

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043064**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.04.21**

(21) Номер заявки  
**201992885**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.06.04**

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

---

(54) **АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С PD-1, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **62/515,188; 62/648,114; 62/673,185**

(32) **2017.06.05; 2018.03.26; 2018.05.18**

(33) **US**

(43) **2020.05.15**

(86) **PCT/US2018/035843**

(87) **WO 2018/226580 2018.12.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Чэнь Цян, Коул Сьюзанн, Даффи Карен, Гарднер Дебра, Го Янься, Хэмел Деймон, Хитчкок Шэннон, Лакомб Энн, Ло Цзиньцюань, Малавия Рави, Орловски Евгения, Соруш Педжман, Свиецки Мелисса, Уилкинсон Дипти (US)**

(74) Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В., Соколов Р.А. (RU)**

(56) **WO-A1-2015058573**  
**WO-A2-2015148984**  
**US-A1-20170015742**  
**US-A1-20170029530**

---

(57) Антитела, которые специфически связываются с PD-1, или их антигенсвязывающие фрагменты, полинуклеотиды, кодирующие антитела или фрагменты, а также способы получения и применения вышеуказанного можно использовать для лечения воспалительных или иммунных расстройств.

---

**B1**

**043064**

**043064**

**B1**

### Перечень последовательностей

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 30 мая 2018 г., называется JBI5131WOPCT\_ST25.txt и имеет размер 220 кБ.

### Область применения изобретения

Изобретение относится к антителам, специфически связывающимся с PD-1, полинуклеотидам, кодирующим антитела или антигенсвязывающие фрагменты, а также способам получения и применения вышеуказанного.

### Предпосылки создания изобретения

PD-1 (белок-1 запрограммированной гибели клеток; PDCD1) представляет собой ингибирующий рецептор, который принадлежит к семейству CD28/CTLA-4. PD-1 представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I, который содержит один внеклеточный домен и один цитоплазматический домен, содержащий иммунорецепторный ингибирующий тирозиновый мотив (ITIM) и иммунорецепторный перекрывающий тирозиновый мотив (ITSM). PD-1 экспрессируется на активированных Т-клетках, В-клетках, NK-клетках и тимоцитах и на покоящихся Т-клетках памяти, включая фолликулярные хелперные Т-клетки (T<sub>FH</sub>) и периферические хелперные Т-клетки (T<sub>PH</sub>). PD-1 после взаимодействия со своими лигандами PD-L1 или PD-L2 подавляет функции Т-клеток за счет множества механизмов (Pauken & Wherry (2015) Trends in Immunology 36(4): 265-276). Взаимодействие с PD-1 непосредственно ингибирует сигнализацию рецептора Т-клеток (TCR) посредством совмещения с TCR и последующей индукции дефосфорилирования проксимальных сигнальных молекул TCR, ингибирования пути Ras/MEK/ERK, ведущего к ингибированию продвижения клеточного цикла и пролиферации Т-клеток, ингибированию роста и выживания клеток и перепрограммированию метаболизма Т-клеток за счет подавления пути PI3K/AKT, ведущего к усилению фактора транскрипции BATF и модуляции развития, поддержания и функции регуляторных Т-клеток. Также было выдвинуто предположение, что PD-1 повышает подвижность Т-клеток и ограничивает длительность взаимодействия между Т-клетками и клетками-мишенями, снижая таким образом степень активации Т-клеток (Honda et al. (2014) Immunity 40 (2): 235-47).

Исследования на мышах с дефицитом PD-1 показали, что этот путь важен как для центральной, так и для периферической толерантности. У мышей с дефицитом PD-1, созданных на основе линии C57Bl/6, могут развиваться спонтанные симптомы аутоиммунных заболеваний, включая продукцию аутоантител, гломерулонефрит и артрит (Nishimura et al., Immunity 1999). Эти данные указывают на то, что PD-1 обеспечивает отрицательную регуляцию иммунных ответов.

Моноклональные антитела к PD-1 и PD-L1 одобрены для лечения рака, такого как запущенная меланома, запущенный немелкоклеточный рак легкого и классическая ходжкинская лимфома. Было обнаружено, что экспрессия PD-1 повышается во многих различных типах опухолей, и он способен ингибировать инфильтрирующие опухоль Т-клетки PD-1<sup>+</sup>. Антагонистические моноклональные антитела к PD-1 или PD-L1 устраняют такое подавление, что позволяет активировать Т-клетки и атаковать опухоль. Таким образом, блокада иммунной контрольной точки предоставляет способ усиления противоопухолевых иммунных ответов.

Несмотря на наличие биологических противовоспалительных терапевтических средств сохраняется потребность в улучшенных противовоспалительных препаратах, которые могут эффективно подавлять воспаление при лечении различных иммунных расстройств, например ревматоидного артрита, при котором значительная часть пациентов все еще не имеют адекватного ответа на терапию.

### Изложение сущности изобретения

В изобретении предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 2, 165, 4, 166, 6 и 7 соответственно.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 и 7 соответственно; переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 8, 9 или 10 и VL с SEQ ID NO: 14, 15 или 16; и/или тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 20, 21 или 22 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 26, 27 или 28.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 145, 4, 5, 6 и 7 соответственно; VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 16; и/или HC с SEQ ID NO: 150 и LC с SEQ ID NO: 28.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 146, 4, 5, 6 и 7 соответственно; VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 16; и/или HC с SEQ ID NO: 151 и LC с SEQ ID NO: 28.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1,



LCDR3 с SEQ ID NO: 32, 38, 40, 41, 42 и 43 соответственно; VH с SEQ ID NO: 50 и VL с SEQ ID NO: 61; и/или HC с SEQ ID NO: 72 и LC с SEQ ID NO: 83.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 32, 39, 40, 41, 42 и 43 соответственно; VH с SEQ ID NO: 51 и VL с SEQ ID NO: 61; и/или HC с SEQ ID NO: 73 и LC с SEQ ID NO: 83.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 88, 89, 90, 91, 92 и 93 соответственно.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с PD-1 с антителом по изобретению.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом PD-1, что и антитело по изобретению.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем VH антитела и VL антитела или HC антитела и LC антитела кодируются определенными полинуклеотидами, указанными в настоящем документе.

В изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий антитело по изобретению.

В изобретении также предложен вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид по изобретению.

В изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор по изобретению.

В изобретении также предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях, в которых экспрессируется антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

В изобретении также предложен способ подавления у пациента активации Т-клетки, экспрессирующей PD-1, включающий введение пациенту выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению в течение времени, достаточного для подавления активации Т-клетки, экспрессирующей PD-1.

В изобретении также предложен способ снижения иммунного ответа, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению в течение времени, достаточного для снижения иммунного ответа.

В изобретении также предложен способ лечения иммунного расстройства, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению в течение времени, достаточного для лечения иммунного расстройства.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, которое специфически связывается с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению.

В изобретении также предложен иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, конъюгированные с гетерологичной молекулой.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1А показано, что выбранные полученные антитела ингибировали активацию Т-клеток в анализе вторичного ответа на цитомегаловирус (CMV) с уровнем ингибирования более 50% или выше. CNTO3930: изотипический контроль. PD1B199: антагонистическое моноклональное антитело (mAb) к PD-1.

На фиг. 1В показано, что выбранные полученные антитела ингибировали активацию Т-клеток в анализе на вторичный ответ на CMV с уровнем ингибирования более 50% или выше. CNTO3930: изотипический контроль. PD1B199: Антагонистическое mAb к PD-1.

На фиг. 2А для линии mAb PD1B505 показано выравнивание VH-областей PD1H93 (SEQ ID NO: 8), PD1H384 (SEQ ID NO: 9), PD1H405 (SEQ ID NO: 10), PD1H585 (SEQ ID NO: 140), PD1H586 (SEQ ID NO: 141) и PD1H587 (SEQ ID NO: 142). Определяющие комплементарность области (CDR) подчеркнуты. SEQ ID NO: VH-цепей показаны после названия цепи на фигуре (например, PD1H93\_8;\_8 указывает SEQ ID NO: 8).

На фиг. 2В для линии mAb PD1B505 показано выравнивание VL-областей PD1L30 (SEQ ID NO: 14),

PD1L468 (SEQ ID NO: 15), PD1L469 (SEQ ID NO: 16), PD1L651 (SEQ ID NO: 143) и PD1L652 (SEQ ID NO: 144). CDR подчеркнуты. SEQ ID NO: VL-цепей показаны после названия цепи на фигуре (например, PD1L3014; 14 указывает SEQ ID NO: 14).

На фиг. 3А для линии mAb PD1B506 показано выравнивание VH-областей PD1H90 (SEQ ID NO: 44), PD1H388 (SEQ ID NO: 45), PD1H399 (SEQ ID NO: 46), PD1H400 (SEQ ID NO: 47), PD1H401 (SEQ ID NO: 48), PD1H402 (SEQ ID NO: 49), PD1H403 (SEQ ID NO: 50) и PD1H404 (SEQ ID NO: 51). CDR подчеркнуты.

На фиг. 3В для линии mAb PD1B506 показано выравнивание VL-областей PD1L28 (SEQ ID NO: 60), PD1L470 (SEQ ID NO: 61) и PD1L471 (SEQ ID NO: 62). CDR подчеркнуты.

На фиг. 4А для линии mAb PD1B512 показано выравнивание VH-областей PD1H81 (SEQ ID NO: 94) и PD1H389 (SEQ ID NO: 95). CDR подчеркнуты.

На фиг. 4В для линии mAb PD1B512 показано выравнивание VL-областей PD1L43 (SEQ ID NO: 98), PD1L472 (SEQ ID NO: 99) и PD1L473 (SEQ ID NO: 100). CDR подчеркнуты.

На фиг. 5А показано, что PD1B505 и PD1B506 ингибировали активацию антиген-специфических Т-клеток. На фигуре показан средний % ингибирования и станд. откл. пролиферации Т-клеток в анализе вторичного ответа на CMV. IgG<sub>1</sub>: изотипический контроль.

На фиг. 5В показано, что PD1B743, PD1B750 и PD1B756 ингибировали активацию антиген-специфических Т-клеток. На фигуре показан средний % ингибирования и станд. откл. пролиферации Т-клеток в анализе вторичного ответа на CMV. IgG<sub>1</sub>: изотипический контроль.

На фиг. 5С показано, что PD1B878 и PD1B849 ингибировали активацию антиген-специфических Т-клеток при анализе специфического вторичного ответа на CMV. На фигуре показан средний % ингибирования и станд. откл. пролиферации Т-клеток в анализе вторичного ответа на CMV. IgG<sub>1</sub>: изотипический контроль.

На фиг. 6А показано, что PD1B743 и PD1B756 не блокировали связывание PD-L1 с PD-1, тогда как PD1B750 блокировало взаимодействие в анализе степени кластеризации клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, в присутствии или в отсутствие указанных антител с использованием процента (%) двойных положительных событий как показателя кластеризации. mAb положительного контроля блокировало взаимодействие PD-L1/PD-1.

На фиг. 6В показано, что PD1B743 и PD1B756 не блокировали связывание PD-L2 с PD-1, тогда как PD1B750 блокировало взаимодействие в анализе степени кластеризации клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L2, в присутствии или в отсутствие указанных антител с использованием процента (%) двойных положительных событий как показателя кластеризации. mAb положительного контроля блокировало взаимодействие PD-L2/PD-1.

На фиг. 7 представлена схема пяти разных эпитопных групп созданных антител к PD-1. mAb из группы 5 блокировали взаимодействие PD-L1/PD-1, тогда как mAb из групп 1-4 не блокировали его.

На фиг. 8А показано, что экспрессия PD-1 была выше на Т-клетках памяти CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>, стимулированных CMV, чем на Т-клетках, стимулированных ТТ (вставка, среднегеометрическая интенсивность флуоресценции). Антитело к PD-1: сплошные линии; изотипический контроль: пунктирные линии.

На фиг. 8В показано, что PD1B878 и PD1B849 ингибировали активацию CMV-специфических Т-клеток при анализе специфического вторичного ответа на CMV. На фигуре показан средний процент (%) ингибирования и станд. откл. пролиферации Т-клеток в этом анализе.

На фиг. 9А показано, что PD1B849 и PD1B878 вызывали антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) у активированных Т-клеток памяти в присутствии NK-клеток в качестве эффекторных клеток. Низкофукозные (LF) варианты антител (PD1B849-LF и PD1B878-LF) демонстрировали улучшенную активность ADCC.

На фиг. 9В показано, что PD1B849 и PD1B878 вызывали ADCC у активированных Т-клеток памяти в присутствии мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) в качестве эффекторных клеток. Низкофукозные (LF) варианты антител (PD1B849-LF и PD1B878-LF) демонстрировали улучшенную активность ADCC.

На фиг. 10А показано отсутствие опосредованной PD1B849 и PD1B878 ADCC в покоящихся Т-клетках памяти, экспрессирующих низкие уровни PD-1, в присутствии NK-клеток в качестве эффекторных клеток. Низкофукозные (LF) варианты антител (PD1B849-LF и PD1B878-LF) способствовали некоторой ADCC.

На фиг. 10В показано отсутствие опосредованной PD1B849 и PD1B878 ADCC в покоящихся Т-клетках памяти, экспрессирующих низкие уровни PD-1, в присутствии PBMC в качестве эффекторных клеток. Низкофукозные (LF) варианты антител (PD1B849-LF и PD1B878-LF) способствовали некоторой ADCC.

На фиг. 11 показано, что PD1B849 и PD1B878 не способствовали измеримой комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) у активированных Т-клеток при использовании кроличьего комплемента. ОКТЗ: мышинное антитело к CD3 антигену человека (положительный контроль); huIgG1: изотипический контроль, muIgG2a: изотипический контроль.

На фиг. 12 показано, что PD1B878, PD1B1090 и PD1B1094 не блокировали связывание PD-L1 с PD-1 на клетках.

На фиг. 13А показано, что PD1B505-mIgG2a и PD1B506-mIgG2a предотвращали развитие заболевания в мышинной модели реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD). Антитела вводили в дозе 10 мг/кг в/б на 0, 4, 7, 11, 14 и 18 сутки и регистрировали показатели клинической оценки с течением времени.

На фиг. 13В показано, что mAb PD1B505-mIgG2a и PD1B506-mIgG2a (mIgG2a) предотвращали снижение веса в мышинной модели GvHD. Антитела вводили в дозе 10 мг/кг в/б на 0, 4, 7, 11, 14 и 18 сутки.

На фиг. 14А показано, что PD1B849-mIgG2a и PD1B878-mIgG2a предотвращали развитие заболевания в мышинной модели реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD). Антитела вводили в дозе 10 мг/кг в/б на 0, 4, 7, 11, 14 и 18 сутки и регистрировали показатели клинической оценки с течением времени.

На фиг. 14В показано, что PD1B849-mIgG2a и PD1B878-mIgG2a предотвращали снижение веса в мышинной модели GvHD. Антитела вводили в дозе 10 мг/кг в/б на 0, 4, 7, 11, 14 и 18 сутки.

На фиг. 15 показано, что PD1B849-mIgG2a и PD1B878-mIgG2a увеличивали частоту появления регуляторных Т-клеток (Treg) в селезенках в мышинной модели GvHD.

На фиг. 16 показано, что выбранные антитела к PD-1 истощают популяции клеток  $T_{FH}/T_{RH}$ . LF: с низким содержанием фукозы.

### Подробное описание изобретения

Все публикации, включая, без ограничений, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе.

Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины предназначены только для цели описания вариантов осуществления и не имеют ограничительного характера. Все применяемые в настоящем документе технические и научные термины, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное обычному специалисту в области, к которой относится изобретение.

В настоящем документе описаны иллюстративные способы и материалы, хотя при практическом осуществлении для проверки настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут применяться следующие термины.

Используемые в настоящем описании и в формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественные объекты, если иное не следует явно из контекста.

Если из контекста явно не следует иное, в данном описании и формуле изобретения слова "содержать", "содержащий" и т.п. следует толковать в охватывающем смысле, в отличие от исключающего или исчерпывающего смысла; то есть в смысле "включая, без ограничений".

Термины "специфически связывается с" или "специфическое связывание", или "связывается с" относятся к связыванию антитела с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем с другими антигенами или эпитопами. Как правило, антитело связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $1 \times 10^{-7}$  М или менее, например около  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее или около  $1 \times 10^{-12}$  М или менее, как правило, с  $K_D$ , которая по меньшей мере в сто раз ниже его  $K_D$  связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином).  $K_D$  можно измерять с помощью стандартных процедур. Однако антитела, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом в пределах антигена, могут иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например в отношении такого же антигена других биологических видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например *Macaca fascicularis* (яванский макак, крабоед), *Pan troglodytes* (шимпанзе) или *Callithrix jacchus* (обыкновенная игрунка, игрунка). Если моноспецифическое антитело специфически связывает один антиген или один эпитоп, биспецифическое антитело специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа.

