-CD137 антитела rab2225 (фигура 4E) или интервала дозы (12, 6, 3, 0,3, 0,03, 0,003, 0,0003 и 0,0001 мкг/мл) анти-OX40 антитела rab1928 в течение 5 суток. Супернатанты собирают, и измеряют титры IL-2 с использованием AlphaLISA (Perkin Elmer, кат.№ AL221C). Анти-TIGIT антитела rab2197 и rab2196 получают на основе последовательностей переменного участка антител 10A7 и 1F4, соответственно, описанных в публикации заявки на патент США № US2013/0251720 (полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки). Анти-CD137 антитело rab2225 получают на основе последовательностей переменного участка антитела 20H4, описанного в патенте США № 8137667 (полностью включенном в настоящее описание в качестве ссылки). Анти-OX40 антитело rab1928 получают на основе последовательностей переменного участка антитела Hu106-122, описанного в публикации заявки на патент США № US 2013/0280275 (полностью включенной в настоящее описание в качестве ссылки). Последовательности анти-TIGIT, анти-CD137 и анти-OX40 антител приводятся в таблице 8.

Таблица 8. Последовательности анти-TIGIT, анти-CD137 и анти-OX40 антител

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
66	rab2197, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLTQP GKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGK GLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDNANKLLFLQMN DL KSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
67	rab2197, легкая цепь	DIVMTQSPSSSLAVSPGEEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQ QKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQA EDMGQYFCQQGINNPLTFGDGKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
68	rab2196 тяжелая цепь	EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGK NLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSL TSDDSAVYFCRGLRGFYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG

69	rab2196 легкая цепь	DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSI SCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLH KPGQSPQLLIFGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPE DLGMYCLOQTHQPPTFGPGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGE C
70	rab2225 тяжелая цепь	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEK GLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSSTV AADTAVYYCARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
71	rab2225 легкая цепь	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVY YCQQRSNWPPALTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
72	rab1928 тяжелая цепь	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYSMHWRQAPGQ GLKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSL KAEDTAVYYCANPYDYVSYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

73	pab1928 легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYLYTGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATY YCQQHYSTPRTFGQGTKLEIKRSVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS YSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
----	---------------------------	---

[00326] Анти-PD-1 антитело AGEN2034w, или одно или в комбинации с анти-CTLA-4 антителом ипилимумабом (фигура 4C), анти-TIGIT антителом pab2197 или pab2196 (фигура 4D), анти-CD137 антителом pab2225 (фигура 4E) или анти-OX40 антителом pab1928 (фигура 4F), усиливает продуцирование IL-2 в человеческих PBMC в присутствии суперантигена SEA.

6.1.5. Влияние связывания Fc-рецептора на антагонистическую активность анти-PD-1 антител

[00327] В этом примере проверяют влияние связывания FcγR на антагонистическую активность анти-PD-1 антител.

[00328] Сначала проверяют антагонистическую активность эталонного анти-PD-1 антитела в присутствии или в отсутствие блокаторов FcγR. Кримоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, кат.№ 002), высевают при 10^5 клетки/лунка в среде RPMI1640 с добавлением нормоцина™ (InvivoGen, кат.№ ant-nr-1) и 10% инактивированной нагреванием FBS (Gibco, кат.№ 16140063) в 96-луночные планшеты с поверхностью NUNCCLON delta (NUNC™). Клетки культивируют со 100 нг/мл пептида SEA (Toxin Technology, кат.№ at101red) и 10 мкг/мл эталонного анти-PD-1 антитела или изотипического контроля в присутствии или в отсутствие фиксированной концентрации блокирующего Fc-рецептор коктейля, содержащего анти-CD16 антитело (1 мкг/мл, системы R&D, кат.№ AF1330) и иррелевантный IgG₁ (25 мкг/мл, LifeTein, кат.№ LT12031), в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Супернатанты собирают и хранят при -80°C до анализа. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

[00329] Блокада FcγR с использованием анти-CD16 антитела усиливает способность эталонного анти-PD-1 антитела индуцировать секрецию IL-2 в таком анализе первичных человеческих PBMC

(фигура 5A).

[00330] Подобное исследование проводят для проверки влияния блокады FcγR на антагонистическую активность AGEN2034w. Коротко, человеческие PBMC культивируют со 100 нг/мл пептида SEA (Toxin Technology, кат.№ at101red), 10 мкг/мл AGEN2034w или изотипическим контрольным антителом (HEL IgG₁, LifeTein, кат.№ LT12031), и 20 мкг/мл анти-CD16 антитела (Biolegend, кат.№ 302013), анти-CD32 антитела (eBioscience, кат.№ 16-0329-81), которое связывается как с CD32A, так и с CD32B, анти-CD64 антитела (Biolegend, кат.№ 305016) или изотипического контроля (Biolegend, кат.№ 400543) в течение 5 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Супернатанты собирают и хранят при -80°C до анализа. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

[00331] В соответствии с результатом на фигуре 5A, блокада FcγR с использованием анти-CD16 антитела, анти-CD32 антитела или анти-CD64 антитела повышает секрецию IL-2, вызванную AGEN2034w, в таком анализе первичных человеческих PBMC (фигура 5B).

[00332] Далее, получают три мутанта Fc IgG₁ AGEN2047w (мутант N297A, двойной мутант S267E/L328F и тройной мутант S239D/A330L/I332E, с нумерацией согласно нумерации системы EU) и сравнивают против AGEN2047w, которое включает константный участок IgG₁ дикого типа, в анализе человеческих PBMC с SEA, описанном выше. Коротко, криоконсервированные человеческие PBMC инкубируют со 100 нг/мл SEA и 10 мкг/мл анти-PD-1 антител AGEN2047w, AGEN2047w-N297A, AGEN2047w-S267E/L328F, AGEN2047w-S239D/A330L/I332E или изотипических контрольных антител с соответствующими Fc участками дикого типа или мутантными.

[00333] Как видно на фигуре 5C, мутант N297A с пониженным связыванием FcγR дополнительно усиливает секрецию IL-2. Напротив, двойной мутант S267E/L328F и тройной мутант S239D/A330L/I332E, которые оба имеют усиленное связывание FcγR, индуцируют меньшее продуцирование IL-2, чем индуцирует AGEN2047w дикого типа.

6.1.6. Влияние анти-PD-1 антитела на реакцию в смешанной культуре лимфоцитов

[00334] Далее, анти-PD-1 антитело AGEN2034w проверяют в реакции в смешанной культуре лимфоцитов. Дендритные клетки, полученные из изолированных CD14+ клеток (Stemcell Technologies, кат.№ 18058), полученных из криоконсервированных HLA-A2+ человеческих PBMC и дифференцированных сначала в присутствии 500 Е/мл IL-4 (Peprotech, кат.№ 200-04-20UG) и 1000 Е/мл GM-CSF (Peprotech, кат.№ 300-03-20UG) в течение 24 часов и затем в присутствии 1000 Е/мл TNF α (Peprotech, кат.№ 300-01A-50UG), 10 нг/мл IL-1 β (Peprotech, кат.№ 200-01B-10UG), 10 нг/мл IL-6 (Peprotech, кат.№ 200-06-20UG) и 1 мкМ PGE2 (Sigma, кат.№ P0409-5MG) в течение еще 24 часов. Отобранные 50000 Т-клеток, очищенных от аллогенного донора HLA-A2 человеческих PBMC очисткой на колонке MACS (Miltenyi Biotec, кат.№ 130-096-535), культивируют совместно с 10000 дендритных клеток в отсутствие какого-либо антитела или в присутствии 10 мкг/мл изотипического контрольного антитела человеческого IgG₄ (Biolegend, кат.№ 403402) или 10 мкг/мл AGEN2034w в RPMI (Corning, кат.№ 10-040-CM), содержащей 5% человеческой сыворотки АВ (Corning, кат.№ 35-060-CI) и пенициллин/стрептомицин (Gibco, кат.№ 15140-122). Культуры инкубируют в течение 5 суток при 37°C и 5% CO₂. Супернатанты оценивают на стационарные концентрации IFN γ с использованием AlphaLISA (Perkin Elmer, кат.№ AL217C).

[00335] Как видно на фигуре 6, AGEN2034w индуцирует продуцирование IFN γ в совместной культуре очищенных человеческих Т-клеток и полученных *in vitro* аллогенных дендритных клеток.

6.1.7. Действие анти-PD-1 антитела в анализе на супрессию асцитических жидкостей

[00336] В этом примере анти-PD-1 антитело AGEN2034w проверяют на его способность ослаблять супрессию пролиферации Т-клеток, вызванную асцитической жидкостью при раке яичников. Коротко, первичные человеческие PBMC метят CFSE (Biolegend, кат.№ 423801) и затем стимулируют 1 мкг/мл анти-CD3 антитела (eBioscience, кат.№ 16-0037-85) и 50%, объем/объем, асцитической жидкостью при раке яичников в присутствии возрастающих концентраций (0,00000102-50 мкг/мл) AGEN2034w или изотипического

контрольного антитела IgG₄ (Biolegend, кат.№ 317434) в течение 4-5 суток. Клетки окрашивают иммунно античеловеческим CD4 антителом (Biolegend, кат.№ 317434) или античеловеческим CD8 антителом (Biolegend, кат.№ 344710) и красителем для определения жизнеспособности LIVE-DEAD (Life Technologies, кат.№ L10119). Проллиферацию CD4+ или CD8+ Т-клеток, как иллюстрирует разведение CFSE, измеряют проточной цитометрией с использованием BD Fortessa (Becton Dickinson).

[00337] Как видно на фигурах 7А-7С, совместное культивирование с асцитической жидкостью при раке яичников снижает пролиферацию стимулированных анти-CD3 антителом Т-клеток, и такое снижение может быть частично ослаблено анти-PD-1 антителом AGEN2034w.

6.1.8. Действие анти-PD-1 антитела в репортерном анализе клеток Юрката NFAT-люциферазы

[00338] Кроме того, репортерный анализ используют для зондирования антагонистической активности AGEN2034w. Конкретно, в таком репортерном анализе совместная культура PD-L1-экспрессирующих клеток-мишеней и PD-1-экспрессирующих репортерных клеток ингибирует экспрессию NFAT-люциферазного репортерного гена в репортерных клетках. Блокада взаимодействия PD-1/PD-L1 анти-PD-1 антителом может ослабить сигнал ингибирования, что ведет к экспрессии люциферазы.

[00339] Коротко, PD-L1+ CHOK1 клетки-мишени (Promega, кат.№ CS187108) культивируют совместно с GloResponse™ NFAT-luc2/PD-1 репортерные клетки Юрката (Promega, кат.№ CS187102) в присутствии возрастающих концентраций (0-50 мкг/мл) AGEN2034w или изотипического контрольного антитела в среде RPMI-1640 (Corning, кат.№ 21-040-CV) с добавлением 2% инактивированной нагреванием FBS (Gemini, кат.№ 100-106). После 6 часов инкубации определяют эффективность AGEN2034w в ослаблении супрессии репортерного гена, индуцированной связыванием PD-L1 с PD-1, определяя люциферазу с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, кат.№ G7941).