Термин "агонист" или "агонистический" относится к антителу, которое при связывании с PD-1 индуцирует по меньшей мере одну биологическую активность, индуцируемую PD-L1, т.е. лигандом PD-1. Антитело является агонистом, если происходит индукция в по меньшей мере одной биологической активности на по меньшей мере около 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% больше, чем в отсутствие агониста (т.е. в отрицательном контроле), или когда индукция статистически значима по сравнению с индукцией в отсутствие агониста. Типичной биологической активностью, индуцированной связыванием PD-L1 с PD-1, является ингибирование антиген-специфических Т-клеток  $CD4^+$  и/или  $CD8^+$ , что приводит к подавлению иммунных ответов.

PD-1 относится к человеческому белку 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1). PD-1 также известен как CD279 или PDCD1. Аминокислотная последовательность зрелого человеческого PD-1 (без сигнальной последовательности) показана в последовательности SEQ ID NO: 131. Внеклеточный домен охватывает остатки 1-150, трансмембранный домен охватывает остатки 151-171, а цитоплазматический

домен охватывает остатки 172-268 в последовательности SEQ ID NO: 1. В тексте описания "внеклеточный домен человеческого PD-1" или "huPD1-ECD" относится к белку, имеющему аминокислотную последовательность из остатков 1-150 в последовательности SEQ ID NO: 1.

"Антитела" подразумеваются в широком смысле и включают в себя молекулы иммуноглобулинов, принадлежащих к любому классу, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или подклассу, IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>, и включают в себя легкую цепь либо типа каппа (κ), либо типа лямбда (λ). Термин "антитела" включает в себя моноклональные антитела, полноразмерные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий фрагмент требуемой специфичности. "Полноразмерные антитела" состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). VH и VL можно дополнительно подразделить на области гиперварибельности, именуемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми располагаются каркасные области (FR). Каждая область VH и VL состоит из трех участков CDR и четырех участков FR, расположенных в направлении от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

"Области, определяющие комплементарность (CDR)" представляют собой области антител, которые связываются с антигеном. Существуют три CDR в области VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три CDR в области VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3). CDR можно определить с помощью различных схем, например по Кабат (Wu et al. (1970) *J. Exp. Med.* 132: 211-50) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-17), IMGT (Lefranc et al. (2003) *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77) и AbM (Martin and Thornton *J. Mol. Biol.* 263: 800-15, 1996). Соответствие между различными схемами и нумерациями варибельных областей описано (см., например, Lefranc et al. (2003) *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77; Honegger and Pluckthun, *J. Mol. Biol.* (2001) 309:657-70; база данных International Immunogenetics (IMGT); веб-ресурсы, <http://www.imgt.org>). Для разметки CDR можно использовать доступные программы, такие как abYsis от UCL Business PLC. Используемые в настоящем документе обозначения CDR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Кабату, Чотиа, IMGT или AbM, если в данном описании явным образом не указано иное.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают в себя VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, варибельные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL могут объединяться в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструктами антител с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такими как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях № WO 1998/44001, WO 1988/01649, WO 1994/13804 и WO 1992/01047.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции молекул антител, т.е. индивидуальных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление C-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или деамидирование аминокислот, окисление метионина или аспарагина или деамидирование глутамина. Моноклональные антитела обычно связывают один антигенный эпитоп. Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим, а также моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

Термин "выделенный" относится к однородной популяции молекул (таких как синтетические полинуклеотиды или белок, такой как антитело), которые были по существу отделены и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные молекулы формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу не содержит иных клеточных

материалов и/или химических веществ, и охватывает антитела, которые выделены с относительно высокой чистотой, такой как 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% чистотой.

Термин "антитела" включает в себя антитела, полученные с использованием различных технологий, включая антитела, полученные из иммунизированных животных, таких как мыши, крысы, кролики или цыплята, или идентифицированные из библиотек фаговых дисплеев или дисплеев млекопитающих, как описано в настоящем документе.

Термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а по меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не являться точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

Термин "человеческое антитело" относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Варибельные области человеческого антитела получены из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Если антитело содержит константную область или часть константной области, то константная область также получена из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека.

Человеческое антитело содержит варибельные области тяжелой или легкой цепи, которые "получены из" последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека, если варибельные области антитела получены из системы, в которой используются гены иммуноглобулина зародышевой линии человека. К примерам таких систем относятся библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фагах или клетках млекопитающих, и трансгенных животных, не относящихся к человеку, таких как мыши, крысы или цыплята, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. "Человеческое антитело", как правило, содержит аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у людей, из-за различий между системами, используемыми для получения антител и локусов человеческих иммуноглобулинов, внедрения соматических мутаций природного происхождения, намеренного введения замен в каркасные участки или CDR. Как правило, человеческое антитело на по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, или 99% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью человеческого иммуноглобулина зародышевой линии. В некоторых случаях "человеческое антитело" может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные из анализов человеческой каркасной последовательности, например, как описано в публикации Knappik et al. (2000) *J. Mol. Biol.* 296: 57-86), или синтетический HCDR3, включенный в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, например, как описано в (Shi et al. (2010) *J. Mol. Biol.* 397: 385-96) и в международной патентной публикации № WO 2009/085462. Антитела, в которых CDR получены из видов, отличных от человека, не подходят под определение человеческого антитела.

Термин "рекомбинантный" относится к антителам и другим белкам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами.

Термин "эпитоп" означает часть антигена, с которым специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных групп компонентов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные зарядовые характеристики. Эпитоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, образующих конформационное пространственное звено. В случае прерывающегося эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в 3-мерном пространстве посредством сворачивания молекулы белка.

Термин "мультиспецифический" относится к белку, например антителу, которое специфически связывается с двумя или более разными антигенами или двумя или более разными эпитопами в пределах одного антигена. Мультиспецифический белок может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, крабод), *Pan troglodytes* (шимпанзе), *Callithrix jacchus* (игрунка обыкновенная, игрунка), или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин "биспецифический" относится к белку, такому как антителу, которое специфически связывается с двумя разными антигенами или двумя разными эпитопами в пределах одного антигена. Биспецифический белок может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, крабод), *Pan troglodytes* (шимпанзе), *Callithrix jacchus* (игрунка обыкновенная, игрунка), или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Выражение "в комбинации с" означает, что лекарственные средства или терапевтические средства вводят пациенту, такому как человек, вместе в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

Термины "лечить" или "лечение" обозначают как терапевтическое лечение, так и профилактические или превентивные меры, причем целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства. Преимущественные или желательные клинические результаты включают в себя ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) течения заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное улучшение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин "лечение" может также означать продление времени жизни по сравнению с ожидаемым в отсутствие лечения пациента. Требующие лечения пациенты включают тех, которые уже имеют патологическое состояние или расстройство, а также тех, которые имеют предрасположенность к развитию патологического состояния или расстройства, или тех, у которых такое состояние или расстройство необходимо предотвратить.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к некоторому количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Примеры признаков эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают в себя, например, улучшение состояния здоровья пациента.

Термин "иммунный ответ" включает в себя иммунные ответы, опосредованные Т-клетками и/или В-клетками. Примеры иммунных ответов включают в себя ответы Т-клеток, например выработку цитокинов и клеточно-опосредованную цитотоксичность. Кроме того, термин "иммунный ответ" включает в себя иммунные ответы, на которые косвенно влияет активация Т-клеток, например выработка антител (гуморальные ответы), и активация цитокинчувствительных клеток, например макрофагов.

Термин "снижать" или "снижающий" относится к определенному снижению уровня иммунного ответа у пациента по сравнению с уровнем ответа у пациента в отсутствие лечения или соединения, и/или по сравнению с уровнем ответа у в остальном идентичного, но не получавшего лечение пациента.

Термин "иммунное расстройство" относится к любому заболеванию, расстройству или симптому заболевания, вызванному активностью иммунной системы, включая аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания и аллергические реакции.

Термин "пациент" включает в себя любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин "не относящееся к человеку животное" включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д. Термины "субъект" и "пациент" в настоящем документе могут применяться взаимозаменяемо.

Термин "вектор" обозначает полинуклеотид, способный к удвоению внутри биологической системы или который можно перемещать между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или селективные маркеры, функция которых состоит в том, чтобы способствовать удвоению или сохранению таких полинуклеотидов в биологической системе. Примеры таких биологических систем могут включать клетку, вирус, животное, растение и реконструированные биологические системы, использующие биологические компоненты, способные к удвоению вектора. Содержащий вектор полинуклеотид может представлять собой молекулы ДНК или РНК или их гибрид.

Термин "экспрессионный вектор" означает вектор, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодированного полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин "полинуклеотид" относится к синтетической молекуле, содержащей цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру, к ДНК является примером синтетического полинуклеотида.

Термин "полипептид" или "белок" обозначает молекулу, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться "пептидами".

Термин "около" означает "в пределах приемлемого диапазона ошибки" для конкретного значения, определенного обычным специалистом в данной области, причем ошибка отчасти зависит от того, каким образом измерено или определено это значение, т.е. от ограничений системы измерения. Если в примерах или в других разделах настоящего описания в контексте конкретного анализа, результата или варианта осуществления явным образом не указано иное, термин "около" означает "в пределах одного среднеквадратичного отклонения" в соответствии с практикой, принятой в данной области, или "в диапазоне до 5%", в зависимости от того, что больше.

Термин "проба" относится к сбору аналогичных текучих сред, клеток или тканей, выделенных из организма пациента, а также к текучим средам, клеткам или тканям, находящимся внутри пациента. Примерами проб являются биологические текучие среды, такие как кровь, сыворотка и серозные текучие среды, плазма, лимфа, моча, слюна, кистозная текучая среда, слезы, кал, мокрота, слизистые выделения

секреторных тканей и органов, влагалищные выделения, асцитная жидкость, текучие среды в плевре, перикарде, брюшине, брюшной и других полостях тела, текучие среды, собранные посредством смыва из бронхов, синовиальная текучая среда, жидкие растворы, контактировавшие с пациентом или биологическим источником, например среда для культуры клеток и органов, включая кондиционированную среду клеток и органов, промывные жидкости и т.п., биоптаты тканей, аспираты, взятые тонкой иглой, ткань после хирургической резекции, культуры органов или культуры клеток.

В настоящем документе использованы общепринятые одно- и трехбуквенные коды обозначения аминокислот, как показано в табл. 1.

Таблица 1

Аминокислота	Трехбуквенный код	Однобуквенный код	Аминокислота	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ala	A	Лейцин	Leu	L
Аргинин	Arg	R	Лизин	Lys	K
Аспарагин	Asn	N	Метионин	Met	M
Аспарат	Asp	D	Фенилаланин	Phe	F
Цистеин	Cys	C	Пролин	Pro	P
Глутамат	Gln	E	Серин	Ser	S
Глутамин	Glu	Q	Треонин	Thr	T
Глицин	Gly	G	Триптофан	Trp	W
Гистидин	His	H	Тирозин	Tyr	Y
Изолейцин	Ile	I	Валин	Val	V

Композиции изобретения.

В настоящем документе предложены антитела, которые специфически связываются с PD-1, или его антигенсвязывающие фрагменты, полинуклеотиды, кодирующие антитела, предложенные в настоящем документе, векторы, клетки-хозяева и способы получения и применения антител. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой агонистические антитела.

У некоторых онкологических пациентов, получавших ингибиторы контрольной точки иммунного ответа, включая антагонисты PD-1, развиваются неблагоприятные явления аутоиммунного характера, такие как симптомы артрита, колита или псориаза. Одной из гипотез, объясняющих это наблюдение, является то, что аутореактивные Т-клетки у этих пациентов активно подавлялись через PD-1 и были "освобождены" в присутствии антагониста PD-1. Впоследствии стоит взглянуть на эту гипотезу с другой стороны, и считать вероятным, что "уже освобожденные" Т-клетки у пациентов, у которых имеется аутоиммунное заболевание, могут быть подавлены посредством лигирования/агонизма PD-1.

Было обнаружено, что однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в гене PD-1, PDCD1, связаны с различными аутоиммунными заболеваниями, включая ревматоидный артрит, волчанку и анкилозирующий спондилит (обзор представлен в Zamani et al., Cell Immunol. 2016 310:27-41). Хотя функции SNP в PD-1 еще не выявлены, эти связи могут указывать на то, что снижение активности PD-1 может привести к уменьшению подавления Т-клеток, что может увеличить чувствительность к аутоиммунному заболеванию.

Существует потребность в терапевтических средствах для подавления аутоиммунных Т-клеток при аутоиммунных заболеваниях. Т-клетки PD-1<sup>+</sup> были обнаружены в тканях пациентов с аутоиммунными заболеваниями, включая ревматоидный артрит и синдром Шегрена (Wan et al., J. Immunol. 2006 177(12):8844-50; Kobayashi et al., J. Rheumatol. 2005 32(11):2156-63). Антитело, способное оказывать агонистический эффект в отношении PD-1, можно применять для подавления пролиферации Т-клеток и высвобождения цитокинов, для ограничения повреждения в тканях и восстановления иммунного гомеостаза. mAb-агонисты PD-1 будут нацеливаться на активированные, а не на покоящиеся интактные Т-клетки и Т- и В-клетки памяти. Таким образом, терапевтическое средство будет подавлять иммунные ответы на аутоантигены у пациентов с аутоиммунными заболеваниями без ущерба для ответов иммунной памяти на патогены. Два типа Т-клеток, которые экспрессируют высокие уровни PD-1, T<sub>FH</sub> и T<sub>RH</sub>, стимулируют В-клеточные ответы и продукцию антител (Rao et al., Nature 2017; 542: 110-114). Частота встречаемости этих клеток повышается при аутоиммунных заболеваниях, обусловленных продукцией аутоантител, включая ревматоидный артрит, системную красную волчанку и синдром Шегрена (Rao et al., Nature 2017; 542: 110-114; He et al., Immunity 2013; 39: 770-781; Verstappen et al., Arthr & Rheum 2017; 69(9): 1850-1861). Антитела по изобретению, в дополнение к обеспечению подавления активированных Т-клеток, могут избирательно уничтожать клетки с высокой экспрессией PD-1, такие как клетки T<sub>FH</sub> и T<sub>RH</sub>.

В изобретении предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и/или LCDR3 любого из антител PD1B505, PD1B742, PD1B743, PD1B878, PD1B506, PD1B750, PD1B751, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848, PD1B849, PD1B850, PD1B512, PD1B756, PD1B757, PD1B1085, PD1B1086, PD1B1087, PD1B1088, PD1B1089, PD1B1090, PD1B1091, PD1B1092, PD1B1093, PD1B1094 или PD1B1095.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие каркас варибельной области тяжелой цепи (VH) и/или каркас варибельной области легкой цепи (VL) любого из антител PD1B505, PD1B742, PD1B743, PD1B878, PD1B506, PD1B750, PD1B751, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848, PD1B849, PD1B850, PD1B512, PD1B756, PD1B757, PD1B1085, PD1B1086, PD1B1087, PD1B1088, PD1B1089, PD1B1090, PD1B1091, PD1B1092, PD1B1093, PD1B1094 или PD1B1095.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH и/или VL любого из антител PD1B505, PD1B742, PD1B743, PD1B878, PD1B506, PD1B750, PD1B751, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848, PD1B849, PD1B850, PD1B512, PD1B756, PD1B757, PD1B1085, PD1B1086, PD1B1087, PD1B1088, PD1B1089, PD1B1090, PD1B1091, PD1B1092, PD1B1093, PD1B1094 или PD1B1095.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой агонистическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент опосредует ADCC у клеток, экспрессирующих PD-1.

В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие PD-1, представляют собой активированные Т-клетки памяти, фолликулярные хелперные Т-клетки ( $T_{FH}$ ), периферические хелперные Т-клетки ( $T_{RH}$ ) или любую их комбинацию.

Клетки  $T_{FH}$  можно идентифицировать как: живые  $CD19^+CD56^-/CD4^+CD45RO^+/HLADR^+/CXCR5^+/ICOS^+PD1^+$ ;

клетки  $T_{RH}$  можно идентифицировать как: живые  $CD19^+CD56^-/CD4^+CD45RO^+/HLADR^+/CXCR5^+/ICOS^+PD1^+$ ;

комбинацию клеток  $T_{FH}/T_{RH}$  можно идентифицировать как: живые  $CD19^+CD56^-/CD4^+CD45RO^+/HLADR^+/ICOS^+PD1^+$ .

Т-клетки памяти можно идентифицировать как  $CD4^+CD45RO^+$  или  $CD8^+CD45RO^+$ .

Антитела линии PD1B505.

Такие mAb, как PD1B505, PD1B742, PD1B743, PD1B878, PD1B1085, PD1B1086, PD1B1087, PD1B1088, PD1B1089, PD1B1090, PD1B1091, PD1B1092, PD1B1093, PD1B1094 или PD1B1095 представляют собой примеры антител линии mAb PD1B505. Эти mAb имеют идентичные области CDR, за исключением того, что некоторые антитела имеют различие в одну аминокислоту в HCDR2 и различия в одну или две аминокислоты в LCDR1. Идентичность области VH находится в диапазоне 82-100%, а идентичность области VL в диапазоне 78-100%. mAb линии PD1B505 являются не блокирующими лигандами.