[00340] Как видно на фигуре 8, анти-PD-1 антитело AGEN2034w

усиливает передачу сигнала TCR в зависимости от дозы в таком репортерном анализе Юрката-NFAT-люцифераза.

6.2. Пример 2. Характеризация дополнительных анти-PD-1 антител

[00341] В этом примере характеризуют следующие шесть дополнительных анти-PD-1 антител: AGEN2001w, AGEN2002w, EP11_p11_B03, EP11_p11_B05, EP11_p11_C02 и EP11_p11_C03. Последовательности переменных тяжелой цепи и переменных легкой цеп этих антител раскрыты в таблице 6.

6.2.1. Анализ анти-PD-1 антител на связывание и блокаду лиганда

[00342] Аффинность шести анти-PD-1 антител, описанных выше, анализируют поверхностным плазмонным резонансом. Все шесть антител связываются с рекомбинантным человеческим PD-1 (данные не приводятся).

[00343] Активность блокирования лигандов шести анти-PD-1 антител проверяют с использованием технологии «suspension array» в анализе, схожем с анализом, описанным в разделе 6.1.3. Объединенные гранулы инкубируют с различными концентрациями анти-PD-1 антител при двукратном повторе (конечные концентрации от 7,5 мкг/мл до 0,001 мкг/мл на лунку) в течение 1 часа при 20°C и 650 об/мин. Затем добавляют меченный R-PE PD-L1-Fc (R&D Systems, кат.№ 156-B7) или PD-L2-Fc (R&D Systems, кат.№ 1224-PL). Испытываемыми анти-PD-1 антителами являются AGEN2001w, AGEN2002w, EP11_p11_B03, EP11_p11_B05, EP11_p11_C02 и EP11_p11_C03. Как видно на фигурах 9A-9F, все испытываемые анти-PD-1 антитела блокируют связывание PD-1 с PD-L1 и PD-L2 в зависимости от дозы.

6.2.3. Влияние анти-PD-1 антител на человеческие PBMC после стимуляции стафилококковым энтеротоксином А (SEF)

[00344] Функциональную активность анти-PD-1 антитела AGEN2002w на человеческих PBMC проверяют в анализе, схожем с анализом, описанным в разделе 6.1.4. Коротко, криоконсервированные человеческие PBMC, полученные из неочищенных лейкоцитных пленок (Research Blood Components, кат.№

002), культивируют в присутствии 10 мкг/мл анти-PD-1 антитела AGEN2002w или изотипического контрольного антитела (HEL IgG₁, LifeTein, кат.№ LT12031) и 100 нг/мл пептида SEA (Toxin Technologies, кат.№ at101red) в течение 4 суток при 37°C, 5% CO₂ и влажности 97%. Супернатанты собирают и хранят при -80°C до анализа. Титры IL-2 измеряют методом электрохемилюминесценции (MSD).

[00345] Как видно на фигуре 10, анти-PD-1 антитело AGEN2002w повышает продуцирование IL-2 первичными человеческими PBMC при наличии стимуляции SEA.

6.3. Пример 3. Картирование эпитопа анти-PD-1 антитела

[00346] Эпитоп анти-PD-1 антитела AGEN2034w характеризуют с использованием масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX) и анализа Pepscan.

6.3.1. Картирование эпитопа анти-PD-1 Fab с использованием масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX)

[00347] Взаимодействие фрагмента Fab AGEN2034w (AGEN2034w-Fab) с внеклеточным доменом человеческого PD-1 исследуют масс-спектрометрией водородно-дейтериевого обмена (HDX).

[00348] Рекомбинантный меченный His человеческий PD-1 получают от Sino Biological Inc (Cat# 10377-H08H). При использовании дегликозилированного PD-1 его получают из 300 мкг рекомбинантного меченного His белка человеческого PD-1 инкубацией с 6 мкл PNGазы F при 37°C в течение 4 часов. Фрагмент Fab анти-PD-1 антитела получают из AGEN2034w путем обработки протеазой.

[00349] Для расщепления пепсином/протеазой XVIII 4,0 мкг нативного или дегликозилированного человеческого PD-1 в 125 мкл буфера для контроля (50 мМ фосфата, 100 мМ хлорида натрия при pH 7,4) денатурируют, добавляя 135 мкл 4 М гидрохлорида гуанидина, 0,85 М буфера TCEP (конечный pH составляет 2,5), и инкубируют смесь в течение 3 минут при 11°C. Затем смесь подвергают расщеплению на колонке с пепсином/протеазой XVIII, используя колонку, набитую пепсином/протеазой XVIII на месте, и полученные пептиды анализируют с использованием системы СВЭЖХ-МС, состоящей

из СВЭЖХ Waters Acquity в сочетании с квадрупольным с орбитальной ловушкой масс-спектрометром Q Exactive™ Hybrid (Thermo). Пептиды разделяют на колонке 50 мм × 1 мм, C8, с 19-мин градиентом 2-27% растворителя В (0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Идентификацию пептидов осуществляют через поиск данных МС/МС против последовательности человеческого PD-1 с помощью Mascot. Допуск по массе для ионов предшественника и продукта составляет 10 ч/млн и 0,05 Да, соответственно.

[00350] Инкубируют 10 мкл человеческого PD-1 (4,0 мкг) или 10 мкл смеси человеческого PD-1 и Fab (4,0 мкг, 4,0 мкг) со 125 мкл буфера для мечения оксидом дейтерия (50 мМ фосфата натрия, 100 мМ хлорида натрия при рD 7,4) в течение 0 секунд, 60 секунд, 600 секунд и 3600 секунд при 11°C. Обмен водород/дейтерий гасят, добавляя 135 мкл раствора 4 М гидрохлорида гуанидина, 0,85 М буфера TCEP (конечный рН составляет 2,5). Затем погашенные образцы подвергают расщеплению на колонке с пепсином/протеазой XVIII и анализу ЖХ-МС, описанным выше. Масс-спектры регистрируют только в моде МС.

[00351] Необработанные данные МС обрабатывают с использованием программы HDX WorkBench для анализа данных МС обмена Н/Д (J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2012, 23 (9), 1512-1521, включена полностью в настоящее описание в качестве ссылки). Уровни дейтерия вычисляют с использованием среднего различия в массе между дейтерированным пептидом и его нативной формой (t_0).

[00352] Покрытие последовательности 85,4% достигают для дегликозилированного человеческого PD-1 без метки His. Большинство пептидов PD-1 отображает идентичные или схожие уровни дейтерия в присутствии и в отсутствие Fab против человеческого PD-1. Однако обнаружено, что некоторые пептидные сегменты имеют существенно сниженные уровни включения дейтерия после связывания Fab. Все остатки в этом абзаце нумерованы согласно SEQ ID NO: 74. Дегликозилированный человеческий PD-1 показывает сильное снижение поглощения дейтерия после связывания с Fab против человеческого PD-1 в остатках 107-122 (SLAPKAQIKESLRAEL) (SEQ ID NO: 75). Кроме того, снижение поглощения дейтерия после

связывания с Fab против человеческого PD-1 можно наблюдать в остатках 5-22 (LDSPDRPWNPPTFSPALL) (SEQ ID NO: 76).

6.3.2. Картирование эпитопа анти-PD-1 антитела с использованием анализа Pepscan

[00353] Связывание анти-PD-1 антитела AGEN2034w измеряют против фрагментов синтезированного пептида PD-1, полученных в виде пептидной матрицы, связанной с чипом. Анализ выполняют в Pepscan Presto BV, Lelystad, Нидерланды. Коротко, для реконструкции эпитопов человеческого PD-1 синтезируют библиотеку пептидов. Носитель аминифункционализированный полипропилен получают прививкой патентованного препарата гидрофильного полимера с последующим взаимодействием с трет-бутоксикарбонилгексаметилендиамином (BocHMDA), используя дициклогексилкарбодиимид (DCC) с N-гидроксibenзотриазолом (HOBT), и затем отщеплением Boc-групп с использованием трифторуксусной кислоты (ТФК). Используют стандартный Fmoc-пептидный синтез для синтеза пептидов на аминифункционализированном твердом носителе с помощью модифицированной по заказу жидкости JANUS, управляющей расположением (Perkin Elmer). Синтез структурных миметиков проводят с использованием патентованной технологии химически связанных пептидов на каркасах (CLIPS) Pepscan. Технология CLIPS позволяет пептидам структурироваться в одинарные петли, двойные петли, тройные петли, листообразные складки, спиралеобразные складки и их комбинации. Связывание антитела с каждым из синтезированных пептидов проверяют в ELISA на основе PEPSCAN. Пептидные матрицы инкубируют с раствором первичного антитела в течение ночи при 4°C. После промывки пептидные матрицы инкубируют с конъюгатом козьего античеловеческого HRP (Southern Biotech, кат.№ 2010-05) в течение одного часа при 25°C. После промывки добавляют пероксидазный субстрат сульфат 2,2'-азиноди-3-этилбензтиазолина (ABTS) и 20 мкл/мл 3% H₂O₂. Спустя один час отмечают проявление окраски и определяют количественно с помощью прибора с зарядовой связью (CCD) -камеры и системы обработки изображения.

[00354] Исследование Pepscan показывает, что анти-PD-1 антитело AGEN2034w узнает отрезки человеческого PD-1, включая остатки 6-15 (DSPDRPWNPP) (SEQ ID NO: 77), остатки 130-138 (EVPTAHNPS) (SEQ ID NO: 78) и остатки 106-113 (ISLAPKAQ) (SEQ ID NO: 79), нумерованные согласно SEQ ID NO: 74.

* * *

[00355] Изобретение по объему не ограничивается конкретными воплощениями, описанными в настоящем описании. В действительности различные модификации изобретения, кроме описанных, станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00356] Все ссылки (например, публикации или патенты или заявки на патент), цитированные в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание в качестве ссылок и для всех целей в такой степени, как если бы каждая отдельная ссылка (например, публикация или патент или заявка на патент) была конкретно и отдельно указана как включенная полностью в качестве ссылки для всех целей. Другие воплощения находятся в рамках следующей далее формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Agenus Inc.
Ludwig Institute for Cancer Research Ltd
Memorial Sloan Kettering Cancer Center

<120> АНТИ-PD-1 АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 584180:AGBW-003PC

<150> US 62/212,851

<151> 2015-09-01

<150> US 62/216,043

<151> 2015-09-09

<150> US 62/257,195

<151> 2015-11-18

<160> 79

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w Кабат, CDRH1

<400> 1

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w Кабат, CDRH2

<400> 2

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w Кабат, CDRH3

<400> 3

Asn Val Asp Tyr

1

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> AGEN2033w Кабат, CDRL1

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> AGEN2033w Кабат, CDRL2

<400> 5

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> AGEN2033w Кабат, CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> AGEN2034w Кабат, CDRH3

<400> 7

Asn Gly Asp His

1

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

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w IMGT CDRH1

<400> 8

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w IMGT CDRH2

<400> 9

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w IMGT CDRH3

<400> 10

Ala Ser Asn Val Asp Tyr
1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w IMGT CDRL1

<400> 11

Gln Ser Val Ser Ser Asn
1 5

<210> 12

<211> 3

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w IMGT CDRL2

<400> 12

Gly Ala Ser

1

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

<220>
<223> AGEN2033w IMGT CDRL3

<400> 13

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> AGEN2034w IMGT CDRH3

<400> 14

Ala Ser Asn Gly Asp His
1 5

<210> 15
<211> 113
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> AGEN2033w, AGEN2046w VH

<400> 15

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w VL

<400> 16

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Arg
85 90 95

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

<210> 17

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2034w, AGEN2047w VH

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 18

<211> 440

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w, тяжклая цепь IgG4 S228P

<400> 18

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser

115

120

125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

370

375

380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w легкая цепь

<400> 19

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 20

<211> 440

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2034w тяжкляя цепь IgG4 S228P

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 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 Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130

135

140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

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

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 22

<211> 443

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2047w, тяжклая цепь IgG1

<400> 22

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

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

180

185

190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435

440

<210> 23

<211> 443

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2047w, тяжклая цепь IgG1 N297A

<400> 23

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 24
<211> 443
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2047w, тяжклая цепь IgG1 S267E/L328F

<400> 24

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315

Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 25

<211> 443

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2047w, тяжклая цепь IgG1 S239D/A330L/I332E

<400> 25

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2001w VH (BADD426-2614)

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

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

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

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

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

Ala Thr Asn Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 27

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2002w VH (BADD426-2615)

<400> 27

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 28
<211> 113
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> EP11_p11_B03 (BADD438-2743)

<400> 28

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 29
<211> 113
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> EP11_p11_B05 (BADD438-2745)

<400> 29

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> EP11_p11_C02 (BADD438-2746)

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 31
<211> 113
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> EP11_p11_C03 (BADD438-2747)

<400> 31

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRH2 крнскенсус

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (4)..(4)
<223> Tyr или Phe

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (9)..(9)
<223> Lys или Glu

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (16)..(16)
<223> Lys или Met

<400> 32

Val Ile Trp Xaa Asp Gly Ser Asn Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Xaa
1 5 10 15

Gly

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRH3 консенсус

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (2)..(2)
<223> Gly или Val

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (4)..(4)
<223> His или Tyr

<400> 33

Asn Xaa Asp Xaa
1

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRH2

<400> 34

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH2

<400> 35

Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH2

<400> 36

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met
1 5 10 15

Gly

<210> 37

<211> 4

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH3

<400> 37

Asn Gly Asp Tyr

1

<210> 38

<211> 30

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH FR1

<400> 38

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

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

<210> 39

<211> 30

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH FR1

<400> 39

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

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

<210> 40
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH FR2

<400> 40

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 41
<211> 32
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH FR3

<400> 41

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser
20 25 30

<210> 42
<211> 32
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH FR3

<400> 42

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25 30

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH FR4

<400> 43

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH FR4

<400> 44

Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 45
<211> 23
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL FR1

<400> 45

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL FR2

<400> 46

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 47
<211> 32

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL FR3

<400> 47

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL FR4

<400> 48

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 49
<211> 113
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH консенсусная последовательность

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (11)..(11)
<223> Val или Met

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (53)..(53)
<223> Tyr или Phe

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (58)..(58)
<223> Lys или Glu

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (65)..(65)
<223> Lys или Met

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (98)..(98)
<223> Ser или Thr

<220>

<221> ВАРИАНТ
<222> (100)..(100)
<223> Gly или Val

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (102)..(102)
<223> His или Tyr

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (105)..(105)
<223> Gln или His

<400> 49

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

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

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

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

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

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

Ala Xaa Asn Xaa Asp Xaa Trp Gly Xaa Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 50
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

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

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

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

35

40

45

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

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

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

Ala Arg

<210> 51
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro
85 90 95

<210> 52
<211> 439
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2033w тяжкляя цепь IgG4 S228P без C-концевого лизина)

<400> 52

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435

<210> 53

<211> 439

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2034w тяжкляя цепь IgG4 S228P (без C-концевого лизина)

<400> 53

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435

<210> 54

<211> 442

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2046w, тяжкая цепь IgG1 (без C-концевого лизина)

<400> 54

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 55

<211> 442

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2047w, тяжкая цепь IgG1 (без C-концевого лизина)

<400> 55

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 56

<211> 442

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2047w, тяжкая цепь IgG1 N297A (без С-концевого лизина)

<400> 56

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 57

<211> 442

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> AGEN2047w, тяжкая цепь IgG1 S267E/L328F (without C-terminal lysine)

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130

135

140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 59
<211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

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 Leu Leu 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> 60
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

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 Leu Leu 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 Lys
 325 330

<210> 61
<211> 329
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IgG1 N297A (без С-концевого лизина)

<400> 61

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 Leu Leu 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 Ala 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> 62

<211> 330

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> IgG1 N297A

<400> 62

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 Leu Leu 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 Ala 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 Lys
 325 330

<210> 63
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> IgG4 S228P (без C-концевого лизина)

<400> 63

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> 64
<211> 327
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IgG4 S228P

<400> 64

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 Lys
325

<210> 65
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

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 Leu Leu 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> 67

<211> 220

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> pab2197, легкая цепь

<400> 67

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Met Gly Gln Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

Gly Ile Asn Asn Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130

135

140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 68
<211> 448
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> pab2196, тяжклая цепь

<400> 68

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

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His
20 25 30

Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Ser 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 Leu Leu 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> 69

<211> 219

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> rab2196, легкая цепь

<400> 69

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

Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asn Ser
20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Phe Gly Ile 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 Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

Thr His Gln Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Val 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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 71

<211> 216

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> rab2225, легкая цепь

<400> 71

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 Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly
450

<210> 73

<211> 214

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> rab1928, легкая цепь

<400> 73

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
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 Leu Tyr Thr 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala
165 170 175

Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp
180 185 190

Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
195 200 205

Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu
210 215 220

Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser
225 230 235 240

Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro
245 250 255

Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
260 265

<210> 75
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
1 5 10 15

<210> 76
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro

1

5

10

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
1 5

<210> 79
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающее переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, причем

(a) CDRH1 включает аминокислотную последовательность SYGMH (SEQ ID NO: 1);

(b) CDRH2 включает аминокислотную последовательность VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), в которой

X₁ является Y или F;

X₂ является K или E; и

X₃ является K или M;

(c) CDRH3 включает аминокислотную последовательность NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), в которой

X₁ является G или V; и

X₂ является H или Y;

(d) CDRL1 включает аминокислотную последовательность RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4);

(e) CDRL2 включает аминокислотную последовательность GASTRAT (SEQ ID NO: 5), и

(f) CDRL3 включает аминокислотную последовательность QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

2. Изолированное антитело по п.1, в котором CDRH2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 2 и 34-36.

3. Изолированное антитело по п. 1 или 2, в котором CDRH3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 3, 7 и 37.

4. Изолированное антитело по любому из пп. 1-3, в котором CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, соответственно, представленные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3; 1, 2 и 7; 1, 2 и 37; 1, 34 и 7; 1, 35 и 7 или 1, 36 и 7.

5. Изолированное антитело, которое специфически связывается

с человеческим PD-1, включающее переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, в котором CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно.

6. Изолированное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающее переменный участок тяжелой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменный участок легкой цепи, включающий определяющие комплементарности участки CDRL1, CDRL2 и CDRL3, в котором CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 2, 7, 4, 5 и 6, соответственно.

7. Изолированное антитело по любому из пп. 1-6, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

8. Изолированное антитело по любому из пп. 1-6, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31.

9. Изолированное антитело по п.8, в котором переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31.

10. Изолированное антитело по п.9, в котором переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

11. Изолированное антитело по п.9, в котором переменный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

12. Изолированное антитело по п.10, причем антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

13. Изолированное антитело по п.10, причем антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

14. Изолированное антитело по п.11, причем антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

15. Изолированное антитело по п.11, причем антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

16. Изолированное антитело по п.11, причем антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56.

17. Изолированное антитело по любому из пп. 1-8, причем антитело включает переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGHV3-33.

18. Изолированное антитело по любому из пп. 1-17, причем антитело включает переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.

19. Изолированное антитело по п.18, в котором переменный участок легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

20. Изолированное антитело по п.19, причем антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

21. Изолированное антитело по любому из пп. 1-18, причем антитело включает переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из человеческой зародышевой последовательности IGKV3-15.

22. Изолированное антитело по п.1, в котором переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, соответственно, включают аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15 и 16; 17 и 16; 26 и 16; 27 и 16; 28 и 16; 29 и 16; 30 и 16 или 31 и 16.

23. Изолированное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающее

(a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и

(b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

24. Изолированное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающее

(a) переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и

(b) переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

25. Изолированное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающее переменный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 17 и 26-31.

26. Изолированное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающее переменный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

27. Изолированное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающее

(a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и

(b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

28. Изолированное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающее

(a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и

(b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

29. Изолированное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающее

(a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и

(b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

30. Изолированное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающее

(a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и

(b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

31. Изолированное антитело, которое специфически связывается с человеческим PD-1, включающее

(a) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и

(b) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

32. Изолированное антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание с человеческим PD-1 с антителом по любому из пп. 1-31.

33. Изолированное антитело, которое связывается с тем же эпитопом человеческого PD-1, что и антитело по любому из пп. 1-31.

34. Изолированное антитело по любому из пп. 1-33, причем антитело связывается с эпитопом, состоящим из остатков 107-122 SEQ ID NO: 74.

35. Изолированное антитело по любому из пп. 1-34, причем антитело связывается с эпитопом, состоящим из остатков 5-22 SEQ ID NO: 74.

36. Изолированное антитело по любому из пп. 1-35, причем антитело связывается с эпитопом, состоящим из остатков 6-15 SEQ ID NO: 74.

37. Изолированное антитело по любому из пп. 1-36, причем антитело связывается с эпитопом, состоящим из остатков 130-138 SEQ ID NO: 74.

38. Изолированное антитело по любому из пп. 1-37, причем антитело связывается с эпитопом, состоящим из остатков 106-113 SEQ ID NO: 74.

39. Изолированное антитело по любому из пп. 1-11, 17-26 и

32-38, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, включающей человеческие IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂.

40. Изолированное антитело по любому из пп. 1-11, 17-26 и 32-38, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁.