Линия характеризуется HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 165, 4, 166, 6 и 7 соответственно, и геномной последовательностью VH с SEQ ID NO: 118, и геномной последовательностью VL с SEQ ID NO: 119.

SEQ ID NO: 165 (геномный HCDR2) WINIETGXPT; причем

X представляет собой E, Y, H или W.

SEQ ID NO: 166 (геномный LCDR1) TASSSX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SSYLH; причем

X<sub>1</sub> представляет собой V или F; и

X<sub>2</sub> представляет собой S или P.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 165, 4, 166, 6 и 7 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR2 с SEQ ID NO: 3, 145, 146 или 147 и/или LCDR1 с SEQ ID NO: 5, 148 или 149.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет одно, два, три, четыре или пять из следующих свойств:

не блокирует связывание PD-L1 с PD-1, причем отсутствие блокирования измеряют по неспособности антитела ингибировать кластеризацию клеток, экспрессирующих PD-L1, и клеток, экспрессирующих PD-1, как описано в примере 1;

связывается с PD-1 с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $5 \times 10^{-8}$  М или менее, причем  $K_D$  измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C;

связывается с PD-1 с константой ассоциации ( $K_a$ ) около  $3 \times 10^4$  1/Мс или более, причем  $K_a$  измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C;

связывается с PD-1 с константой диссоциации ( $K_d$ ) около  $3 \times 10^3$  1/с или менее, причем  $K_d$  измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C; или

ингибирует пролиферацию антиген-специфических Т-клеток; при этом пролиферацию оценивают в анализе CMV-РВМС.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркас VH, полученный из IGHV7-4-1\*1 (SEQ ID NO: 125).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркас VL, полученный из IGKV3D-20\*1 (SEQ ID NO: 126).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркас VH, полученный из IGHV7-4-1\*1 (SEQ ID NO: 125) и каркас VL, полученный из IGKV3D-20\*1 (SEQ ID NO: 126).

**SEQ ID NO: 125** IGHV7-4-1\*1

QVQLVQSGSELKPGASVKVSKASGYTFTSYAMNWRQAPGQGLEWMGWIN  
TNTGNPTYAQQFTGRFVFLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR

**SEQ ID NO: 126** IGKV3D-20\*1

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPLAPRLLIYDASSRA  
TGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 118. SEQ ID NO: 118 представляет собой геномную последовательность VH из mAb линии PD1B505.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 119. SEQ ID NO: 118 представляет собой геномную последовательность VL из mAb линии PD1B505.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий VH с SEQ ID NO: 118 и VL с SEQ ID NO: 119. CDR выделены жирным шрифтом в SEQ ID NO: 118 и SEQ ID NO: 119.

SEQ ID NO: 118 (геномная VH линии PD1B505)

X<sub>1</sub>VQLX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>SGX<sub>4</sub>ELKKPGX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>VKX<sub>7</sub>SCKASGYTFTDYSMHVX<sub>8</sub>QAPGX<sub>9</sub>GLX<sub>10</sub>  
WMGWINIETGX<sub>11</sub>PTYAX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>FX<sub>14</sub>GRFX<sub>15</sub>FSLX<sub>16</sub>TSX<sub>17</sub>STAYLQIX<sub>18</sub>X<sub>19</sub>LKX<sub>20</sub>EDTAX<sub>21</sub>  
YFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTGX<sub>22</sub>X<sub>23</sub>TVSS;

причем

X<sub>1</sub> представляет собой D или Q;

X<sub>2</sub> представляет собой Q или V;

X<sub>3</sub> представляет собой E или Q;

X<sub>4</sub> представляет собой P или S;

X<sub>5</sub> представляет собой E или A;

X<sub>6</sub> представляет собой T или S;

X<sub>7</sub> представляет собой I или V;

X<sub>8</sub> представляет собой K или R;

X<sub>9</sub> представляет собой K или Q;

X<sub>10</sub> представляет собой K или E;

X<sub>11</sub> представляет собой E, Y, H или W;

X<sub>12</sub> представляет собой D или Q;

X<sub>13</sub> представляет собой D или G;

X<sub>14</sub> представляет собой K или T;

X<sub>15</sub> представляет собой A или V;

X<sub>16</sub> представляет собой E или D;

X<sub>17</sub> представляет собой A или V;

X<sub>18</sub> представляет собой N, C или S;

X<sub>19</sub> представляет собой N или S;

X<sub>20</sub> представляет собой N или A;

X<sub>21</sub> представляет собой T или V;

X<sub>22</sub> представляет собой T или L; или

X<sub>23</sub> представляет собой L или V.

SEQ ID NO: 119 (геномная VL линии PD1B505)

X<sub>1</sub>IVLTQSPAX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>SX<sub>4</sub>SX<sub>5</sub>GERX<sub>6</sub>TX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>CTASSSX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>SSYLHWYQQKPGX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>PX<sub>13</sub>LX<sub>14</sub>IYSTSNLASGX<sub>15</sub>PX<sub>16</sub>RFSGSGSGTX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>LTISX<sub>20</sub>X<sub>21</sub>EX<sub>22</sub>EDX<sub>23</sub>AX<sub>24</sub>YYCH  
**QYHRSPLTFGX<sub>25</sub>GTKLEX<sub>26</sub>K;**

причем

X<sub>1</sub> представляет собой Q или E;  
 X<sub>2</sub> представляет собой I или T;  
 X<sub>3</sub> представляет собой M или L;  
 X<sub>4</sub> представляет собой A или L;  
 X<sub>5</sub> представляет собой L или P;  
 X<sub>6</sub> представляет собой V или A;  
 X<sub>7</sub> представляет собой M или L;  
 X<sub>8</sub> представляет собой T или S;  
 X<sub>9</sub> представляет собой V или F;  
 X<sub>10</sub> представляет собой S или P;  
 X<sub>11</sub> представляет собой S или L;  
 X<sub>12</sub> представляет собой S или A;  
 X<sub>13</sub> представляет собой K или R;  
 X<sub>14</sub> представляет собой W или L;  
 X<sub>15</sub> представляет собой V или I;  
 X<sub>16</sub> представляет собой A или D;  
 X<sub>17</sub> представляет собой S или D;  
 X<sub>18</sub> представляет собой Y или F;  
 X<sub>19</sub> представляет собой S или T;  
 X<sub>20</sub> представляет собой S или R;  
 X<sub>21</sub> представляет собой M или L;  
 X<sub>22</sub> представляет собой A или P;  
 X<sub>23</sub> представляет собой A или F;  
 X<sub>24</sub> представляет собой T или V;  
 X<sub>25</sub> представляет собой A или Q; и  
 X<sub>26</sub> представляет собой L или I.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 8, 9, 10, 140, 141 или 142.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 143 или 144.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 8, 9, 10, 140, 141 или 142 и VL с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 143 или 144.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 и 7 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 8, 9 или 10 и VL с SEQ ID NO: 14, 15 или 16.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 20, 21 или 22 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 26, 27 или 28.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 145, 4, 5, 6 и 7 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HC с SEQ ID NO: 150 и LC с SEQ ID NO: 28. Предложено также антитело для применения в терапии, например при лечении иммунного расстройства, ревматоидного артрита, волчанки, системной красной волчанки или реакции "трансплантат против хозяина".

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 146, 4, 5, 6 и 7 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HC с SEQ ID NO: 151 и LC с SEQ ID NO: 28. Предложено также антитело для применения в терапии, например при лечении иммунного расстройства, ревматоидного артрита, волчанки, системной красной волчанки или реакции "трансплантат против хозяина".

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 147, 4, 5, 6 и 7 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело



В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело конкурирует за связывание PD-1 с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим

VH с SEQ ID NO: 8 и VL с SEQ ID NO: 14;  
 VH с SEQ ID NO: 9 и VL с SEQ ID NO: 15;  
 VH с SEQ ID NO: 9 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 144; или  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 144.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело связывается с тем же эпитопом, с которым связывается антитело, содержащее

VH с SEQ ID NO: 8 и VL с SEQ ID NO: 14;  
 VH с SEQ ID NO: 9 и VL с SEQ ID NO: 15;  
 VH с SEQ ID NO: 9 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 144; или  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 144.

В некоторых вариантах осуществления области VH и VL или области HC и LC антитела, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенные в настоящем документе, кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с

SEQ ID NO: 11 и 17 соответственно;  
 SEQ ID NO: 12 и 18 соответственно;  
 SEQ ID NO: 12 и 19 соответственно;  
 SEQ ID NO: 13 и 19 соответственно;  
 SEQ ID NO: 23 и 29 соответственно;  
 SEQ ID NO: 24 и 30 соответственно;  
 SEQ ID NO: 24 и 31 соответственно;  
 SEQ ID NO: 25 и 31 соответственно;  
 SEQ ID NO: 132 и 133 соответственно; или  
 SEQ ID NO: 134 и 135 соответственно;  
 SEQ ID NO: 155 и 19 соответственно;  
 SEQ ID NO: 156 и 19 соответственно;  
 SEQ ID NO: 157 и 19 соответственно;  
 SEQ ID NO: 13 и 158 соответственно;  
 SEQ ID NO: 13 и 159 соответственно;  
 SEQ ID NO: 155 и 158 соответственно;  
 SEQ ID NO: 156 и 158 соответственно;  
 SEQ ID NO: 157 и 158 соответственно;

SEQ ID NO: 155 и 159 соответственно;  
 SEQ ID NO: 156 и 159 соответственно;  
 SEQ ID NO: 157 и 159 соответственно;  
 SEQ ID NO: 160 и 31 соответственно;  
 SEQ ID NO: 161 и 31 соответственно;  
 SEQ ID NO: 162 и 31 соответственно;  
 SEQ ID NO: 25 и 163 соответственно;  
 SEQ ID NO: 25 и 164 соответственно;  
 SEQ ID NO: 160 и 163 соответственно;  
 SEQ ID NO: 161 и 163 соответственно;  
 SEQ ID NO: 162 и 163 соответственно;  
 SEQ ID NO: 160 и 164 соответственно;  
 SEQ ID NO: 161 и 164 соответственно; или  
 SEQ ID NO: 162 и 164 соответственно.

Антитела линии PD1B506.

Такие mAb, как PD1B506, PD1B750, PD1B751, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848, PD1B849 и PD1B850, представляют собой примеры антител линии mAb PD1B506. Эти mAb имеют идентичные HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 и вариант HCDR2. Идентичность области VH находится в диапазоне 80-100%, а идентичность области VL составляет около 98%. mAb линии PD1B506 являются блокирующими лиганд. Линия характеризуется HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 32, 124, 40, 41, 42 и 43 соответственно, и геномной последовательностью VH с SEQ ID NO: 120, и геномной последовательностью VL с SEQ ID NO: 121.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 32, 124, 40, 41, 42 и 43 соответственно.

SEQ ID NO: 124 (геномная HCDR2 линии PD1B506)

EINPNX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GIN;

причем

X<sub>1</sub> представляет собой N, D, Q, K или E; и

X<sub>2</sub> представляет собой G, A или I.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR2 с SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38 или 39.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе, имеет одно, два, три, четыре или пять из следующих свойств:

блокирует связывание PD-L1 с PD-1, причем блокирование измеряют по способности антитела ингибировать кластеризацию клеток, экспрессирующих PD-L1, и клеток, экспрессирующих PD-1, как описано в примере 1;

связывается с PD-1 с равновесной константой диссоциации (K<sub>D</sub>) около 5×10<sup>-8</sup> М или менее, причем K<sub>D</sub> измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C;

связывается с PD-1 с константой ассоциации (K<sub>a</sub>) около 4×10<sup>5</sup> 1/Мс или более, причем K<sub>a</sub> измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C;

связывается с PD-1 с константой диссоциации (K<sub>d</sub>) около 1×10<sup>-2</sup> 1/с или менее, причем K<sub>d</sub> измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C; или

ингибирует пролиферацию антиген-специфических Т-клеток; при этом пролиферацию оценивают в анализе CMV-РВМС, как описано в примере 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркас VH, полученный из IGHV1-2\*02 (SEQ ID NO: 127).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркас VL, полученный из IGKV1D-16\*1 (SEQ ID NO: 128).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркас VH, полученный из IGHV1-2\*02 (SEQ ID NO: 127) и каркас VL, полученный из IG IGKV1D-16\*1 (SEQ ID NO: 128).

**SEQ ID NO: 127** IGHV1-2\*02

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI

NPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSR LRSDDTAVYYCAR

**SEQ ID NO: 128** IGKV1D-16\*1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQS

GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYNSYP

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1,

или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие варибельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 120. SEQ ID NO: 120 представляет собой геномную последовательность VH из mAb линии PD1B506.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие варибельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 121. SEQ ID NO: 121 представляет собой геномную последовательность VL из mAb линии PD1B506.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH с SEQ ID NO: 120 и VL с SEQ ID NO: 121. CDR выделены жирным шрифтом в SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 121.

SEQ ID NO: 120 (геномная VH линии PD1B506)

QVQLX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>GAEX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>KPGASVKX<sub>5</sub>SCKASGYTFTTYWMHWVX<sub>6</sub>QX<sub>7</sub>PGQGLEW  
X<sub>8</sub>GEINPNX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>GINY X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>KFX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>TLTVDKSX<sub>17</sub>STAYMX<sub>18</sub>LSX<sub>19</sub>LX<sub>20</sub>SX<sub>21</sub>D  
X<sub>22</sub>AVYYCTIDYYDYGGYWGQGTX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>TVSS;

причем

X<sub>1</sub> представляет собой Q или V;  
X<sub>2</sub> представляет собой S или P;  
X<sub>3</sub> представляет собой L или V;  
X<sub>4</sub> представляет собой V или K;  
X<sub>5</sub> представляет собой L или V;  
X<sub>6</sub> представляет собой K или R;  
X<sub>7</sub> представляет собой R или A;  
X<sub>8</sub> представляет собой I или M;  
X<sub>9</sub> представляет собой N, D, Q, K или E;  
X<sub>10</sub> представляет собой G, A или I;  
X<sub>11</sub> представляет собой N или A;  
X<sub>12</sub> представляет собой E или Q;  
X<sub>13</sub> представляет собой K или Q;  
X<sub>14</sub> представляет собой K или G;  
X<sub>15</sub> представляет собой K или R;  
X<sub>16</sub> представляет собой A или V;  
X<sub>17</sub> представляет собой S или I;  
X<sub>18</sub> представляет собой Q или E;  
X<sub>19</sub> представляет собой S или R;  
X<sub>20</sub> представляет собой T или R;  
X<sub>21</sub> представляет собой E или D;  
X<sub>22</sub> представляет собой S или T;  
X<sub>23</sub> представляет собой T или L; и  
X<sub>24</sub> представляет собой L или V.

SEQ ID NO: 121 (геномная VL линии PD1B506)

DIX<sub>1</sub>MTQSX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>SX<sub>6</sub>SVX<sub>7</sub>DRVX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>TCKASQNVGTNVAWYQQKPX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>P  
KX<sub>13</sub>LIYSASYRYSQVGPX<sub>14</sub>RFX<sub>15</sub>GSGSGTDFLTIX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>QX<sub>19</sub>EDX<sub>20</sub>AX<sub>21</sub>YX<sub>22</sub>CQQYNI  
YPYTFGX<sub>23</sub>GTKLEX<sub>24</sub>K;

причем

X<sub>1</sub> представляет собой V или Q;  
X<sub>2</sub> представляет собой Q или P;  
X<sub>3</sub> представляет собой K или S;  
X<sub>4</sub> представляет собой F или S;  
X<sub>5</sub> представляет собой M или L;  
X<sub>6</sub> представляет собой T или A;  
X<sub>7</sub> представляет собой R или G;  
X<sub>8</sub> представляет собой S или T;  
X<sub>9</sub> представляет собой V или I;  
X<sub>10</sub> представляет собой G или E;  
X<sub>11</sub> представляет собой Q или K;  
X<sub>12</sub> представляет собой S или A;  
X<sub>13</sub> представляет собой A или S;  
X<sub>14</sub> представляет собой D или S;  
X<sub>15</sub> представляет собой T или S;  
X<sub>16</sub> представляет собой T или S;  
X<sub>17</sub> представляет собой N или S;  
X<sub>18</sub> представляет собой V или L;



В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой агонистическое антитело.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело конкурирует за связывание PD-1 с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим

VH с SEQ ID NO: 44 и VL с SEQ ID NO: 60;  
 VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 62;  
 VH с SEQ ID NO: 46 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 47 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 48 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 49 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 50 и VL с SEQ ID NO: 61; или  
 VH с SEQ ID NO: 51 и VL с SEQ ID NO: 61.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело связывается с тем же эпитопом, с которым связывается антитело, содержащее

VH с SEQ ID NO: 44 и VL с SEQ ID NO: 60;  
 VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 62;  
 VH с SEQ ID NO: 46 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 47 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 48 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 49 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 50 и VL с SEQ ID NO: 61; или  
 VH с SEQ ID NO: 51 и VL с SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления области VH и VL или области HC и LC антитела, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенные в настоящем документе, кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с

SEQ ID NO: 52 и 63 соответственно;  
 SEQ ID NO: 53 и 64 соответственно;  
 SEQ ID NO: 53 и 65 соответственно;  
 SEQ ID NO: 54 и 64 соответственно;  
 SEQ ID NO: 55 и 64 соответственно;  
 SEQ ID NO: 56 и 64 соответственно;  
 SEQ ID NO: 57 и 64 соответственно;  
 SEQ ID NO: 58 и 64 соответственно;  
 SEQ ID NO: 59 и 64 соответственно;  
 SEQ ID NO: 74 и 85 соответственно;  
 SEQ ID NO: 75 и 86 соответственно;  
 SEQ ID NO: 75 и 87 соответственно;  
 SEQ ID NO: 76 и 86 соответственно;  
 SEQ ID NO: 77 и 86 соответственно;  
 SEQ ID NO: 78 и 86 соответственно;  
 SEQ ID NO: 79 и 86 соответственно;  
 SEQ ID NO: 80 и 86 соответственно;  
 SEQ ID NO: 81 и 86 соответственно;  
 SEQ ID NO: 136 и 137 соответственно; или  
 SEQ ID NO: 138 и 139 соответственно.