41. Изолированное антитело по любому из пп. 1-11, 17-26 и 32-38, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, который не имеет гликановой группы в позиции N297 согласно нумерации системы EU.

42. Изолированное антитело по любому из пп. 1-11, 17-26 и 32-38, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающий мутацию N297A согласно нумерации системы EU.

43. Изолированное антитело по любому из пп. 1-11, 17-26 и 32-38, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающий мутацию N297Q согласно нумерации системы EU.

44. Изолированное антитело по любому из пп. 1-11, 17-26 и 32-38, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₁, включающий мутацию D265A согласно нумерации системы EU.

45. Изолированное антитело по любому из пп. 1-11, 17-26 и 32-38, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG₄, включающий мутацию S228P согласно нумерации системы EU.

46. Изолированное антитело по любому из пп. 1-11, 17-26 и 32-38, причем антитело включает константный участок тяжелой цепи человеческого IgG, который является вариантом константного участка тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа, причем вариантный константный участок тяжелой цепи человеческого IgG связывается с человеческим Fc-рецептором с меньшей аффинностью, чем константный участок тяжелой цепи человеческого IgG дикого типа связывается с человеческим Fc-рецептором.

47. Изолированное антитело по п.46, причем человеческим Fc-

рецептором является FcγR.

48. Изолированное антитело по п.47, причем FcγR представляет собой FcγRIIB.

49. Изолированное антитело по п.47, причем FcγR экспрессируется на клетке, выбранной из группы, включающей дендритные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, гранулоциты, В-клетки и природные киллерные клетки.

50. Изолированное антитело по любому из пп. 46-49, причем вариантный константный участок тяжелой цепи человеческого IgG является константным участком тяжелой цепи варианта человеческого IgG₁, варианта человеческого IgG₂ или варианта человеческого IgG₄.

51. Изолированное антитело по любому из пп. 1-19, 21-26 и 32-50, причем антитело включает константный участок легкой цепи, выбранный из группы, включающей человеческие IgGκ и IgGλ.

52. Изолированное антитело по любому из пп. 1-51, причем антитело является человеческим антителом.

53. Изолированное антитело по любому из пп. 1-52, причем антитело является антагонистическим для человеческого PD-1.

54. Изолированное антитело по п.53, причем антитело дезактивирует, снижает или ингибирует активность человеческого PD-1.

55. Изолированное антитело по п.53, причем антитело ингибирует связывание человеческого PD-1 с человеческим PD-L1 или человеческим PD-L2.

56. Изолированное антитело по п.53, причем антитело повышает продуцирование IL-2 мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), стимулированными стафилококковым энтеротоксином А (SEA).

57. Изолированное антитело по п.53, причем антитело повышает продуцирование IFNγ совместной культурой человеческих Т-клеток и аллогенных дендритных клеток.

58. Изолированное антитело по п.53, причем антитело повышает пролиферацию стимулированных анти-CD-3-антителом CD4+ или CD8+ Т-клеток, культивируемых совместно с асцитической

жидкостью при раке яичников.

59. Изолированное антитело по п.53, причем антитело усиливает передачу сигнала NFAT-люциферазы репортерными клетками, культивированными совместно с экспрессирующими PD-L1 клетками-мишенями.

60. Изолированное антитело по любому из пп. 1-59, конъюгированное с цитотоксическим агентом, цитостатическим агентом, токсином, радионуклеидом или детектируемой меткой.

61. Фармацевтическая композиция, включающая антитело по любому из пп. 1-60 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

62. Изолированный полинуклеотид, кодирующий тяжелую и/или легкую цепь антитела по любому из пп. 1-60.

63. Вектор, включающий полинуклеотид по п.62.

64. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая полинуклеотид по п.62 или вектор по п.63.

65. Способ получения антитела, которое связывается с человеческим PD-1, включающий культивирование клетки-хозяина по п.64 таким образом, что экспрессируется полинуклеотид и продуцируется антитело.

66. Способ повышения активации Т-клеток в ответ на антиген у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-61.

67. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-61.

68. Способ по п.67, причем рак выбирают из группы, включающей меланому, рак головы и шеи, рак легких, рак молочной железы, рак предстательной железы, мультиформную глиобластому, колоректальный рак, саркому, рак мочевого пузыря, HPV-ассоциированные раковые заболевания, раковые заболевания влагалища, раковые заболевания вульвы, раковые заболевания пениса, раковые заболевания ануса, раковые заболевания прямой кишки, раковые заболевания ротоглотки, множественную миелому, почечно-клеточный рак, рак яичников, гепатоцеллюлярный рак, эндометриальный рак, панкреатический рак, лимфому и лейкоз.

69. Способ по любому из пп.66-68, причем антитело или фармацевтическую композицию вводят подкожно или внутривенно.

70. Способ по любому из пп.66-68, причем антитело или фармацевтическую композицию вводят интратуморально.

71. Способ по любому из пп.66-68, также включающий введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

72. Способ по п.71, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое, радиотерапевтическое или средство, направленно воздействующее на контрольную точку.

73. Способ по п.72, причем средство, направленно воздействующее на контрольную точку, выбирают из группы, включающей антагонистическое анти-PD-1 антитело, антагонистическое анти-PD-L1 антитело, антагонистическое анти-PD-L2 антитело, антагонистическое анти-CTLA-4 антитело, антагонистическое анти-TIM-3 антитело, антагонистическое анти-CEACAM1 антитело, антагонистическое анти-TIGIT антитело, агонистическое анти-CD137 антитело, агонистическое анти-ICOS антитело, агонистическое анти-GITR антитело и агонистическое анти-OX40 антитело.

74. Способ по п.71, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO).

75. Способ по п.74, причем ингибитор выбирают из группы, включающей эпикадостат, F001287, индоксимод и NLG919.

76. Способ по п.71, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой вакцину.

77. Способ по п.76, причем вакцина включает комплекс белка теплового шока и пептида (HSPPC), включающий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом.

78. Способ по п.77, причем белок теплового шока представляет собой hsc70 и находится в комплексе с опухольассоциированным антигенным пептидом.

79. Способ по п.77, причем белок теплового шока представляет собой hp96 и находится в комплексе с опухольассоциированным антигенным пептидом, причем HSPPC получен

из опухоли, полученной от субъекта.

80. Способ по п.71, причем дополнительное терапевтическое средство включает TCR.

81. Способ по п.80, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой растворимый TCR.

82. Способ по п.80, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой клетку, экспрессирующую TCR.

83. Способ по п.71, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор.

84. Способ по п.71, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело, которое специфически связывается с комплексом пептид-МНС.

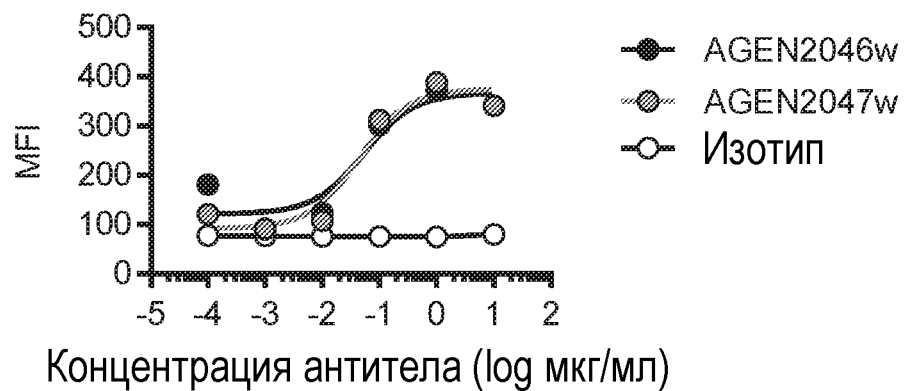
85. Изолированное антитело по любому из пп. 1-60 для применения при лечении рака или инфекционного заболевания.

86. Применение изолированного антитела по любому из пп. 1-60 для получения фармацевтической композиции или лекарственного средства для лечения рака или инфекционного заболевания.

По доверенности

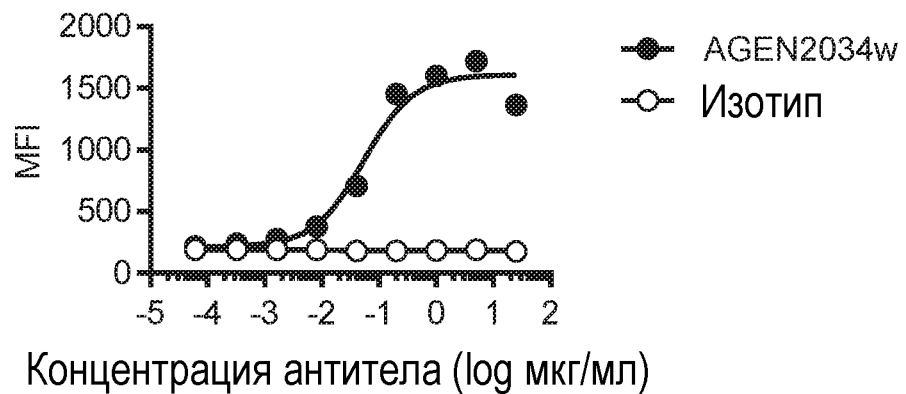
ФИГ. 1А

Стимулированные SEA человеческие Т-клетки



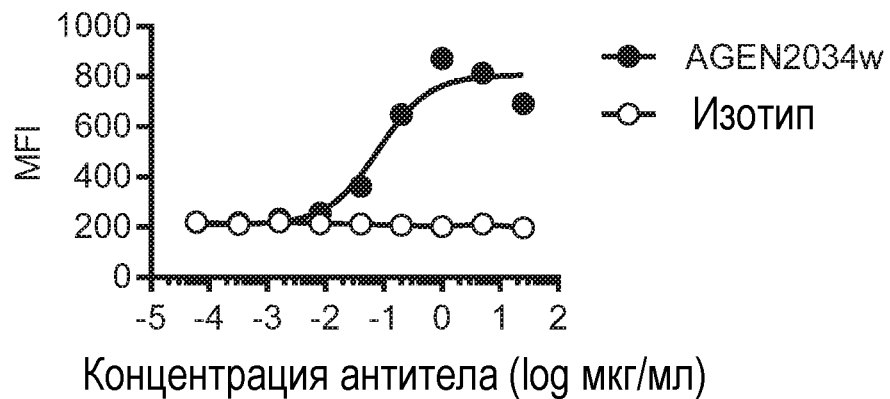
ФИГ. 1В

Стимулированные SEA человеческие Т-клетки



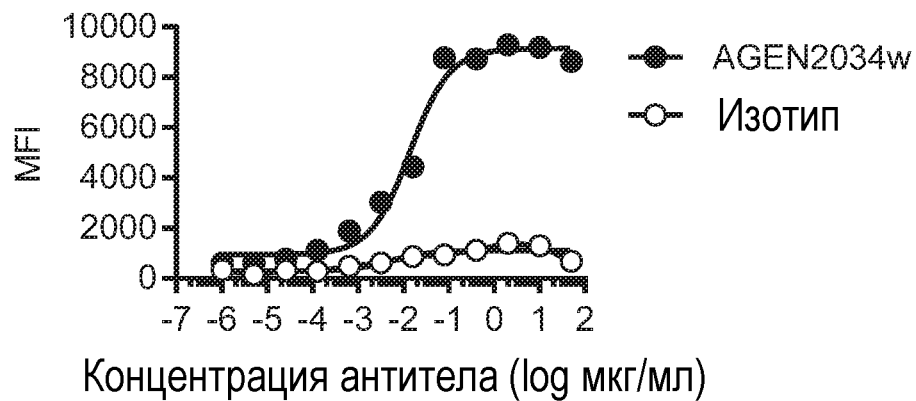
ФИГ. 1С

Стимулированные SEB Т-клетки
яванского макака

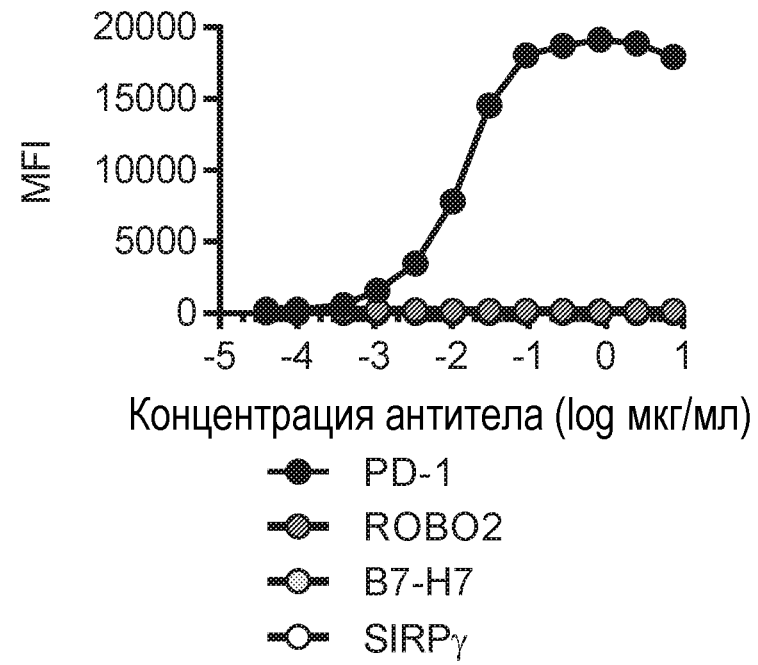


ФИГ. 1D

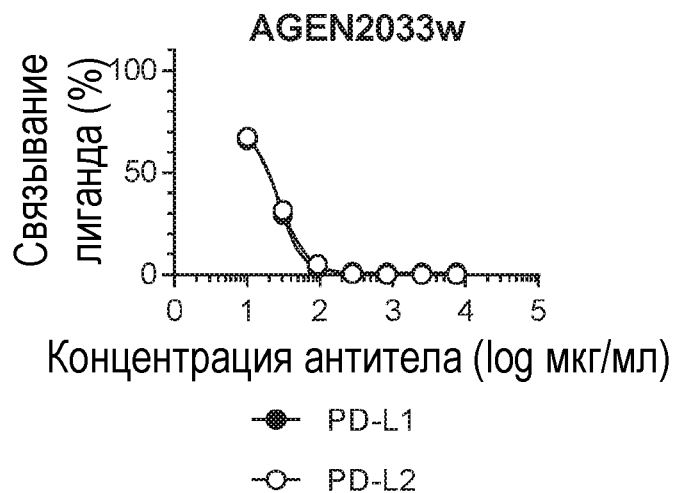
Стимулированные SEA человеческие
Т-клетки