Антитела линии PD1B512.

mAb PD1B505, PD1B756 и PD1B757 представляют собой примеры антител линии mAb PD1B512. Эти mAb имеют идентичные CDR-области с идентичностью области VH около 84% и с идентичностью области VL 90-99%. mAb линии PD1B512 являются не блокирующими лиганд. Линия характеризуется HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 88, 89, 90, 91, 92 и 93 соответственно, и геномной последовательностью VH с SEQ ID NO: 122, и геномной последовательностью VL с SEQ ID NO: 123.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и

LCDR3 с SEQ ID NO: 88, 89, 90, 91, 92 и 93 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не блокирует связывание PD-L1 с PD-1, причем отсутствие блокирования измеряют по неспособности антитела ингибировать кластеризацию клеток, экспрессирующих PD-L1, и клеток, экспрессирующих PD-1, как описано в примере 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит каркас VH, полученный из IGHV2-5\*04 (SEQ ID NO: 129).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит каркас VL, полученный из IGKV2-28\*01 (SEQ ID NO: 130).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит каркас VH, полученный из IGHV2-5\*04 (SEQ ID NO: 129) и каркас VL, полученный из IGKV2-28\*01 (SEQ ID NO: 130).

**SEQ ID NO: 129** IGHV2-5\*04

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEWLALIYW

NDDKRYSPSLKSRITITKDTSKNQVVLMTNMDPVDGTGYCYV

**SEQ ID NO: 130** IGKV2-28\*01

DIVMTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG

SNRASGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTP

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 122. SEQ ID NO: 122 представляет собой геномную последовательность VH из mAb линии PD1B512.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 123. SEQ ID NO: 123 представляет собой геномную последовательность VL из mAb линии PD1B512.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH с SEQ ID NO: 122 и VL с SEQ ID NO: 123. CDR выделены жирным шрифтом в SEQ ID NO: 122 и SEQ ID NO: 123.

SEQ ID NO: 122 (геномная VH линии PD1B112)

**QX<sub>1</sub>TLKESGPX<sub>2</sub>LX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>PX<sub>5</sub>QTLX<sub>6</sub>LTCX<sub>7</sub>FSGFSLSTSGMGVSWIRQPX<sub>8</sub>GKX<sub>9</sub>LEW**

**LAHIYWDDDKRYX<sub>10</sub>PSLKSRLTIX<sub>11</sub>KDTSX<sub>12</sub>NQVX<sub>13</sub>LX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>TX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>DX<sub>18</sub>X<sub>19</sub>DTGTY**

**CVRKGYDYGYVMDYWGQGTGX<sub>20</sub>VTVSS,**

причем

X<sub>1</sub> представляет собой V или I;

X<sub>2</sub> представляет собой G или T;

X<sub>3</sub> представляет собой L или V;

X<sub>4</sub> представляет собой Q или K;

X<sub>5</sub> представляет собой S или T;

X<sub>6</sub> представляет собой S или T;

X<sub>7</sub> представляет собой S или T;

X<sub>8</sub> представляет собой S или P;

X<sub>9</sub> представляет собой G или A;

X<sub>10</sub> представляет собой N или S;

X<sub>11</sub> представляет собой S или T;

X<sub>12</sub> представляет собой S или K;

X<sub>13</sub> представляет собой F или V;

X<sub>14</sub> представляет собой K или T;

X<sub>15</sub> представляет собой I или M;

X<sub>16</sub> представляет собой S или N;

X<sub>17</sub> представляет собой V или M;

X<sub>18</sub> представляет собой T или P;

X<sub>19</sub> представляет собой A или V; и

X<sub>20</sub> представляет собой T или L.

SEQ ID NO: 123 (геномный VL линии PD1B112)

DIVMTQX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>LSX<sub>3</sub>PVTX<sub>4</sub>GX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>ASISCRSSKSLLSHNGITYLNWYLQKPGQSPQL

LIYQMSNLSASGVPDRFSX<sub>7</sub>SGSGTDFTLX<sub>8</sub>ISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGX<sub>9</sub>GTK

X<sub>10</sub>EX<sub>11</sub>K,

причем

X<sub>1</sub> представляет собой А или S;  
 X<sub>2</sub> представляет собой А или Р;  
 X<sub>3</sub> представляет собой N или L;  
 X<sub>4</sub> представляет собой L или Р;  
 X<sub>5</sub> представляет собой Т или Е;  
 X<sub>6</sub> представляет собой S или Р;  
 X<sub>7</sub> представляет собой S или G;  
 X<sub>8</sub> представляет собой R или K;  
 X<sub>9</sub> представляет собой S или G;  
 X<sub>10</sub> представляет собой L или V; и  
 X<sub>11</sub> представляет собой M или I.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 94 или 95.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VL с SEQ ID NO: 98, 99 или 100.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH с SEQ ID NO: 94 или 95 и VL с SEQ ID NO: 98, 99 или 100.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH с SEQ ID NO: 94 и VL с SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HC с SEQ ID NO: 104 и LC с SEQ ID NO: 108. Предложено также антитело для применения в терапии, например при лечении иммунного расстройства, ревматоидного артрита, волчанки, системной красной волчанки или реакции "трансплантат против хозяина".

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HC с SEQ ID NO: 105 и LC с SEQ ID NO: 109. Предложено также антитело для применения в терапии, например при лечении иммунного расстройства, ревматоидного артрита, волчанки, системной красной волчанки или реакции "трансплантат против хозяина".

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HC с SEQ ID NO: 105 и LC с SEQ ID NO: 110. Предложено также антитело для применения в терапии, например при лечении иммунного расстройства, ревматоидного артрита, волчанки, системной красной волчанки или реакции "трансплантат против хозяина".

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой агонистическое антитело.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело конкурирует за связывание PD-1 с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим

VH с SEQ ID NO: 94 и VL с SEQ ID NO: 98;

VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 99; или

VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 100.

В изобретении также предложено выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело связывается с тем же эпитопом, с которым связывается антитело, содержащее

VH с SEQ ID NO: 94 и VL с SEQ ID NO: 98;

VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 99; или

VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах осуществления области VH и VL или области HC и LC антитела, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенные в настоящем документе, кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с

SEQ ID NO: 96 и 101 соответственно;

SEQ ID NO: 97 и 102 соответственно;

SEQ ID NO: 97 и 103 соответственно;

SEQ ID NO: 106 и 111 соответственно;

SEQ ID NO: 107 и 112 соответственно; или

SEQ ID NO: 107 и 113 соответственно.

Гомологичные антитела и антитела с консервативными мутациями.

Варианты антител, которые специфически связываются с PD-1, или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенные в настоящем документе, входят в объем изобретения. Например, варианты могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29

аминокислотных замен в VH и/или VL при условии, что варианты антител сохраняют или будут иметь улучшенные свойства по сравнению с исходными антителами. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей может составлять около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% с аминокислотной последовательностью VH и/или VL по изобретению. В некоторых вариантах осуществления вариация находится в каркасных областях. В некоторых вариантах осуществления варианты формируются путем консервативных замен.

Например, антитела линии PD1B505 могут содержать замены в положениях остатков VH 1, 5, 6, 9, 16, 17, 20, 38, 43, 46, 57, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 84, 85, 88, 93, 116 и/или 117 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 8) и в положениях остатков VL 1, 10, 11, 13, 15, 19, 21, 22, 29, 30, 43, 44, 46, 48, 59, 61, 71, 72, 73, 78, 79, 81, 84, 86, 101 и/или 107 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 14). Антитела линии PD1B506 могут содержать замены в положениях остатков VH 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 48, 55, 56, 61, 62, 65, 66, 67, 68, 76, 82, 85, 87, 89, 91, 112 и/или 113 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 44) и в положениях остатков VL 3, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 20, 21, 41, 42, 43, 46, 60, 63, 76, 77, 78, 80, 83, 85, 87, 100 и/или 106 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 60). Антитела линии PD1B512 могут содержать замены в положениях остатков VH 2, 10, 12, 13, 15, 19, 23, 43, 46, 62, 72, 77, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 90 и/или 117 и в положениях остатков VL 7, 8, 11, 15, 17, 18, 69, 79, 105, 109 и/или 111. Консервативные замены можно проводить в любом указанном положении, а полученные варианты антител тестировать на требуемые характеристики в анализах, описанных в настоящем документе. В альтернативном варианте осуществления замены в одной линии mAb могут проводить в указанных положениях путем замены на соответствующую аминокислоту в конкретном положении, присутствующем в других антителах этой линии.

Также предложены антитела, которые специфически связываются с PD-1, или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие VH и VL, которые по меньшей мере на 80% идентичны:

VH с SEQ ID NO: 8 и VL с SEQ ID NO: 14;  
 VH с SEQ ID NO: 9 и VL с SEQ ID NO: 15;  
 VH с SEQ ID NO: 9 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 44 и VL с SEQ ID NO: 60;  
 VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 62;  
 VH с SEQ ID NO: 46 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 47 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 48 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 49 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 50 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 51 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 94 и VL с SEQ ID NO: 98;  
 VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 99; или  
 VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 85%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 90%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 91%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 91%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 92%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 93%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 94%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 94%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 96%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 97%. В некото-

рых вариантах осуществления идентичность составляет 98%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 99%.

Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % идентичности=число идентичных положений/общее число положений×100), с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, который необходимо встроить для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller (Comput Appl. Biosci. 4:11-17 (1988)), который встроено в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицы массы остатков PAM120, штрафа на длину гэпа 12 и штрафа гэпа 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)), который встроено в программу GAP в пакете программ GCG (доступен на сайте <http://www.gcg.com>), используя либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, а также веса гэпов 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины гэпов 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В некоторых вариантах осуществления варианты антител содержат одну или две консервативные замены в любой из областей CDR, причем антитела сохраняют требуемые свойства исходных антител.

Термин "консервативные модификации" означает модификации аминокислот, которые незначительно изменяют или влияют на характеристики связывания антитела, содержащего такие модификации аминокислот. Консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, в которых аминокислота заменена аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Классы аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, четко определены и включают аминокислоты с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидами (например, аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин). Дополнительно любой нативный остаток в полипептиде может быть замещен аланином, согласно способу, описанному ранее как аланин-сканирующий мутагенез (MacLennan et al. (1988) Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67; Sasaki et al. (1988) Adv. Biophys. 35:1-24). Аминокислотные замены в антителах по изобретению могут быть выполнены известными способами, например методом ПЦР-опосредованного мутагенеза (патент США № 4683195). Альтернативно библиотеки вариантов можно создавать, например, путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Характеристики полученных в результате вариантов антител могут быть исследованы с использованием анализов, описанных в настоящем документе.

Сконструированные и модифицированные антитела.

Антитела, которые специфически связываются с PD-1, или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, могут быть дополнительно сконструированы с получением модифицированных антител с аналогичными или измененными свойствами по сравнению с исходными антителами. В антителах по изобретению могут быть сконструированы области VH, VL, VH и VL, константные области, каркас тяжелой цепи, каркас легкой цепи или любой или все из шести CDR.

Антитела, которые специфически связываются с PD-1, или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть сконструированы с помощью прививания CDR. Одну или более последовательностей CDR антител по изобретению можно прививать на другую каркасную последовательность. Прививание CDR можно выполнить с помощью известных способов и способов, описанных в настоящем документе.

Пригодные для использования каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных источников, включающих в себя генные последовательности антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК и кодируемые белковые последовательности человеческих генов переменных доменов легкой и тяжелой цепей зародышевой линии можно найти в международной информационной системе IMGT®, информационной системе ImMunoGeneTics information system® <http://www.imgt.org>. Каркасные последовательности, которые можно применять для замены существующих каркасных последовательностей в антителах по изобретению, могут быть такими, которые показывают наибольшую процентную (%) идентичность с исходными переменными доменами по всей длине VH или VL или по длине FR1, FR2, FR3 и FR4. Кроме того, приемлемые каркасы можно дополнительно выбирать на основании VH и VL в отрезках CDR1 и CDR2 или идентичных LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1 и HCDR2 канонической структуры. Приемлемые каркасы можно выбирать с помощью известных способов, таких как адаптация для человеческого каркаса, описанная в патенте США № 8748356, или супергуманизация, описанная в патенте США № 7709226.

Каркасные последовательности исходных и сконструированных антител можно подвергать дополнительной модификации, например, посредством обратных мутаций, для восстановления и/или улучшения связывания полученных антител с антигеном, как описано, например, в патенте США № 6180370. Каркасные последовательности исходных или сконструированных антител можно дополнительно подвергать модификациям посредством введения мутаций в одном или более остатках в пределах каркасной области (или альтернативно в пределах одной или более областей CDR) для удаления Т-клеточных эпителий и, следовательно, снижения потенциальной иммуногенности антитела. Такой подход также называют "деиммунизацией" и он более подробно описан в патентной публикации США № US 20070014796.

Остатки в CDR антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, можно подвергать мутациям для повышения аффинности антител к PD-1.

Остатки в CDR антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, можно подвергать мутациям для сведения к минимуму риска посттрансляционных модификаций. Аминокислотные остатки предполагаемых мотивов для дезаминирования (NS), катализированного кислотой гидролиза (DP), изомеризации (DS) или окисления (W) можно замещать любой из природных аминокислот с целью мутагенеза мотивов, и полученные антитела можно проверять на их функциональность и стабильность с применением способов, описанных в настоящем документе.

Антитела, которые специфически связываются с PD-1, или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, которые модифицированы с целью улучшения стабильности, селективности, перекрестной реактивности, аффинности, иммуногенности или достижения других желательных биологических или биофизических свойств, входят в пределы объема изобретения. На стабильность антитела влияет ряд факторов, включающих:

- (1) внутреннюю укладку отдельных доменов, влияющих на их собственную стабильность;
- (2) поверхностные взаимодействия белков, влияющие на объединение в пары HC и LC;
- (3) глубину расположения полярных и заряженных остатков;
- (4) сеть Н-мостиков между полярными и заряженными остатками; и
- (5) поверхностный заряд и распределение полярных остатков наряду с другими внутри- и межмолекулярными взаимодействиями (Worn et al. (2001) *J. Mol. Biol.* 305:989-1010).

Остатки, способные дестабилизировать структуру, можно идентифицировать на основании кристаллической структуры антитела или, в определенных случаях, путем молекулярного моделирования, а влияние остатков на стабильность антитела можно исследовать путем создания и оценки вариантов, несущих мутации в идентифицированных остатках. Один из способов увеличения стабильности антитела заключается в увеличении средней температуры перехода ( $T_m$ ), измеряемой с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Как правило,  $T_m$  белка имеет положительную корреляцию с его стабильностью и отрицательную корреляцию с его подверженностью нарушениям третичной структуры и денатурации в растворах, а также деградации, которая зависит от склонности белка к нарушению третичной структуры (Remmele et al. (2000) *Biopharm* 13:36-46). В ряде исследований была установлена корреляция между степенью физической стабильности составов, измеренной как термостабильность с помощью DSC, и измерениями физической стабильности, проведенными другими способами (Gupta et al. (2003) *AAPS Pharm. Sci.* 5E8; Zhang et al. (2004) *J. Pharm. Sci.* 93:3076-89; Maa et al. (1996) *Int. J. Pharm.* 140:155-68; Bedu-Addo et al. (2004) *Pharm. Res.* 21:1353-61; Remmele et al. (1997) *Pharm. Res.* 15:200-8). Результаты исследований структур позволяют предположить, что  $T_m$  Fab влияет на долговременную физическую стабильность соответствующего mAb.

Изотипы, аллотипы антител и антитела со сконструированными Fc.

Антитела, которые специфически связываются с PD-1, или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, могут быть любого известного изотипа или аллотипа, с Fc дикого типа или со сконструированными Fc.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, относится к изотипу IgG<sub>1</sub>.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, относится к изотипу IgG<sub>2</sub>.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, относится к изотипу IgG<sub>3</sub>.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, относится к изотипу IgG<sub>4</sub>.

Циркулирующие эндогенные карбоксипептидазы могут удалять С-концевой лизин (CTL) из введенных антител (Cai et al. (2011) *Biotechnol. Bioeng.* 108:404-412). Удаление CTL во время получения можно контролировать на уровне ниже максимального посредством контроля концентрации внеклеточного  $Zn^{2+}$ , этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) или ЭДТА- $Fe^{3+}$ , как описано в патентной публикации США № US 20140273092. Содержание CTL в антителах можно измерять с помощью известных способов.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, имеет содержание С-

концевых лизинов от около 10% до около 90%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 20% до около 80%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 40% до около 70%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 55% до около 70%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет около 60%.

Иммуногенность терапевтических антител связана с повышенным риском реакций на инфузию и сниженной длительностью терапевтического ответа (Baert et al. (2003) N. Engl. J. Med. 348:602-08). Степень, с которой терапевтические антитела индуцируют иммунный ответ в организме-хозяине, отчасти может определяться аллотипом антитела (Stickler et al. (2011) Genes and Immunity 12:213-21). Аллотип антитела связан с вариациями аминокислотной последовательности в конкретных положениях в последовательностях константных областей антитела. В табл. 2 показаны выбранные аллотипы IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> и IgG<sub>4</sub>.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, относится к аллотипу GG2m(n).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, относится к аллотипу G2m(n-).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, относится к аллотипу G2m(n)/(n-).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, относится к аллотипу nG4m(a).

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, относится к аллотипу G1m(17,1).

Таблица 2

Аллотип	Аминокислотный остаток в положении различия (нумерация остатков: по каталогу EU)							
	IgG2		IgG4		IgG1			
	189	282	309	422	214	356	358	431
G2m(n)	T	M						
G2m(n-)	P	V						
G2m(n)/(n-)	T	V						
nG4m(a)			L	R				
G1m(17)					K	E	M	A
G1m(17,1)					K	D	L	A

Для модуляции эффекторных функций антитела, таких как ADCC, антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и/или ADCP и/или фармакокинетических свойств, можно вводить Fc-мутации антител, которые специфически связываются с PD-1, или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе. Это может быть достигнуто путем введения в Fc мутации(ий), модулирующей(их) связывание мутантного Fc с активирующими рецепторами FcγR (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIII), ингибиторным FcγRIIb и/или с FcRn.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать мутаций в Fc.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc, которая модулирует связывание антитела с FcRn.

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для модуляции периода полужизни антитела (например, связывания с FcRn), включают в себя положения 250, 252, 253, 254, 256, 257, 307, 376, 380, 428, 434 и 435. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации, являются мутации T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A и H435R. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности

или в комбинации для увеличения периода полужизни антитела, предложенного в настоящем документе, являются мутации M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A и T307A/E380A/N434A. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации для уменьшения периода полужизни антитела, предложенного в настоящем документе, являются мутации H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию M252Y/S254T/T256E.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в Fc антитела по меньшей мере одну мутацию, которая уменьшает связывание антитела с активирующим рецептором Fcγ (FcγR) и/или уменьшает эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) или фагоцитоз (ADCP).

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для уменьшения связывания антитела с активирующим FcγR и последующего снижения эффекторной функции, включают в себя положения 214, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 268, 270, 295, 297, 309, 327, 328, 329, 330, 331 и 365. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации, являются мутации K214T, E233P, L234V, L234A, делеция G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, A330S и P331S в IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> или IgG<sub>4</sub>. Примерами комбинаций мутаций, которые приводят к получению антитела со сниженной ADCC, являются мутации L234A/L235A в IgG<sub>1</sub>, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S в IgG<sub>2</sub>, F234A/L235A в IgG<sub>4</sub>, S228P/F234A/L235A в IgG<sub>4</sub>, N297A во всех изотипах Ig, V234A/G237A в IgG<sub>2</sub>, K214T/E233P/L324V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M в IgG<sub>1</sub>, H268Q/V309L/A330S/P331S в IgG<sub>2</sub>, S267E/L328F в IgG<sub>1</sub>, L234F/L235E/D265A в IgG<sub>1</sub>, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S в IgG<sub>1</sub>, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S в IgG<sub>4</sub> и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P2388 в IgG<sub>4</sub>. Можно также применять гибридные домены Fc IgG<sub>2/4</sub>, такие как Fc с остатками 117-260 из IgG<sub>2</sub> и остатками 261-447 из IgG<sub>4</sub>.

Примером мутации, которая приводит к получению антител со сниженной CDC, является мутация K322A.

Для усиления стабильности IgG<sub>4</sub> в антителах IgG<sub>4</sub> можно выполнять известную мутацию S228P.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию по меньшей мере в одном положении остатка 214, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 268, 270, 295, 297, 309, 322, 327, 328, 329, 330, 331 или 365.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из K214T, E233P, L234V, L234A, делеции G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, K322, A330S и P331S.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию по меньшей мере в одном положении остатка 228, 234, 235, 237, 238, 268, 322, 330 или 331.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию K322A.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию S228P.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в Fc антитела по меньшей мере одну мутацию, которая усиливает связывание антитела с рецептором Fcγ (FcγR) и/или усиливает эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или фагоцитоз (ADCP).

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для увеличения связывания антитела с активирующим FcγR и/или для усиления эффекторных функций антитела, включают в себя положения 236, 239, 243, 256, 290, 292, 298, 300, 305, 312, 326, 330, 332, 333, 334, 345, 360, 339, 378, 396 или 430 (нумерация остатков соответствует каталогу ЕС). Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации, являются: мутация G236A, мутация S239D, мутация F243L, мутация T256A, мутация K290A, мутация R292P, мутация S298A, мутация Y300L, мутация V305L, мутация K326A, мутация A330K, мутация I332E, мутация E333A, мутацию K334A, мутация A339T и мутация P396L. Примерами комбинаций мутаций, которые приводят к получению антител с повышенными ADCC или ADCP, являются: мутация S239D/I332E, мутация S298A/E333A/K334A, мутация F243L/R292P/Y300L, мутация F243L/R292P/Y300L/P396L, мутация F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и мутация G236A/S239D/I332E в IgG<sub>1</sub>.

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для усиления CDC антитела, включают в себя

положения 267, 268, 324, 326, 333, 345 и 430. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации, являются: мутация S267E, мутация F1268F, мутация S324T, мутация K326A, мутация K326W, мутация E333A, мутация E345K, мутация E345Q, мутация E345R, мутация E345Y, мутация E430S, мутация E430F и мутация E430T. Примерами комбинаций мутаций, которые приводят к получению антител с повышенной CDC, являются: мутация K326A/E333A, мутация K326W/E333A, мутация H268F/S324T, мутация S267E/H268F, мутация S267E/S324T и мутация S267E/H268F/S324T в IgG<sub>1</sub>.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну мутацию в области Fc, которая усиливает связывание антитела с FcγRIIb. Усиленное связывание с FcγRIIb может приводить к подавлению В-клеток FcγRIIb и/или приводить к кластеризации антител и последующей активации нижележащих сигнальных путей PD-1.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию S267E.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию S267D.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию S267E/I332E.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию S267E/L328F.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию G236D/S267E.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию P238D/E233D/G237D/H268D/P271G/A330R.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит мутацию P238D.

"Антителозависимая клеточная цитотоксичность", "антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "ADCC" представляет собой механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например естественными клетками-киллерами (NK), моноцитами, макрофагами и нейтрофилами, посредством гамма-рецепторов Fc (FcγR), экспрессирующихся на эффекторных клетках. Например, NK-клетки экспрессируют FcγRIIIa, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIIIa. ADCC-активность антител, предложенных в настоящем документе, можно оценить с помощью анализа *in vitro* с использованием клеток, экспрессирующих PD-1, в качестве клеток-мишеней и NK-клеток в качестве эффекторных клеток. Цитолиз можно обнаруживать по высвобождению метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных внутриклеточных белков) из лизированных клеток. В примере анализа клетки-мишени применяли в соотношении 1 клетка-мишень на 4 эффекторные клетки. Клетки-мишени предварительно маркируют BATDA и объединяют с эффекторными клетками и исследуемым антителом. Пробы инкубируют в течение 2 часов и измеряют лизис клеток путем измерения высвобождения BATDA в супернатант. Данные нормализуют по максимальной цитотоксичности с 0,67% Triton X-100 (Sigma Aldrich) и минимальному контролю, который определяют по высвобождению BATDA из клеток-мишеней в отсутствие любого антитела.

"Антителозависимый клеточный фагоцитоз" (ADCP) относится к механизму уничтожения покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки. ADCP можно оценить с помощью моноцитарных макрофагов в качестве эффекторных клеток и клеток Дауди (ATCC® CCL-213™) или любых других экспрессирующих PD-1 клеток в качестве клеток-мишеней, сконструированных с экспрессией зеленого флуоресцентного белка (GFP) или другой молекулы-метки. В примере анализа соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней может составлять, например, 4:1. Эффекторные клетки можно инкубировать с клетками-мишенями в течение 4 часов с антителом по изобретению или без него. После инкубации клетки можно отделять с помощью аккутазы. Идентификацию макрофагов можно проводить с помощью антител к CD11b и к CD14, связанных с флуоресцентной меткой, а процентное значение фагоцитоза можно определять на основании % флуоресцентного GFP в макрофагах CD11<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> с помощью стандартных способов.

"Комплемент-зависимая цитотоксичность", или "CDC", относится к механизму индукции гибели клеток, в рамках которого эффекторный домен Fc связанного с мишенью антитела связывает и активирует компонент комплемента C1q, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента может также приводить к осаждению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, что облегчает CDC посредством связывания на лейкоцитах рецепторов комплемента (например, CR3). CDC для клеток можно измерять, например, посредством высевания клеток Дауди при  $1 \times 10^5$  клеток/лунка (50 мкл/лунка) в RPMI-B (RPMI с добавлением 1% BSA), добавления 50 мкл исследуемых антител в лунки до конечной концентрации в диапазоне 0-100

мкг/мл, инкубирования реакционной смеси в течение 15 мин при комнатной температуре, добавления 11 мкл пулированной человеческой сыворотки в лунки и инкубирования реакционной смеси в течение 45 мин при 37°C. Процентное значение (%) лизированных клеток можно определять как % окрашенных пропидий йодидом клеток в анализе FACS с помощью стандартных способов.

Связывание антитела с FcγR или FcRn можно оценивать с использованием проточной цитометрии на клетках, сконструированных для экспрессии каждого из рецепторов. В примере анализа связывания в 96-луночный планшет высевают  $2 \times 10^5$  клеток на лунку и блокируют буферным раствором для окрашивания с бычьим сывороточным альбумином (BSA) (BD Biosciences, г. Сан-Хосе, США) в течение 30 мин при 4°C. Клетки инкубируют с исследуемым антителом на льду в течение 1,5 ч при 4°C. После двукратного промывания буферным раствором для окрашивания BSA клетки инкубируют с меченым R-фикоэритрином (R-PE) вторичным антителом к человеческому IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в течение 45 мин при 4°C. Клетки дважды промывают в буферном растворе для окрашивания, после чего повторно суспендируют в 150 мкл буферного раствора для окрашивания, содержащего разведенный в соотношении 1:200 краситель DRAQ7 для живых/мертвых клеток (Cell Signaling Technology, г. Данверс, США). Сигналы PE и DRAQ7 от окрашенных клеток определяют с помощью проточного цитометра Miltenyi\_MACSQuant (Miltenyi Biotec, г. Оберн, США) с использованием каналов B2 и B4 соответственно. Живые клетки гейтируют с исключением DRAQ7 и определяют средние геометрические сигналы флуоресценции для по меньшей мере 10000 собранных живых событий. Для анализа используют программное обеспечение FlowJo (Tree Star). Данные представлены на графике в виде зависимости логарифма концентрации антитела от средних сигналов флуоресценции. Проводят нелинейный регрессионный анализ.

Термин "усилить" или "усиленный" относится к усиленной эффекторной функции (например, ADCC, CDC и/или ADCP) или к усилению связывания с Fcγ-рецептором (FcγR) или рецептором FcRn антитела по изобретению, имеющего по меньшей мере одну мутацию в области Fc по сравнению с исходным антителом без мутации. Термин "усиленный" может означать усиление на около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% или более или статистически значимое усиление.

Термин "снижение" или "сниженный" относится к сниженной эффекторной функции (например, ADCC, CDC и/или ADCP) или к снижению связывания с Fcγ-рецептором (FcγR) или рецептором FcRn антитела по изобретению, имеющего по меньшей мере одну мутацию в области Fc по сравнению с исходным антителом без мутации. Термин "снижение" может означать снижение на около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% или более, или статистически значимое снижение.

Термин "модулировать" относится к усиленной или сниженной эффекторной функции (например, ADCC, CDC и/или ADCP) или к усилению или снижению связывания с Fcγ-рецептором (FcγR) или рецептором FcRn антитела по изобретению, имеющего по меньшей мере одну мутацию в области Fc по сравнению с исходным антителом без мутации.

Гликомодифицированные антитела.

Способность моноклональных антител индуцировать ADCC можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. IgG<sub>1</sub> или IgG<sub>3</sub> человека претерпевают N-гликозилирование по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к областям Fc, усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания FcγRIIIa без изменения связывания с антигеном или активности CDC. Такие mAb можно получать, используя различные способы, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, такие как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., *Cytotechnology* 64:249-65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields et al., *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier et al., *MAbs*; 2(4):405-415, 2010; PMID:20562582), применение линии клеток гибридомы крыс YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.* 278:3466-3473, 2003), введение малой интерферирующей РНК, специфичной к гену 1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol Bioeng* 88:901-908, 2004), или коэкспрессия β-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α-маннозидазы II комплекса Гольджи, или применение сильного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., *J. Biol. Chem.* 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., *Biotechnol. Bioeng.* 93:851-861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol. Bioeng.* 99:652-65, 2008).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитела по изобретению имеют 2-антенарную структуру гликанов с содержанием фукозы от около 1% до около 15%, например около 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению имеют структуру гликанов с содержанием фукозы около 50, 40, 45, 40, 35, 30, 25 или 20%.

Термин "содержание фукозы" означает количество моносахарида фукозы в пределах сахаридной

цепи в положении Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентное содержание фукозосодержащих структур, относящихся ко всем гликоструктурам. Они могут быть охарактеризованы и количественно определены множеством способов, например:

1) при помощи времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) пробы, обработанной N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные, олигоманнозные и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной заявке № WO 2008/0775462);

2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/количественным определением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (сверхэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ)) с флуоресцентным обнаружением и/или высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) (сверхэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС));

3) анализом интактного белка нативного или восстановленного mAb с обработкой или без обработки гликанов Asn297 ферментом Endo S или другим ферментом, который расщепляет связь между первым и вторым моносахаридами GlcNAc, сохраняя фукозу присоединенной к первому GlcNAc;

4) расщеплением mAb на составляющие его пептиды посредством ферментативного расщепления (например, трипсин или эндопептидаза Lys-C) и последующим разделением, обнаружением и количественным определением посредством ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС);

5) отделением олигосахаридов mAb от белка mAb посредством специфического ферментативного дегликозилирования с PNGase F на Asn 297.

Высвобожденные таким образом олигосахариды можно метить флуорофором, разделять и идентифицировать различными вспомогательными методами, которые позволяют: точно охарактеризовать структуры гликанов посредством масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определить степень сиалилирования с помощью ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделить и количественно оценить формы олигосахаридов по критерию гидрофильности с помощью ВЭЖХ с обычной фазой (GlycoSep N) и разделить и количественно оценить формы олигосахаридов с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза с лазер-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

В настоящем документе выражения "низкофукозный" или "с низким содержанием фукозы" относятся к антителам с содержанием фукозы около 1-15%.

"Нормальнофукозный" или "с нормальным содержанием фукозы" в настоящем документе относятся к антителам с содержанием фукозы более около 50%, как правило, более около 80% или более около 85%.

Антиидиотипические антитела.

Антиидиотипические антитела представляют собой антитела, специфически связывающиеся с описанными в настоящем документе антителами, которые специфически связываются с PD-1.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, которое специфически связывается с предложенными в настоящем документе антителами, которые специфически связываются с PD-1.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, которое специфически связывается с антителом, содержащим:

VH с SEQ ID NO: 8 и VL с SEQ ID NO: 14;  
 VH с SEQ ID NO: 9 и VL с SEQ ID NO: 15;  
 VH с SEQ ID NO: 9 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 16;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 143;  
 VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 144;  
 VH с SEQ ID NO: 44 и VL с SEQ ID NO: 60;  
 VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 62;  
 VH с SEQ ID NO: 46 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 47 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 48 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 49 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 50 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 51 и VL с SEQ ID NO: 61;  
 VH с SEQ ID NO: 94 и VL с SEQ ID NO: 98;  
 VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 99; или  
 VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 100.