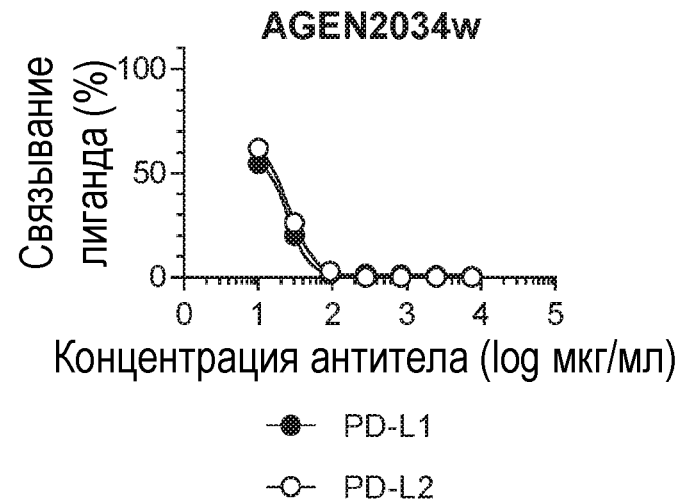
ФИГ. 2



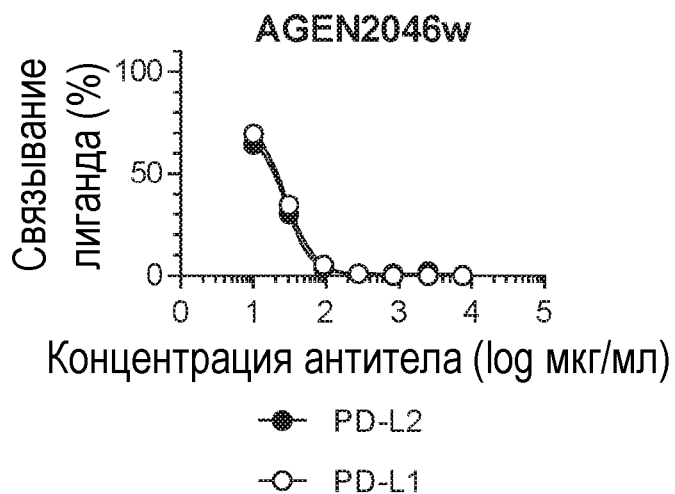
ФИГ. 3А



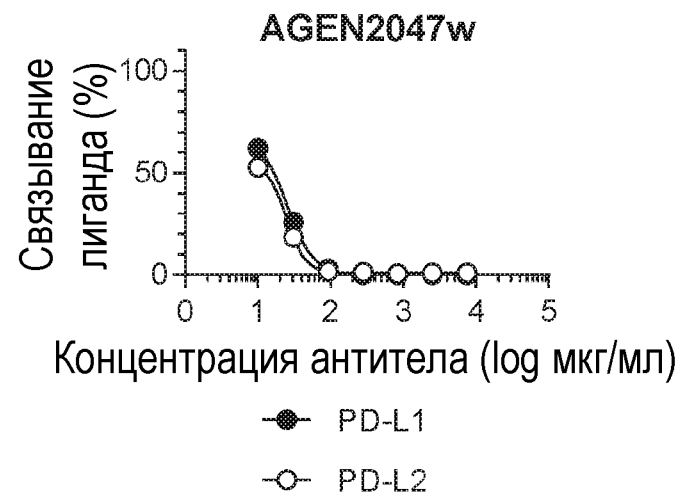
ФИГ. 3В



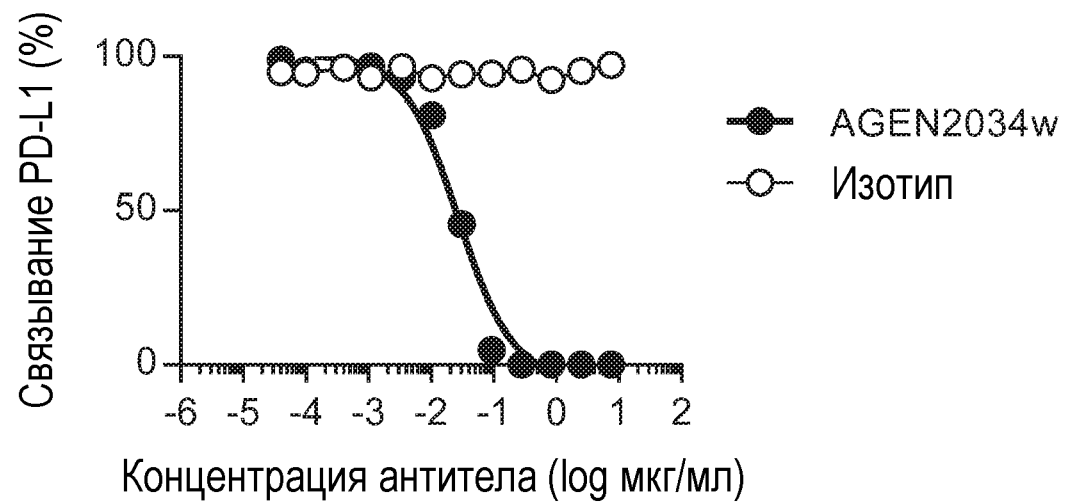
ФИГ. 3С



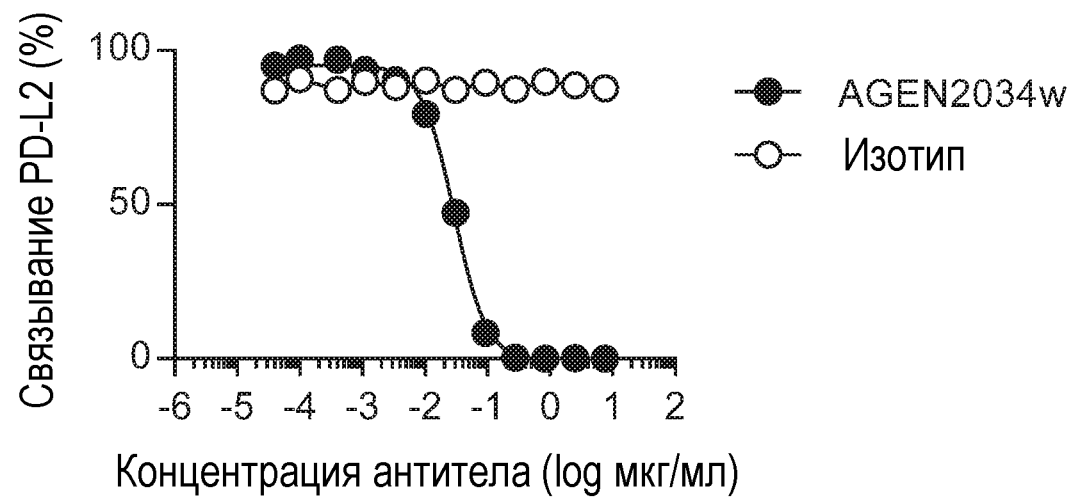
ФИГ. 3D



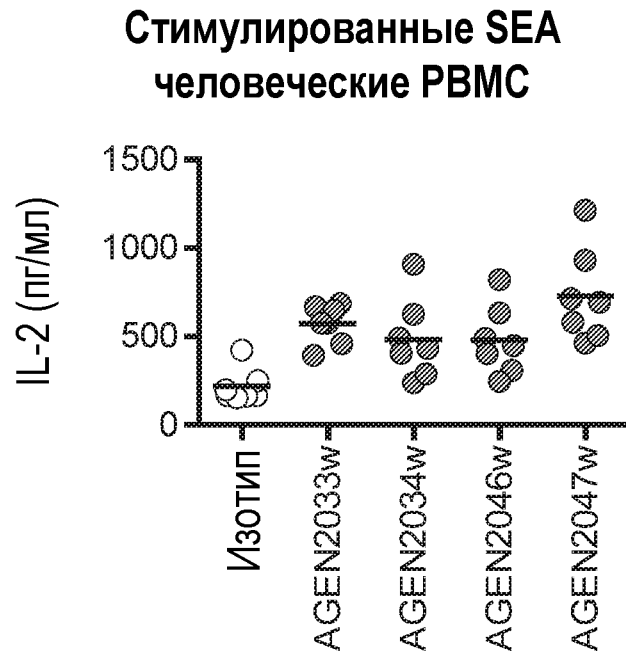
ФИГ. 3Е



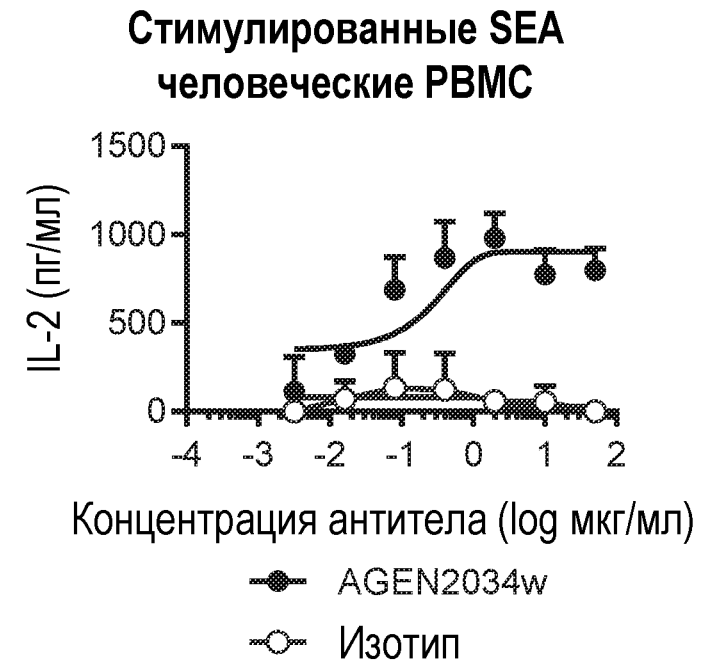
ФИГ. 3F



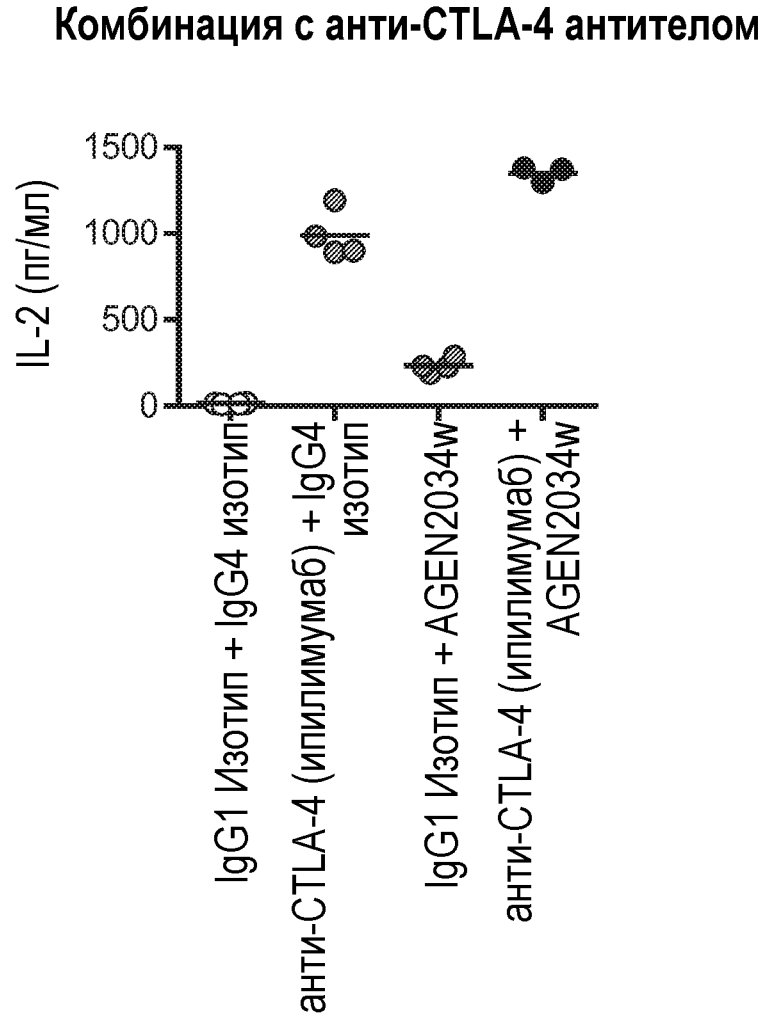
ФИГ. 4А



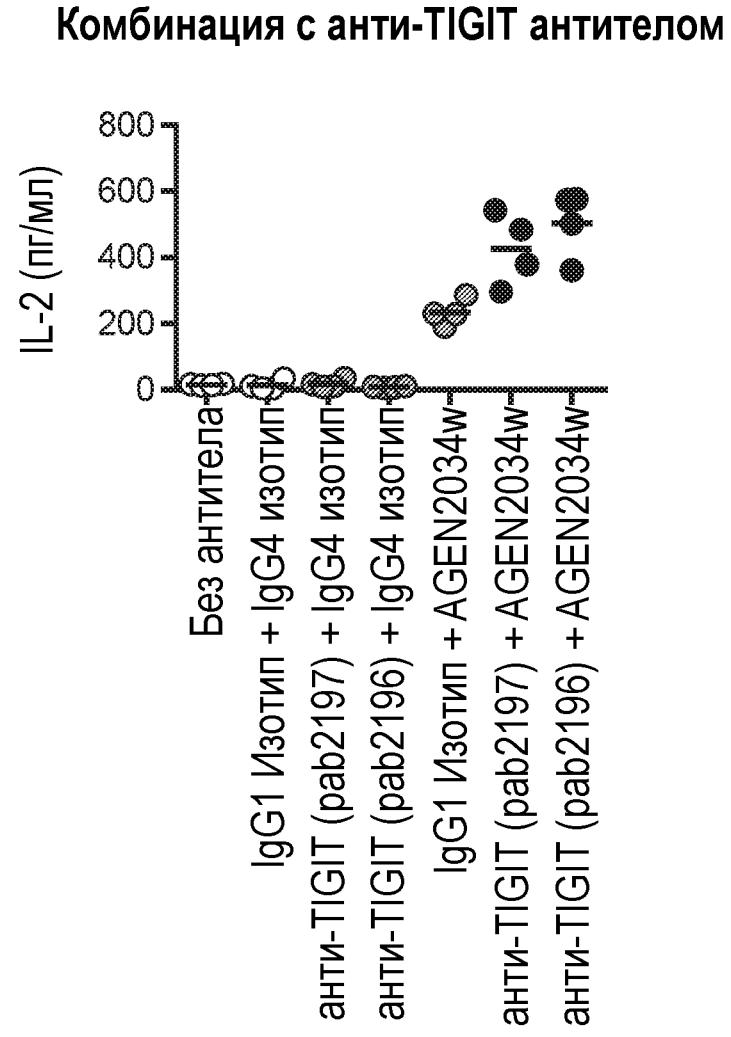
ФИГ. 4В



ФИГ. 4С

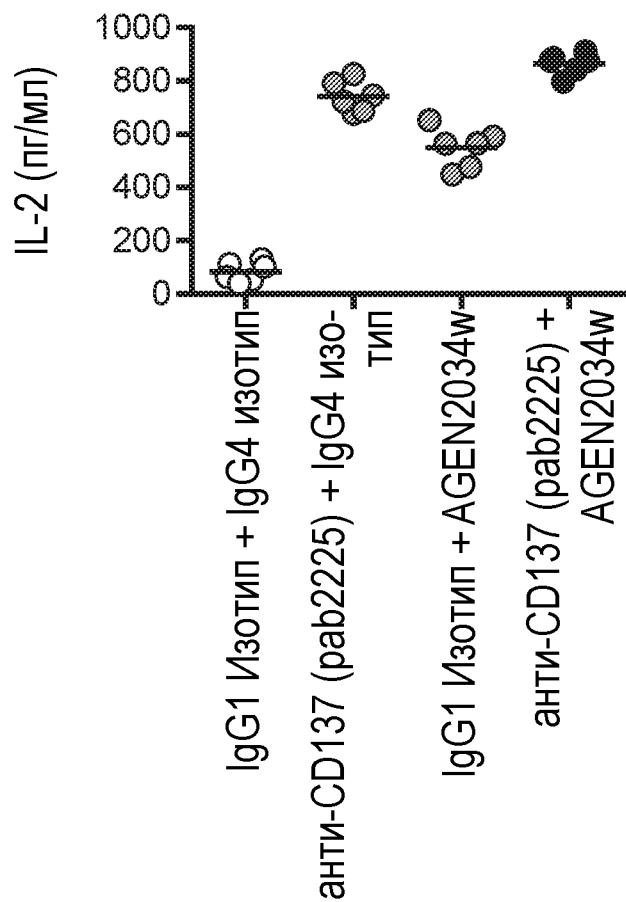


ФИГ. 4D