Антиидиотипическое (Id) антитело является антителом, распознающим антигенные детерминанты (например, паратоп или CDR) антитела. Id-антитело может быть блокирующим или неблокирующим антиген. Блокирующее антиген Id-антитело можно использовать для обнаружения свободного антитела в пробе (например, описанного в настоящем документе антитела к PD-1 по изобретению). Неблокирующее Id-антитело можно применять для обнаружения всех антител (свободных, частично связанных с антигеном или полностью связанных с антигеном) в пробе. Id-антитело можно получать путем иммунизации животного антителом, для которого получают анти-Id-антитело.

Анти-Id-антитело также можно применять в качестве иммуногена для индукции иммунного ответа у еще одного животного, получая так называемое анти-анти-Id-антитело. Анти-анти-Id-антитело может быть эпитопно идентично первичному mAb, которое индуцировало анти-Id. Таким образом, используя антитела к идиотипическим детерминантам mAb, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности. Для антиидиотипических антител можно подвергать вариациям (получая, тем самым, варианты анти-Id-антител) и/или выделению производных при помощи любой приемлемой методики, например описанной в других частях настоящего документа применительно к антителам, специфически связывающим PD-1.

Конъюгаты предложенных в настоящем документе антител, специфически связывающих PD-1.

В изобретении также предложен иммуноконъюгат, содержащий выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1, конъюгированные с гетерологичной молекулой.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная молекула представляет собой обнаруживаемую метку или цитотоксический агент.

В изобретении также предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1, конъюгированные с обнаруживаемой меткой.

В изобретении также предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PD-1, конъюгированные с цитотоксическим агентом.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с PD-1, можно применять для направления терапевтических средств к клеткам, экспрессирующим PD-1. Клетки, такие как активированные Т-клетки, которые сверхэкспрессируют PD-1, могут быть мишенями антитела, специфически связывающего PD-1, конъюгированного с цитотоксическим агентом, который убивает клетку после ин-

тернализации антитела к PD-1. Альтернативно клетки, экспрессирующие PD-1, могут быть мишенями для антитела к PD-1, связанного с терапевтическим средством, предназначенным для модификации клеточной функции после интернализации.

В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка также является цитотоксическим агентом.

Предложенное в настоящем документе выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с обнаруживаемой меткой, можно использовать для оценки экспрессии PD-1 на различных пробах.

Обнаруживаемые метки включают в себя композиции, которые при конъюгировании с предложенным в настоящем документе выделенным антителом, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающим фрагментом делают его обнаружимым посредством спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств.

Примеры обнаруживаемых меток включают в себя радиоактивные изотопы, магнитные гранулы, металлические гранулы, коллоидные частицы, флуоресцентные красители, электроноплотные реагенты, ферменты (например, широко используемые в иммуноферментном анализе (ИФА)), биотин, дигоксигенин, гаптены, люминисцентные молекулы, хемилуминесцентные молекулы, флуорохромы, флуорофоры, гасящие флуоресценцию агенты, цветные молекулы, радиоактивные изотопы, сцинтиллирующие средства, авидин, стрептавидин, белок А, белок G, антитела или их фрагменты, полигистидин, Ni<sup>2+</sup>, Flag-маркеры, тус-маркеры, тяжелые металлы, ферменты, щелочная фосфатаза, пероксидаза, люцифераза, доноры/акцепторы электронов, сложные эфиры акридиния и колориметрические субстраты.

Обнаруживаемая метка может испускать сигнал спонтанно, например, когда обнаруживаемая метка представляет собой радиоактивный изотоп. В других случаях обнаруживаемая метка испускает сигнал в результате стимуляции внешним полем.

Примерами радиоактивных изотопов могут быть  $\gamma$ -излучающие, Оже-электрон-излучающие,  $\beta$ -излучающие,  $\alpha$ -излучающие или позитрон-излучающие радиоактивные изотопы. К примерам радиоактивных изотопов относятся <sup>3</sup>H, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>F, <sup>19</sup>F, <sup>55</sup>Co, <sup>57</sup>Co, <sup>60</sup>Co, <sup>61</sup>Cu, <sup>62</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>68</sup>Ga, <sup>72</sup>As, <sup>75</sup>Br, <sup>86</sup>Y, <sup>89</sup>Zr, <sup>90</sup>Sr, <sup>94m</sup>Tc, <sup>99m</sup>Tc, <sup>115</sup>In, <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>211</sup>At, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>223</sup>Ra, <sup>226</sup>Ra, <sup>225</sup>Ac и <sup>227</sup>Ac.

К примерам атомов металлов относятся металлы с атомным номером более 20, например атомы кальция, атомы скандия, атомы титана, атомы ванадия, атомы хрома, атомы марганца, атомы железа, атомы кобальта, атомы никеля, атомы меди, атомы цинка, атомы галлия, атомы германия, атомы мышьяка, атомы селена, атомы брома, атомы криптона, атомы рубидия, атомы стронция, атомы иттрия, атомы циркония, атомы ниобия, атомы молибдена, атомы технеция, атомы рутения, атомы родия, атомы палладия, атомы серебра, атомы кадмия, атомы индия, атомы олова, атомы сурьмы, атомы теллура, атомы йода, атомы ксенона, атомы цезия, атомы бария, атомы лантана, атомы гафния, атомы тантала, атомы вольфрама, атомы рения, атомы осмия, атомы иридия, атомы платины, атомы золота, атомы ртути, атомы таллия, атомы свинца, атомы висмута, атомы франция, атомы радия, атомы актиния, атомы церия, атомы празеодима, атомы неодима, атомы прометия, атомы самария, атомы европия, атомы гадолиния, атомы тербия, атомы диспрозия, атомы гольмия, атомы эрбия, атомы туллия, атомы иттербия, атомы лютеция, атомы тория, атомы протактиния, атомы урана, атомы нептуния, атомы плутония, атомы америция, атомы кюрия, атомы берклия, атомы калифорния, атомы эйнштейния, атомы фермия, атомы менделевия, атомы нобелия или атомы лоуренсия.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой щелочноземельные металлы с атомным номером более двадцати.

В некоторых вариантах осуществления атомы металлов могут представлять собой лантаниды.

В некоторых вариантах осуществления атомы металлов могут представлять собой актиниды.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой переходные металлы.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой постпереходные металлы.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой атомы золота, атомы висмута, атомы тантала и атомы гадолиния.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой металлы с атомным номером от 53 (т.е. йод) до 83 (т.е. висмут).

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой атомы, приемлемые для магнитно-резонансной томографии.

Атомы металлов могут представлять собой ионы металлов со степенью окисления +1, +2, +3, например Ba<sup>2+</sup>, Bi<sup>3+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Co<sup>3+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cu<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup>, Au<sup>+</sup>, Au<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, F<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mn<sup>3+</sup>, Mn<sup>4+</sup>, Mn<sup>7+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Ni<sup>3+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, Sn<sup>4+</sup> и Zn<sup>2+</sup>. Атомы металлов могут включать в себя оксид металла, такой как оксид железа, оксид марганца или оксид гадолиния.

Приемлемые красители включают в себя любые присутствующие на рынке красители, такие как, например, 5(6)-карбоксифлуоресцеин, малеимид IRDye 680RD или IRDye 800CW, красители на основе

комплекса рутений/полипиридил и т.п.

К приемлемым флуорофорам относятся флуоресцеин изотиоцианат (FITC), флуоресцеин тиосемикарбазид, родамин, Texas Red, красители CyDye (например, Cy3, Cy5, Cy5.5), красители Alexa Fluor (например, Alexa488, Alexa555, Alexa594; Alexa647), флуоресцентные красители ближнего ИК-диапазона (NIR) (700-900 нм) и карбоцианиновые и аминостирильные красители.

Предложенное в настоящем документе выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с обнаруживаемой меткой, можно использовать в качестве агента для визуализации.

В некоторых вариантах осуществления предложенное в настоящем документе выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой химиотерапевтический препарат, лекарственное средство, ингибирующий рост агент, токсин (например, токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, обладающий ферментативной активностью, или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоактивный конъюгат).

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой дауномицин, доксорубин, метотрексат, виндезин, бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, рицин, гелданамицин, мейтансиноиды или калихеамицин. Цитотоксический агент может индуцировать цитотоксический и цитостатический эффекты посредством механизмов, включающих связывание с тубулином, связывание с ДНК или ингибирование топоизомеразы.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой токсин с ферментативной активностью, такой как А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАР-S), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотетены.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой радионуклид, такой как  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  и  $^{186}\text{Re}$ .

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой долостатины или пептидные аналоги и производные долостатина, ауристин или монометилауристин фенилаланин. Примеры молекул описаны в патентах США № 5635483 и № 5780588. Показано, что долостатины и ауристины блокируют динамику микротрубочек, гидролиз ГТФ и деление ядра и клетки (Woyke et al. (2001) *Antimicrob Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) и обладают противораковой и противогрибковой активностью. Функциональная группа лекарственного средства долостатина или ауристинина может быть присоединена к антителу по изобретению, посредством N (амино) конца или C (карбоксылного) конца функциональной группы пептидного лекарственного средства (WO 02/088172) или посредством любого цистеина, искусственно внедренного в антитело.

Предложенное в настоящем документе выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с обнаруживаемой меткой с помощью известных способов.

В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка находится в комплексе с хелатирующим агентом.

В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка конъюгирована с предложенным в настоящем документе выделенным антителом, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающим фрагментом посредством линкера.

Обнаруживаемую метку или цитотоксический фрагмент можно напрямую или опосредованно связывать с предложенным в настоящем документе антителом, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающим фрагментом с использованием известных способов. К подходящим линкерам, известным в данной области, относятся, например, простетические группы, нефенольные линкеры (производные N-сукцинимидилбензоатов; додекарборат), хелатирующие группы как макролитических, так и ациклических хелаторов, например производные 1,4,7,10-тетраазаацетилдодекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (DOTA), производные диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA), производные S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазаацетилдодекан-1,4,7-триуксусной кислоты (NOTA) и производные 1,4,8,11-тетраазаацетилдодекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты (TETA), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), имиотиолан (IT), дисфункциональные производные сложных имидозифиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидные соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные фтористые соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол) и другие хелатирующие группы. Подходящие пептидные линкеры хорошо известны.

В некоторых вариантах осуществления предложенное в настоящем документе антитело, которое

специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент удаляется из крови почками.

Наборы.

В изобретении также предложен набор, содержащий описанное в настоящем документе антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент.

Набор можно применять для терапевтических областей применения и в виде диагностических наборов.

Набор можно применять для обнаружения наличия PD-1 в пробе.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит предложенное в настоящем документе антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент и реагенты для обнаружения антитела. Набор может содержать один или более из других элементов: инструкцию по применению; другие реагенты, например метку, терапевтический агент или агент, используемый для хелатирования или иного сочетания, антитело для мечения, или терапевтический агент, или радиозащитную композицию; устройства или другие материалы для подготовки антитела к введению; фармацевтически приемлемые носители и устройства или другие материалы для введения пациенту.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит предложенное в настоящем документе антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент в контейнере и инструкции по использованию набора.

В некоторых вариантах осуществления антитело в наборе является меченым.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело, специфически связывающее PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

- VH с SEQ ID NO: 8 и VL с SEQ ID NO: 14;
- VH с SEQ ID NO: 9 и VL с SEQ ID NO: 15;
- VH с SEQ ID NO: 9 и VL с SEQ ID NO: 16;
- VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 16;
- VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 16;
- VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 16;
- VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 16;
- VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 143;
- VH с SEQ ID NO: 10 и VL с SEQ ID NO: 144;
- VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 143;
- VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 143;
- VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 143;
- VH с SEQ ID NO: 140 и VL с SEQ ID NO: 144;
- VH с SEQ ID NO: 141 и VL с SEQ ID NO: 144;
- VH с SEQ ID NO: 142 и VL с SEQ ID NO: 144;
- VH с SEQ ID NO: 44 и VL с SEQ ID NO: 60;
- VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 61;
- VH с SEQ ID NO: 45 и VL с SEQ ID NO: 62;
- VH с SEQ ID NO: 46 и VL с SEQ ID NO: 61;
- VH с SEQ ID NO: 47 и VL с SEQ ID NO: 61;
- VH с SEQ ID NO: 48 и VL с SEQ ID NO: 61;
- VH с SEQ ID NO: 49 и VL с SEQ ID NO: 61;
- VH с SEQ ID NO: 50 и VL с SEQ ID NO: 61;
- VH с SEQ ID NO: 51 и VL с SEQ ID NO: 61;
- VH с SEQ ID NO: 94 и VL с SEQ ID NO: 98;
- VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 99; или
- VH с SEQ ID NO: 95 и VL с SEQ ID NO: 100.

Способы обнаружения PD-1.

В изобретении также предложен способ обнаружения PD-1 в пробе, включающий в себя получение пробы, приведение пробы в контакт с описанным в настоящем документе антителом, специфически связывающим PD-1, или его антигенсвязывающим фрагментом и обнаружение в пробе антитела, связанного с PD-1.

В некоторых вариантах осуществления пробу можно получать из мочи, крови, сыворотки крови, плазмы крови, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, синовиальной жидкости, циркулирующих клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, резецированной хирургическим путем ткани, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, связанные с PD-1, могут быть обнаружены с помощью известных способов. Примеры способов включают в себя прямое мечение антител с использованием флуоресцентных или хемилюминесцентных меток или радиоактивных меток или присоединение к антителам по изобретению легко обнаруживаемой функциональной группы, такой как биотин, ферменты или эпитопные метки. Примерами меток и функциональных групп являются рутений,  $^{111}\text{In}$ -DOTA,  $^{111}\text{In}$ -диэтилтриаминпентауксусная кислота (ДТРА), пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и бета-галактозидаза, полигистидин (HIS-метка), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители и красители Alexafluor®.

Антитела по изобретению можно использовать в ряде анализов для обнаружения PD-1 в пробе. Примерами анализов являются анализ методом вестерн-блоттинга, радиоиммунологический анализ, поверхностный плазмонный резонанс, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммуноанализ, иммуногистохимический анализ, сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или твердофазный ИФА.

Способы получения антител.

Предложенные в настоящем документе антитела, которые специфически связываются с PD-1, или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием различных технологий. Например, для создания моноклональных антител можно использовать метод гибридом по Kohler and Milstein. В методе гибридом мышь или другое животное-хозяина, например хомяка, крысу или курицу, иммунизируют антигенами PD-1 человека и/или яванского макака, такими как внеклеточный домен PD-1, с последующим слиянием спленоцитов от иммунизированных животных с клетками миеломы с использованием стандартных способов с образованием клеток гибридомы. Колонии, возникающие из одиночных клеток immortalized гибридомы, можно подвергнуть скринингу для продукции антител с желательными свойствами, такими как специфичность связывания, перекрестная реактивность, аффинность к антигену и функциональность, например агонистическая активность.

Примеры методик гуманизации, включающих в себя отбор человеческих акцепторных каркасов, включают в себя прививание CDR (патент США № 5225539), прививание SDR (патент США № 6818749), изменение поверхности (Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-499), изменение поверхности определяющих специфичность остатков (патентная публикация США № 2010/0261620), адаптацию человеческого каркаса (патент США № 8748356) или супергуманизацию (патент США № 7709226). В этих способах CDR или часть остатков CDR исходных антител переносят на человеческие каркасы, которые можно выбирать на основании их общей гомологии с исходными каркасами, на основании сходства длины CDR или идентичности канонической структуры либо их комбинации.

Гуманизированные антитела могут быть дополнительно оптимизированы с улучшением их селективности или аффинности к требуемому антигену посредством включения измененных остатков, поддерживающих каркас, с сохранением аффинности связывания (обратных мутаций) такими методиками, которые описаны в международных патентных публикациях № WO 1090/007861 и WO 1992/22653, или посредством встраивания вариации в любую из CDR, например, для улучшения аффинности антитела.

Для получения антител к PD-1 можно применять трансгенных животных, несущих в своем геноме локусы иммуноглобулинов (Ig) человека, таких как мыши, крысы или цыплята, которые описаны, например, в патенте США № 6150584, международной патентной публикации № WO 1999/45962, международной патентной публикации № WO 2002/066630, WO 2002/43478, WO 2002/043478 и WO 1990/04036. Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких животных можно разрывать или удалять, и в геном животного можно встраивать по меньшей мере один полный или частичный локус иммуноглобулина человека посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации, с применением трансхромосом или с применением минигенов. Для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с применением описанной выше технологии можно обратиться к таким компаниям, как Regeneron ([http://\\_www\\_regeneron\\_com](http://_www_regeneron_com)), Harbour Antibodies ([http://\\_www\\_harbourantibodies\\_com](http://_www_harbourantibodies_com)), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) ([http://\\_www\\_omtinc\\_net](http://_www_omtinc_net)), KyMab ([http://\\_www\\_kymab\\_com](http://_www_kymab_com)), Trianni ([http://\\_www.trianni\\_com](http://_www.trianni_com)) и Ablexis ([http://\\_www\\_ablexis\\_com](http://_www_ablexis_com)).