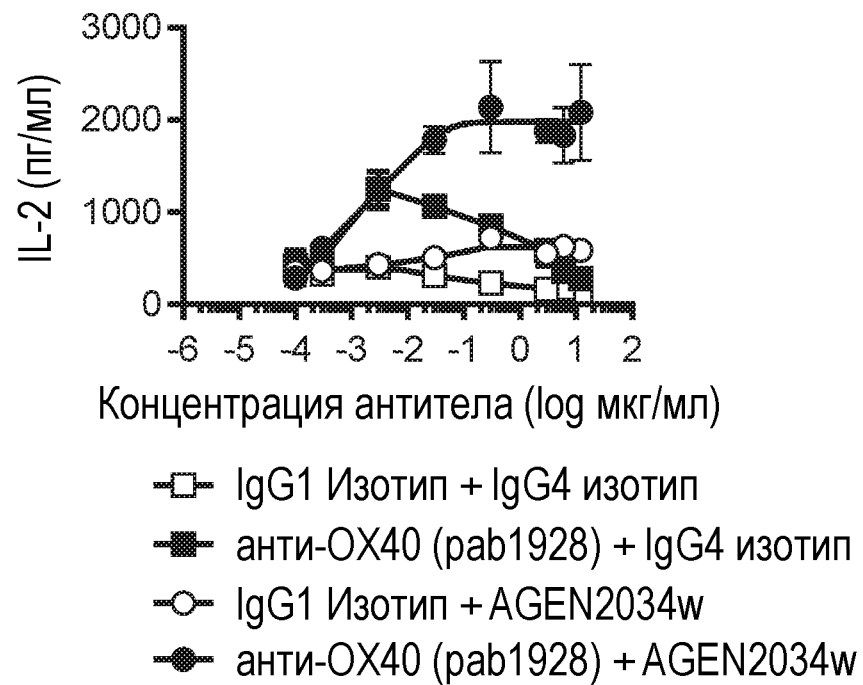
ФИГ. 4Е

Комбинация с анти-CD137 антителом



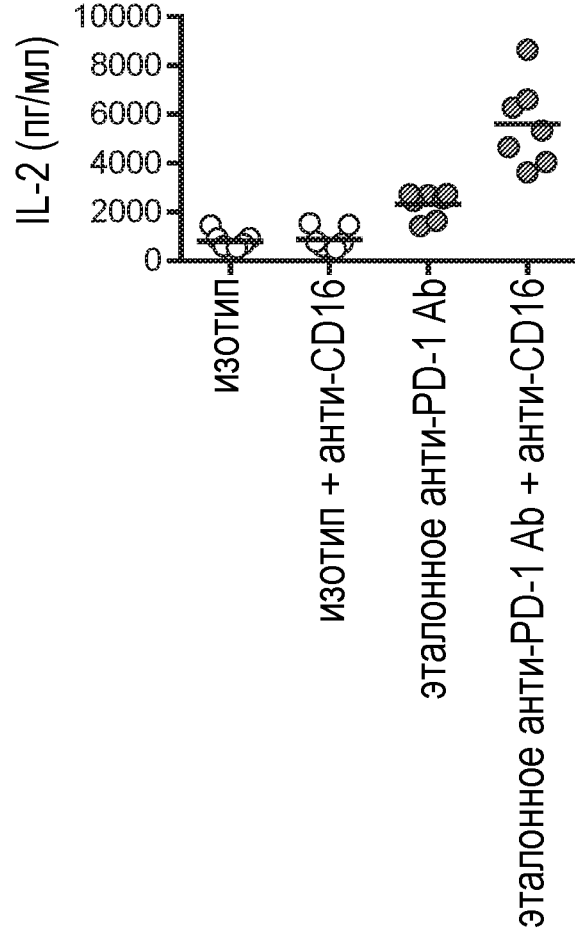
ФИГ. 4F

Комбинация с анти-OX40 антителом



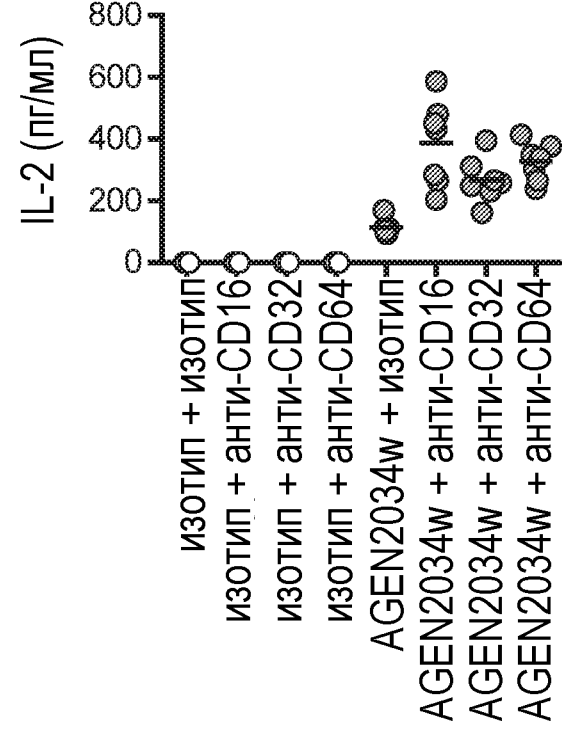
ФИГ. 5А

Стимулированные SEA человеческие PBMC



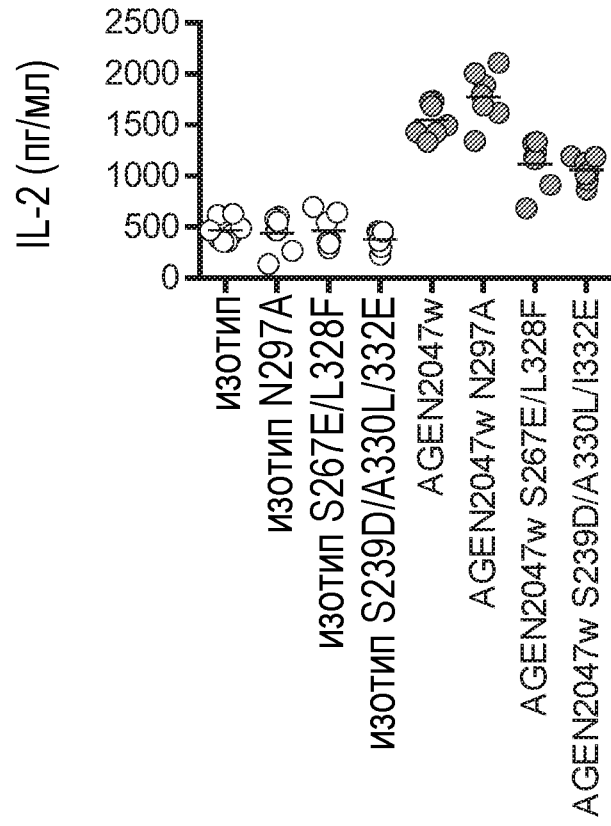
ФИГ. 5В

Стимулированные SEA человеческие PBMC

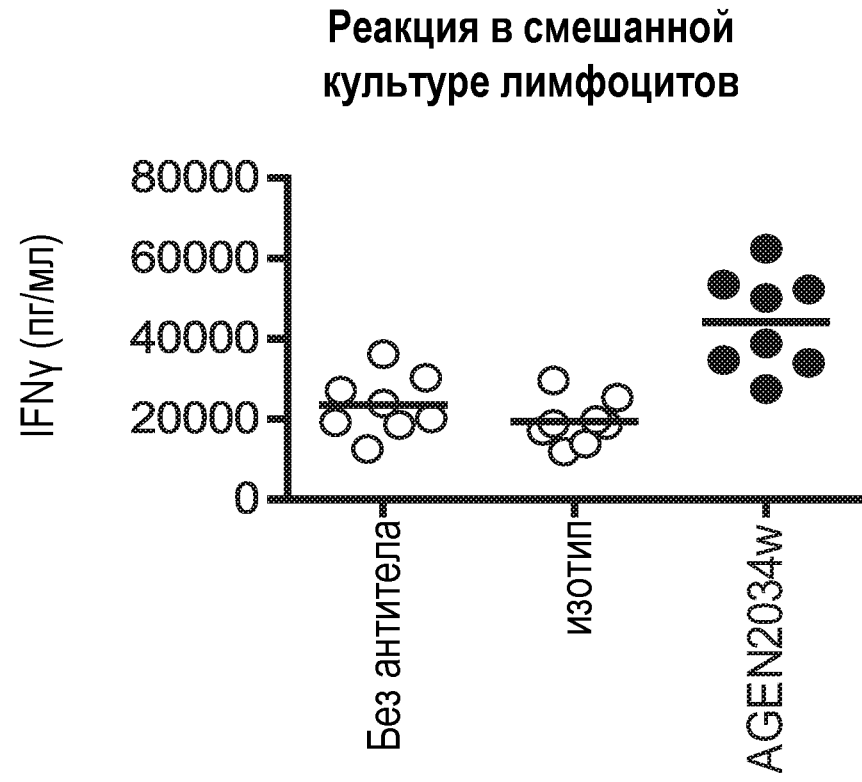


ФИГ. 5С

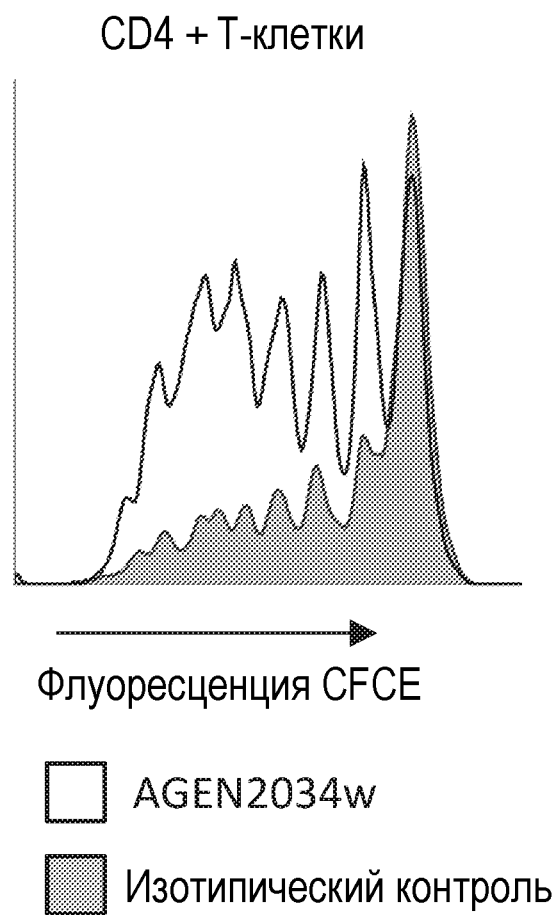
Стимулированные SEA человеческие PBMC



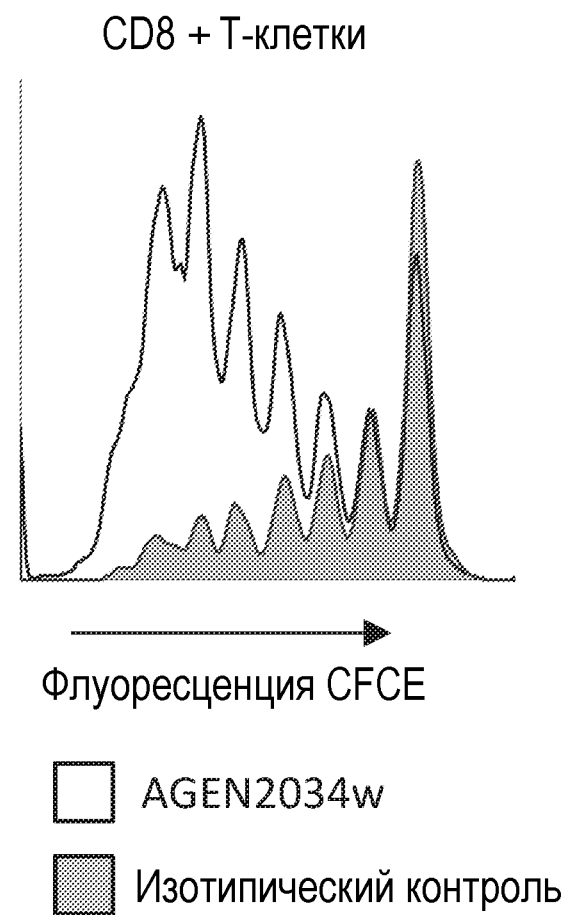
ФИГ. 6