Антитела можно выбирать из библиотеки фагового дисплея, причем фаг выработан с возможностью экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их частей, таких как Fabs, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные либо спаренные вариабельные области антител. Антитела по изобретению могут быть выделены, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде гибридных белков с белком оболочки бактериофага рIX, как описано в публикации Shi et al. (2010) *J. Mol. Biol.* 397:385-96 и в международной патентной публикации № WO09/085462). В библиотеках можно проводить скрининг на связывание фагов с PD-1 человека и/или яванского макака, и полученные положительные клоны могут быть дополнительно охарактеризованы, из лизатов клонов могут быть выделены Fab и экспрессированы в виде полноразмерных IgG.

Получение иммуногенных антигенов и продукция моноклональных антител могут быть выполнены с использованием любой приемлемой методики, такой как продукция рекомбинантного белка. Иммуногенные антигены можно вводить животным в форме очищенного белка или белковых смесей, включаю-

щих в себя целые клетки или клеточные либо тканевые экстракты, или антиген может быть образован *de novo* в организме животного из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его часть.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляет собой биспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляет собой мультиспецифическое антитело.

Предложенные в изобретении моноспецифические антитела, которые специфически связываются с PD-1, можно конструировать в виде биспецифических антител, которые также входят в объем настоящего изобретения.

Полноразмерные биспецифические антитела можно создавать, например, путем обмена Fab-плечами (например, путем обмена полумолекулами, обмена одной пары тяжелая цепь - легкая цепь) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, вводя в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием коэкспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных областях исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй молекулы исходного моноспецифического антитела, и одновременно СНЗ-домены исходных антител высвобождаются и происходит переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча или полумолекулы, каждая из которых связывается с отдельным эпитопом.

Биспецифические антитела можно также получать с применением таких схем, как Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), "выступ во впадину" (Genentech), CrossMAbs (Roche) и электростатически-индуцированное взаимодействие с СНЗ (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), LUZ-Y (Genentech), Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) и продукты DuoBody® (Genmab A/S).

Для получения полноразмерных биспецифических антител можно применять технологию Triomab quadroma. Технология Triomab стимулирует обмен Fab-плечами между двумя исходными химерными антителами, одним исходным mAb, имеющим IgG2a, и вторым исходным mAb, имеющим крысиные константные области IgG2b, с получением химерных биспецифических антител.

Для создания полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию "выступ во впадину". Вкратце выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СНЗ в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ, способствуя образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с "впадиной" и тяжелой цепи с "выступом" образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются следующие (указаны как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S L368A Y407V.

Для создания полноразмерных биспецифических антител по изобретению можно использовать технологию CrossMAB. Антитела CrossMAB дополнительно к применению стратегии обмена Fab-плечами в промоторе по типу "выступ во впадину" имеют в одной из половин плеч обмен доменами СН1 и СL для обеспечения правильного объединения в пары легкой цепи полученного биспецифического антитела (см., например, патент США № 8242247).

Для создания полноразмерных биспецифических антител могут быть использованы другие стратегии перенаправления путем обмена переменного или константного или обоих доменов между тяжелой цепью и легкой цепью или в пределах тяжелой цепи биспецифических антител (либо в одном, либо в обоих плечах). Такие обмены включают в себя, например, обмены VH-CH1 с VL-CL, VH с VL, СНЗ с CL и СНЗ с СН1, как описано в патентных публикациях № WO 2009/080254, WO 2009/080251, WO 2009/018386 и WO 2009/080252.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ, как описано в патентной публикации США № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2009/0182127; патентной публикации США № US 2010/028637 или патентной публикации США № US 2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифи-

цированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): L351Y\_F405A\_Y407V/T394W, T366I\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, T366L\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, L351Y\_Y407A/T366A\_K409F, L351Y\_Y407A/T366V\_K409F, Y407A/T366A\_K409F или T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V/T350V\_T366L\_K392L\_T394W, как описано в патентной публикации США № US 2012/0149876 или патентной публикации США № US 2013/0195849.

Для получения биспецифических антител можно использовать технологию LUZ-Y. В этой технологии к С-концам СНЗ-доменов присоединяют последовательность типа лейциновой застёжки для обеспечения сборки гетеродимера из исходных mAb, которую удаляют после очистки.

Для получения биспецифических антител можно использовать технологию SEEDbody. Для стимуляции гетеродимеризации антитела SEEDbody в своих константных доменах имеют замену выбранных остатков IgG остатками IgA, как описано в патенте США № US 20070287170.

Биспецифические антитела можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в области СНЗ двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях для обеспечения изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации. № WO 2011/131746. В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело конструируют с возможностью обладания определенными заменами в домене СНЗ, способствующими стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Можно использовать замены F405L в одной тяжелой цепи и K409R в другой тяжелой цепи в антителах IgG<sub>1</sub>. В антителах IgG<sub>4</sub> одна тяжелая цепь может представлять собой IgG<sub>4</sub> дикого типа, имеющий F в положении 405 и R в положении 409, а другая тяжелая цепь может иметь замены F405L и R409K. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невозобновляющим. Примерами возобновляющих агентов, которые можно применять, являются 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиозритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCEP), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол. Например, можно использовать инкубацию в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 mM 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 mM дитиотреитола при значении pH от 5 до 8, например при pH 7,0 или при pH 7,4.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела включают в себя рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, причем каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух разных антител; слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; слитые молекулы Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями; слитые молекулы Fab, в которых разные Fab-фрагменты слиты друг с другом; антитела из тяжелых цепей на основе ScFv и диател (например, доменные антитела, нанотела), в которых разные одноцепочечные молекулы Fv, или разные диатела, или разные антитела из тяжелых цепей (например, доменные антитела, нанотела) слиты друг с другом, или с другим белком, или молекулой-носителем.

Как правило, замены вводят в молекулу, например, в константный домен антитела, на уровне ДНК с помощью стандартных способов.

Антитела по изобретению могут быть сконструированы в виде разнообразных известных форм антител.

Например, биспецифическое антитело к PD-1/CD3 может быть создано с использованием доменов VH/VL антител к PD-1, описанных в настоящем документе, и любых областей VH/VL описанных в литературе антител к CD3.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который связывается с PD-1, и второй домен, который связывается с CD3.

Способы определения характеристик антител.

Агонистические антитела.

Типичной биологической активностью, индуцированной агонистическими антителами, предложенными в настоящем документе, является ингибирование (например, подавление) антиген-специфических Т-клеток CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup>. Для оценки агонизма антител, предложенных в настоящем документе, можно использовать различные показатели, такие как снижение пролиферации или снижение продукции интерферона-γ (IFN-γ), IL-17 IL-2, IL-6, IL-22, IL-23 или GM-CSF антиген-специфическими Т-клетками CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup>. В примере анализа используют влияние антител на Т-клетки нормального донора, которые стимулируют аллогенными дендритными клетками или специфическими антигенами, такими как столбнячный анатоксин или CMV. В таких условиях изменения функции Т-клеток при обработке антителом можно обнаруживать посредством измерения уровней цитокина в супернатанте либо по активации маркеров Т-клеток. В примере анализа в качестве источника антиген-специфических Т-клеток CD4<sup>+</sup> или

CD8<sup>+</sup> используют PBMC с выявленной реактивностью на антигены CMV.  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл или  $2 \times 10^6$  клеток/мл PBMC, реагирующих на CMV, высевают на культуральные планшеты, и к культурам добавляют 0,1-0,2 мкг/мл пептидов CMV. Пептиды CMV можно приобрести, например, у компании JPT Technologies. Исследуемые антитела добавляют в одной дозе 10 мкг/мл, планшеты инкубируют в течение 6 дней и оценивают пролиферацию клеток путем добавления 1 мКи/лунка метил-3H-тимидина (PerkinElmer) в течение 6 ч и измерения радиоактивности в каждой пробе. Альтернативно измеряют продукцию цитокинов клетками с помощью ИФА или известных мультиплексных анализов.

Антитела, блокирующие связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2.

Предложенные в настоящем документе антитела по изобретению (такие как агонистические антитела, которые специфически связываются с PD-1), могут быть блокирующими или не блокирующими лиганд. Возможности агонистических антител, предложенных в настоящем документе, можно оценить по способности блокировать лиганд, например PD-L1 и/или PD-L2, с использованием конкурентных анализов, таких как анализ кластеризации клеток.

В примере анализа клетки НЕК, имеющие разные метки и сверхэкспрессирующие либо PD-1, либо PD-L1 (или PD-L2), смешивают в соотношении 1:1 и количественно оценивают способность антител ингибировать кластеризацию клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1 или PD-1 и PD-L2. Клетки, сверхэкспрессирующие человеческий PD-1, можно пометить красителем Violet Cell Trace, а клетки, сверхэкспрессирующие PD-L1 или PD-L2, можно пометить красителем Far Red Cell Trace Stain (Life Technologies). Клетки, экспрессирующие PD-1, смешивают с исследуемым антителом, и после короткой инкубации в смесь добавляют клетки, экспрессирующие PD-L1. Смесь инкубируют в течение одного часа и определяют процентную долю двойных положительных событий (например, кластеров клеток, положительных по окрашиванию Violet Cell Trace и Far Rd Cell Trace) с помощью проточной цитометрии. Уровень кластеризации измеряют по процентной доле двойных положительных событий, и процент кластеризации в присутствии исследуемых антител сравнивают с положительными и отрицательными изотипическими контрольными антителами. Предложенное в настоящем документе антитело блокирует связывание PD-L1 (или PD-L2) с PD-1, если антитело уменьшает число двойных положительных событий для клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1 (или PD-L2) статистически значимым образом по сравнению с изотипическим контролем, при использовании уровня значимости  $p \leq 0,01$ . Антитело, предложенное в настоящем документе, не блокирует связывание PD-L1 (или PD-L2) с PD-1, если антитело ингибирует двойные положительные события PD-1 и PD-L1 (или PD-L2) статистически незначимым образом, например,  $p > 0,01$ .

Измерения аффинности антитела.

Аффинность антитела к PD-1 человека или не человека, например яванского макака, можно определить экспериментально с помощью любого приемлемого способа. Такие способы могут включать применение оборудования ProteOn XPR36, Biacore 3000 или KinExA, ИФА или анализы конкурентного связывания, известные специалистам в данной области. Измеренное значение аффинности взаимодействия конкретного антитела/PD-1 может изменяться при измерении в разных условиях (например, осмоляльность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ), как правило, выполняются в стандартизированных условиях и с применением стандартизованного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе в примере 1. Специалистам в данной области будет понятно, что внутренняя ошибка измерений аффинности, например, с применением оборудования Biacore 3000 или ProteOn (измеряемая как среднеквадратичное отклонение (CO)), как правило, может составлять 5-33% для измерений, проводимых в границах типичных пределов обнаружения. Следовательно, термин "около" в контексте  $K_D$  характеризует типичное среднеквадратичное отклонение в анализе. Например, типичное CO для значения  $K_D$ , равного  $1 \times 10^{-9}$  М, составляет до  $+0,33 \times 10^{-9}$  М.

Антитела, конкурирующие за связывание с PD-1 с эталонным антителом.

Конкуренцию антител по изобретению, содержащих определенные последовательности VH и VL (и, например, эталонных антител), за связывание с PD-1 можно проанализировать *in vitro* на платформе Octet Red384 (Forte Bio). Меченный гистицином антиген PD-1 загружают на датчики HIS, и датчики подвергают воздействию 20 мкг/мл эталонного антитела к PD-1 с последующим воздействием равной концентрации исследуемого антитела к PD-1. Дополнительное связывание исследуемого антитела после насыщения эталонным антителом указывает на одновременное связывание двух антител с PD-1, и это указывает, что эталонное и исследуемое антитело не конкурируют за связывание с PD-1. Альтернативно отсутствие дополнительного связывания исследуемого антитела указывает на то, что два антитела конкурируют за связывание с PD-1.

Антитела, конкурирующие за связывание с PD-1 с эталонным антителом, могут быть получены путем выделения антител, специфически связывающих PD-1, с использованием библиотек фаговых дисплеев и скрининга полученных антител по способности конкурировать за связывание с PD-1 с вышеупомянутыми эталонными антителами.

Исследуемое антитело конкурирует за связывание с PD-1 с эталонным антителом, если исследуемое

антитело связывается с PD-1 при насыщающей концентрации эталонного антитела. Связывание можно обнаруживать с помощью интерферометрии биослоя (например, Octet) путем регистрации сдвига длины волны из-за того, что связанное антитело увеличивает оптическую плотность наконечника биодатчика с течением времени.

Эпитоп антитела.

Эпитоп PD-1, связывающийся с антителом по изобретению, может быть определен, например, с использованием обмена водорода/дейтерия (обмен H/D) или путем анализа кристаллической структуры антитела в комплексе с PD-1. Два антитела к PD-1 "связываются с одним и тем же эпитопом на PD-1", если около 70% или более аминокислотных остатков PD-1, защищенных антителом по меньшей мере с 5-процентной разницей уровней дейтерирования при обмене H/D, являются идентичными для этих двух антител, или если определено, что 70% или более аминокислотных остатков PD-1, связанных с антителом в кристаллической структуре комплекса антитела и PD-1, являются идентичными для этих двух антител. В кристаллической структуре комплекса антитела и PD-1 остатками эпитопа являются те остатки PD-1, которые находятся на расстоянии в пределах 4Å или менее от любого из остатков CDR антитела.

При анализе обмена H/D белок PD-1 инкубируют в присутствии или в отсутствие антитела в дейтерированной воде в течение предварительно заданных периодов времени, что приводит к включению дейтерия в обмениваемые атомы водорода, не защищенные антителом, с последующим расщеплением белка протеазой и анализом пептидных фрагментов с использованием жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). В примере анализа 5 мкл исследуемого антитела (10 мкг) или 5 мкл комплекса PD-1 и исследуемого антитела (10 и 7,35 мкг соответственно) инкубируют с 120 мкл буферного раствора для мечения оксидом дейтерия (50 мМ фосфат, 100 мМ хлорид натрия при pH 7,4) в течение 0 с, 60 с, 300 с, 1800 с, 7200 с и 14 400 с. Реакцию обмена дейтерия гасят добавлением 63 мкл 5 М гидрохлорида гуанидина, и конечный уровень pH составляет 2,5. Погашенный образец подвергают расщеплению на колонке пепсином/протеазой типа XIII и анализу ЖХ-МС. Для расщепления пепсином/протеазой типа XIII денатурируют 5 мкг проб в 125 мкл контрольного буферного раствора (50 мМ фосфата, 100 мМ хлорида натрия при pH 7,4) посредством добавления 63 мкл 5 М гидрохлорида гуанидина (конечный уровень pH составляет 2,5) и инкубации смеси в течение 3 мин. Впоследствии смесь подвергают расщеплению пепсином/протеазой типа XIII и полученные в результате пептиды анализируют с использованием системы СВЭЖХ-МС, состоящей из хроматографа Waters Acquity UPLC, соединенного с квадрупольным масс-спектрометром на платформе Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo). Исходные данные МС обрабатывают с использованием программного обеспечения HDX Workbench, предназначенного для анализа данных МС обмена H/D. Уровни дейтерия рассчитывают с использованием средней разности масс между дейтерированным пептидом и его нативной формой ( $t_0$ ). Идентификацию пептида осуществляют путем поиска данных МС/МС в сравнении с последовательностью PD-1 с использованием программы Mascot. Допуск по массе для ионов предшественника и продукта составляет 20 ч/млн и 0,05 Да соответственно.

Для рентгеновской кристаллографии PD-1 и исследуемое антитело экспрессируют и очищают с использованием стандартных протоколов. Комплекс PD-1/исследуемое антитело инкубируют в течение ночи при 4°C, концентрируют и отделяют от не образовавших комплекс соединений с помощью эксклюзионной хроматографии. Комплекс кристаллизуют способом паровой диффузии из различных известных исследуемых растворов, например растворов, содержащих ПЭГ3350, цитрат аммония и 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (МЭС).

Антитела, связывающие тот же эпитоп на PD-1, что и эталонные антитела, могут быть получены путем выделения антител, связывающих PD-1, с использованием библиотек фаговых дисплеев, выбора тех антител, которые конкурируют с эталонным антителом за связывание с PD-1 на 100%, и идентификации эпитопа антитела посредством обмена H/D или путем рентгеновской кристаллографии.