ФИГ. 7А

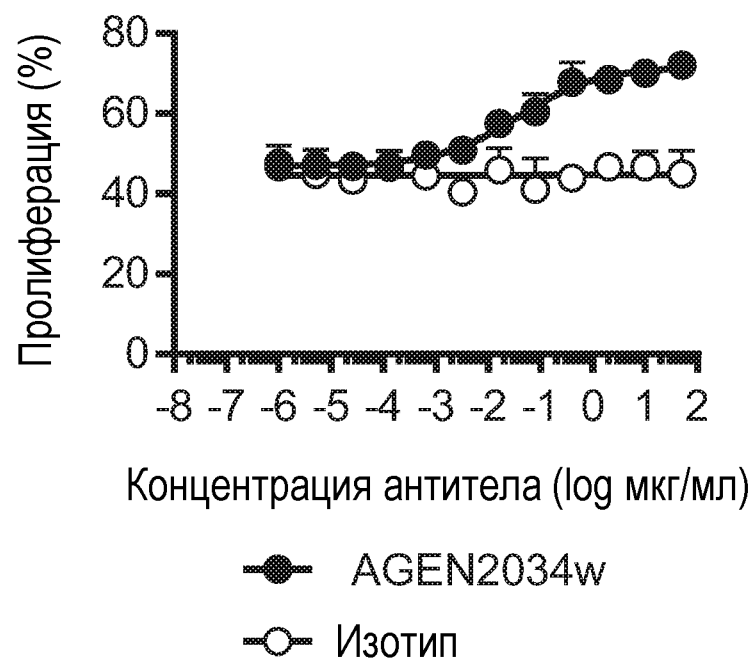


ФИГ. 7В



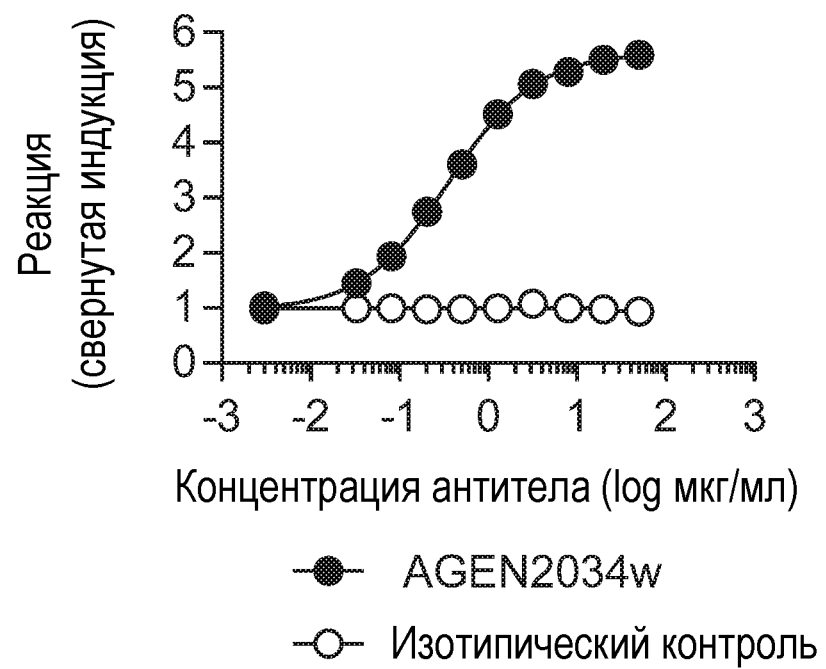
ФИГ. 7С

Анализ на супрессию асцитической жидкости

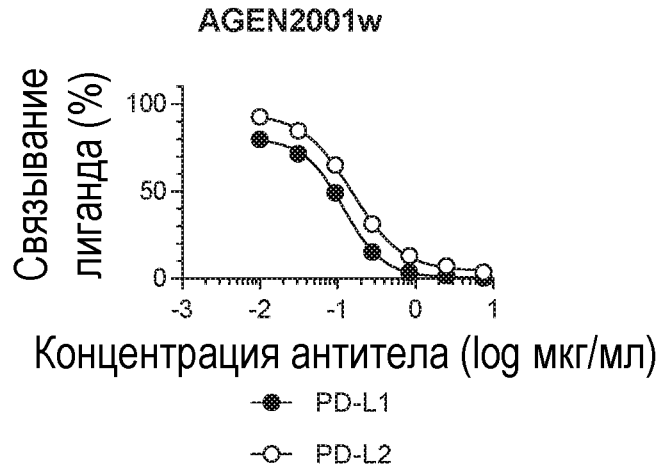


ФИГ. 8

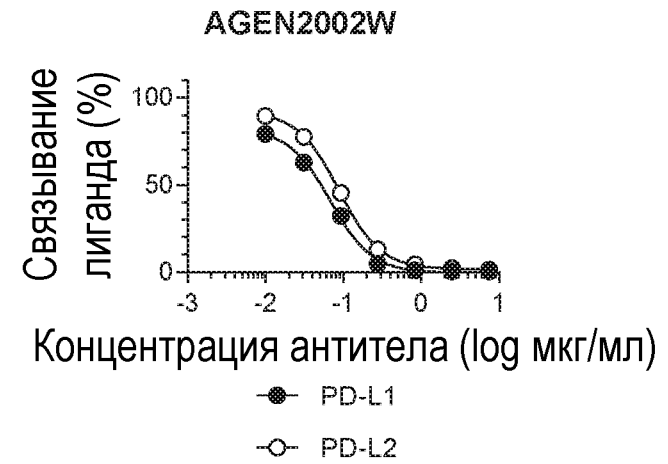
Репортерный анализ Юрката-NFAT-люциферазы



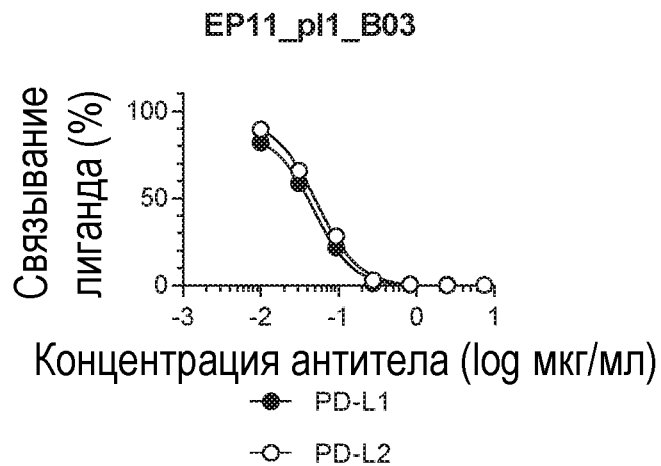
ФИГ. 9А



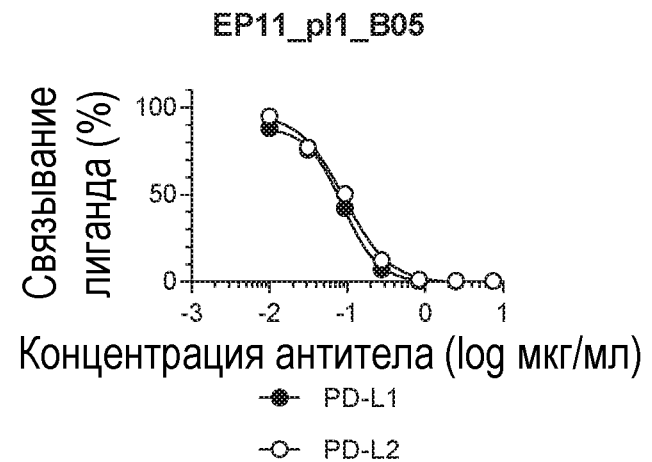
ФИГ. 9В



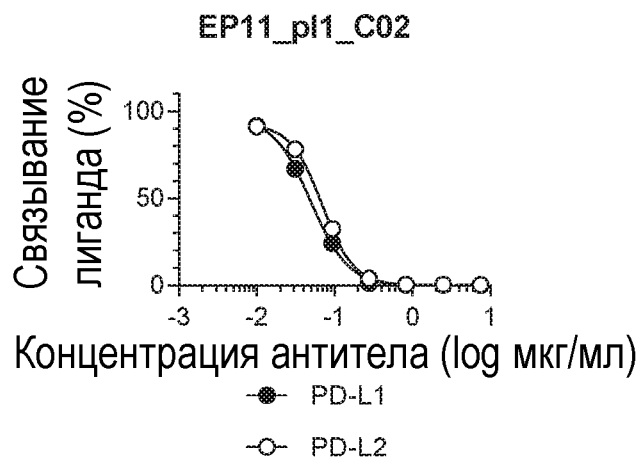
ФИГ. 9С



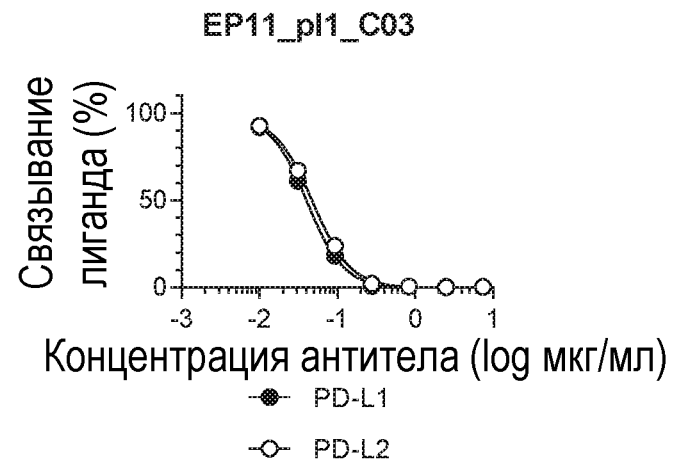
ФИГ. 9D



ФИГ. 9Е



ФИГ. 9F



ФИГ. 10