Альтернативно мышей или кроликов можно иммунизировать с помощью пептидов, включающих эпитопные остатки, и полученные антитела можно оценивать на связывание в пределах указанной области.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий любое из антител по изобретению.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий любую из переменных областей тяжелой цепи антитела, любую из переменных областей легкой цепи антитела или любую из тяжелых цепей антитела и/или легких цепей антитела по изобретению.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 8, 9, 10, 140, 141 или 142.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 143 или 144.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 8, 9, 10, 140, 141 или 142 и VL с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 143 или 144.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь (HC) с

SEQ ID NO: 20, 21, 22, 150, 151 или 152.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 26, 27, 28, 153 или 154.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий HC с SEQ ID NO: 20, 21, 22, 150, 151 или 152 и LC с SEQ ID NO: 26, 27, 28, 153 или 154.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 11, 12, 13, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 132, 133, 134, 135, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163 или 164.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 60, 61 или 62.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51 и VL с SEQ ID NO: 60, 61 или 62.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь с SEQ ID NO: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь с SEQ ID NO: 82, 83 или 84.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий HC с SEQ ID NO: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73 и LC с SEQ ID NO: 82, 83 или 84.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 63, 64, 65, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 85, 86, 87, 136, 137, 138 или 139.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 94 или 95.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 98, 99 или 100.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 94 или 95 и VL с SEQ ID NO: 98, 99 или 100.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий HC с SEQ ID NO: 104 или 105.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий LC с SEQ ID NO: 108, 109 или 110.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий HC с SEQ ID NO: 104 или 105 и LC с SEQ ID NO: 108, 109 или 110.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 96, 97, 101, 102, 103, 106, 107, 111, 112 или 113.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие VH и/или VL, или их антигенсвязывающие фрагменты антител по изобретению, или тяжелую цепь и/или легкую цепь антител по изобретению, могут быть функционально связаны с одним или более регуляторными элементами, такими как промотор или энхансер, которые позволяют экспрессировать нуклеотидную последовательность в предполагаемой клетке-хозяине. Полинуклеотид может представлять собой кДНК.

В изобретении также предложен вектор, содержащий полинуклеотид по изобретению. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловируса, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, приемлемые для введения полинуклеотида по изобретению в данный организм или в данное генетическое окружение каким-либо образом. Например, полинуклеотиды, кодирующие переменные области легкой и/или тяжелой цепей антител по изобретению, необязательно соединенные с константными областями, встроены в экспрессионные векторы. Легкую и/или тяжелую цепи можно клонировать в одном или в разных экспрессионных векторах. Участки ДНК, кодирующие VH, VL, HC и/или LC, или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть функционально связаны с управляющими последовательностями в экспрессионном(ых) векторе(ах), который(ые) обеспечивает(ют) экспрессию полипептидов. К таким управляющим последовательностям относятся сигнальные последовательности, промоторы (например, естественно ассоциированные или гетерологичные промоторы), энхансерные элементы и последовательности терминации транскрипции, и их выбирают так, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии антитела. После введения вектора в соответствующего хозяина проводят инкубацию хозяина в условиях, приемлемых для высокоуровневой экспрессии белков, кодируемых введенными полинуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 11 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 12 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 12 и/или по-



полинуклеотид с SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 25 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 25 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 164.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 160 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 161 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 162 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 160 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 164.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 161 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 164.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 162 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 164.

Как правило, приемлемые экспрессионные векторы могут реплицироваться в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат селективные маркеры, такие как вызывающие резистентность к ампициллину, резистентность к гигромицину, резистентность к тетрациклину, резистентность к канамицину или резистентность к неомицину, чтобы обеспечивать обнаружение таких клеток, трансформированных желаемыми последовательностями ДНК. Для экспрессии в клетках рекомбинантных белков, таких как антитела, можно использовать систему глутаминсинтетазы.

Приемлемые промоторные и энхансерные элементы известны в данной области. Примеры промоторов для экспрессии в эукариотической клетке включают в себя промоторные и энхансерные элементы генов легкой и/или тяжелой цепей иммуноглобулинов; немедленно-ранний промотор цитомегаловируса; промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса; ранние и поздние промоторы SV40; промотор, присутствующий в длинных концевых повторах ретровируса; промотор мышинового металлотионеина-I и различные тканеспецифические промоторы, известные в данной области. Выбор подходящего вектора и промотора вполне соответствует уровню обычного специалиста в данной области.

Специалистам в данной области известны большие количества приемлемых векторов и промоторов; многие из них коммерчески доступны для создания рекомбинантных конструктов. Следующие векторы представлены в качестве примера. Бактериальные: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, Ла-Холья, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США); pTc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция). Эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia), pEE6.1 и pEE14.1 (Lonza).

В изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая один или более векторов по изобретению. Термин "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую был встроен вектор. Следует понимать, что термин "клетка-хозяин" служит для обозначения не только конкретной заявленной клетки, но и потомства такой клетки, а также стабильной клеточной линии, полученной из конкретной заявленной клетки. Так как в последующих поколениях могут возникать некоторые модификации вследствие либо мутации, либо воздействий среды, такое потомство может быть неидентичным исходной клетке, но оно также может быть охвачено термином "клетка-хозяин", используемым в настоящем документе. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, прокариотические, растительные клетки или клетки архей.

Кишечная палочка (*Escherichia coli*), бациллы, такие как сенная палочка (*Bacillus subtilis*), и другие энтеробактерии, такие как сальмонеллы, серратия и различные виды псевдомонад, являются примерами прокариотических клеток-хозяев. Для экспрессии также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Сахаромицеты (например, *S.cerevisiae*) и пихии являются примерами приемлемых дрожжевых клеток-хозяев. Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышинные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, США, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают в себя линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHO-K1SV (Lonza Biologics, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

В изобретении также предложен способ продуцирования антитела по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях экспрессии антитела и выделение антитела,

продуцированного клеткой-хозяином. Известны способы получения антител и их очистки. После синтеза (химического либо рекомбинантного) полные антитела, их димеры, отдельные легкие и/или тяжелые цепи или другие фрагменты антител, такие как VH и/или VL, можно очищать в соответствии со стандартными процедурами, включающими осаждение сульфатом аммония, применение аффинных колонок, колоночную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), электрофорез в геле и т.п. (по существу, см. Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982)). Заявленное антитело может быть по существу чистым, например чистым на по меньшей мере от около 80 до 85%, чистым на по меньшей мере от около 85 до 90%, чистым на по меньшей мере от около 90 до 95%, чистым на по меньшей мере от около 98 до 99% или более, например не содержащим загрязнителей, таких как клеточный дебрис, макромолекулы и т.д., отличные от заявленного антитела.

В изобретении также предложен способ продуцирования антитела, специфически связывающего PD-1, включающий

объединение в экспрессионном векторе первого полинуклеотида, кодирующего VH антитела, и второго полинуклеотида, кодирующего VL антитела;

трансформацию этим экспрессионным вектором клетки-хозяина;

культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, в которых экспрессируются VL и VH и образуется антитело; и

выделение антитела из клетки-хозяина или культуральной среды.

Полинуклеотиды, кодирующие определенные последовательности VH или VL по изобретению, могут быть включены в векторы с применением стандартных способов молекулярной биологии. Трансформацию клетки-хозяина, культивирование, экспрессию и очистку антитела выполняют с применением хорошо известных способов.

Фармацевтические композиции/введение.

В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела или их антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения возможно получение антител по изобретению в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество антител в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или несущей среде, с которыми вводят антитело по изобретению. Такие несущие среды могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно применять 0,4%-ный солевой раствор и 0,3%-ный раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH и буферные агенты, стабилизирующие, загущающие, увлажняющие и окрашивающие агенты и т. д. Концентрация антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению в таком фармацевтическом составе может варьировать от менее около 0,5%, обычно по меньшей мере около 1%, и до 15 или 20 мас.%, и может выбираться преимущественно на основании необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т.д. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Приемлемые несущие среды и составы, включающие другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см., в особенности стр. 958-989.

Способом введения для терапевтического применения антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению может служить любой приемлемый путь доставки антитела пациенту, такой как парентеральное введение, например внутрикожное, внутримышечное, внутривенное, внутривенное или подкожное, легочное, чресслизистое (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), в виде состава в таблетке, капсуле, растворе, порошке, геле, частице; и введение антитела, содержащегося в шприце, имплантированном устройстве, осмотическом насосе, картридже, микронасосе или же с помощью других средств, которые хорошо известны в данной области и очевидны для квалифицированного специалиста. Локализованное введение можно обеспечить, например, посредством доставки в опухоль, в сустав, бронхи, брюшную полость, капсулу, хрящ, полость, мозжечок, желудочек мозга, толстую кишку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, полость живота, плевру, предстательную железу, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, внутрь мочевого пузыря, поврежденную ткань, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению можно также вводить профилактически с целью снижения риска развития аутоиммунного заболевания и/или отсрочки появления симптомов.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты этих антител по изобретению могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в приемлемом носителе перед применением. Была доказана эф-

фективность этого метода для стандартных белковых препаратов, с ним также можно использовать хорошо известные методики лиофилизации и восстановления.

Способы и варианты применения.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению применяют в диагностике *in vitro* и *in vivo*, а также для лечения и профилактики. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению можно вводить в клетки в культуре *in vitro* или *ex vivo*, или пациенту в целях лечения, профилактики и/или диагностики различных заболеваний, таких как иммунное расстройство или любые состояния, при которых желательным является ослабление активности Т-клеток, экспрессирующих PD-1, и/или снижение иммунного ответа.

В изобретении также предложен способ подавления у пациента активации Т-клетки, экспрессирующей PD-1, включающий введение пациенту выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению в течение времени, достаточного для подавления активации Т-клетки, экспрессирующей PD-1.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая PD-1 Т-клетка представляет собой антиген-специфическую Т-клетку CD4<sup>+</sup>.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая PD-1 Т-клетка представляет собой антиген-специфическую Т-клетку CD8<sup>+</sup>.

Термин "подавлять активацию" относится к способности антител, предложенных в настоящем документе, ингибировать активацию экспрессирующих PD-1 Т-клеток, например ингибировать пролиферацию или продукцию IFN- $\gamma$  антиген-специфическими Т-клетками CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup>. Антитело подавляет активацию экспрессирующих PD-1 Т-клеток, если антитело ингибирует пролиферацию или продукцию IFN- $\gamma$  антиген-специфическими Т-клетками CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> на 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% больше, чем в отсутствие антитела (например, в сравнении с отрицательным контролем), или если ингибирование является статистически значимым по сравнению с ингибированием в отсутствие антитела.

Экспрессирующая PD-1 Т-клетка может быть расположена в непосредственной близости от места ненадлежащего воспалительного ответа. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут подавлять активацию Т-клеток, экспрессирующих PD-1, усиливая нижележащую сигнализацию PD-1, что приводит к ингибированию сигнализации TCR и ингибированию активации, пролиферации и/или выживаемости Т-клеток. В альтернативном варианте осуществления антитела по изобретению могут опосредовать уничтожение PD-1-положительных Т-клеток через опосредованные антителами эффекторные функции ADCC, ADCP и/или CDC.

Также предложен способ снижения иммунного ответа, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению для снижения иммунного ответа.

Также предложен способ лечения иммунного расстройства, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению для лечения иммунного расстройства.

Иммунное расстройство может быть хроническим или острым, например хроническое воспалительное заболевание или острое воспалительное заболевание.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой артрит, ревматоидный артрит, астму, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), воспалительное заболевание тазовых органов, болезнь Альцгеймера, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Пейрони, целиакию, заболевание желчного пузыря, пилонидальную болезнь, перитонит, псориаз, псориатический артрит, васкулит, хирургические спайки, инсульт, диабет I типа, болезнь Лайма, менингоэнцефалит, аутоиммунный увеит, рассеянный склероз, волчанку (такую как системная красная волчанка), синдром Гийена - Барре, атопический дерматит, аутоиммунный гепатит, фиброзирующий альвеолит, базедову болезнь, обусловленную IgA нефропатию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, болезнь Меньера, пузырчатку, первичный билиарный цирроз, саркоидоз, склеродермию, гранулематоз Вегенера, другие аутоиммунные расстройства, панкреатит, травму (хирургическая операция), реакцию "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата, болезни сердца, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероз, внутрисосудистую коагуляцию, резорбцию костной ткани, остеопороз, остеоартрит, периодонтит и гипохлоргидрию, бесплодие, связанное с отсутствием толерантности плода к матери, синдром Шегрена, витилиго, миастению гравис или системную склеродермию.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой ревматоидный артрит.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина".

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой артрит.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой астму.

- В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой ХОБЛ.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой воспалительное заболевание тазовых органов.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой воспалительное заболевание кишечника.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой болезнь Крона.
- В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой язвенный колит.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой болезнь Пейрони.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой целиакию.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой заболевание желчного пузыря.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой пилонидальную болезнь.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой перитонит.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой псориаз.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой псориатический артрит.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой васкулит.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой хирургическую спайку.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой инсульт.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой диабет I типа.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой болезнь Лайма.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой менингоэнцефалит.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой аутоиммунный увеит.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой рассеянный склероз.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой волчанку.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой системную красную волчанку.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой синдром Гийена-Барре.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой атопический дерматит.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой аутоиммунный гепатит.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой фиброзирующий альвеолит.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой базедову болезнь.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой обусловленную IgA нефропатию.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой болезнь Менъера.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой пузырчатку.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой первичный билиарный цирроз.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой саркоидоз.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой склеродерму.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой гранулематоз Вегенера.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой панкреатит.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой отторжение трансплантата.
- В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой болезнь сердца, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой атеросклероз.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой внутрисосудистую коагуляцию.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой резорбцию костной ткани.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой остеопороз.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой остеоартрит.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой периодонтит.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой гипохлоридрию.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой синдром Шегрена.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой витилиго.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой миастению гравис.

В некоторых вариантах осуществления иммунное расстройство представляет собой системную склеродермию.

Также предложен способ лечения боли, связанной с воспалением, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению для лечения боли, связанной с воспалением.

В изобретении также предложено антитело по изобретению, которое специфически связывается с PD-1, для применения в терапии.

В изобретении также предложено антитело по изобретению, которое специфически связывается с PD-1, для лечения иммунного расстройства.

В изобретении также предложено антитело по изобретению, которое специфически связывается с PD-1, для лечения ревматоидного артрита.

В изобретении также предложено антитело по изобретению, которое специфически связывается с PD-1, для лечения волчанки, такой как системная красная волчанка.

В изобретении также предложено антитело по изобретению, которое специфически связывается с PD-1, для лечения реакции "трансплантат против хозяина".

В изобретении также предложено применение антитела по изобретению, которое специфически связывается с PD-1, при создании лекарственного средства для лечения или профилактики иммунного расстройства.

Комбинированные терапии.

Антитела, предложенные в настоящем документе, можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

Второй терапевтический агент может представлять собой любое известное средство терапии аутоиммунных расстройств, таких как аутоиммунные или воспалительные заболевания, включая любой агент или комбинацию агентов, польза которых известна, или которые использовались или в настоящее время используются для лечения этих заболеваний. Такие средства терапии и терапевтические агенты включают в себя хирургию или хирургические процедуры (например, спленэктомия, лимфаденоэктомия, тироидэктомия, плазмаферез, лейкофорез, трансплантация клеток, тканей или органов, процедуры на кишечнике, перфузия органов и т. п.), радиационную терапию, такую терапию, как стероидная и нестероидная терапия, гормональная терапия, цитокиновая терапия, терапия дерматологическими агентами (например, агентами для местного применения, используемыми для лечения кожных патологий, таких как аллергии, контактный дерматит и псориаз), иммуносупрессорная терапия и терапия другими противовоспалительными моноклональными антителами.

Второй терапевтический агент может представлять собой кортикостероид, противомалярийное лекарственное средство, иммунодепрессант, цитотоксическое лекарственное средство или модулятор В-клеток.

В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой преднизон, преднизолон, метилпреднизолон, дефлазкорт, гидроксихлорохин, азатиоприн, метотрексат, циклофосфамид, микофенолата мофетил (ММФ), микофенолат натрия, циклоспорин, лефлуномид, такролимус, RITUXAN® (ритуксимаб) или BENLYSTA® (белimumаб).

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом. К примерам вторых терапевтических агентов относятся кортикостероиды, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), салицилаты, гидроксихлорохин, сульфасалазин, цитотоксические препараты, иммуносупрессорные лекарственные средства, иммуномодулирующие антитела, метотрексат, циклофосфамид, мизорибин, хлорамбуцил, циклоспорин, такролимус (FK506; Prograf®), микофенолата мофетил и азатиоприн (6-меркаптопурин), сиролимус (рапамицин), дезоксипергуалин, лефлуномид и его малонитрилоамидные аналоги; антитела к CTLA4 и гибридные Ig, антитела к стимуляторам В-лимфоцитов (например, LYMPHOSTAT-BTM) и гибридные белки CTLA4-Ig (BLyS-

Ig), антитела к CD80, анти-T-клеточные антитела, такие как антитела к CD3 (ОКТ3), антитела к CD4, кортикостероиды, такие как, например, клобетазол, галобетазол, гидрокортизон, триамцинолон, бетаметазон, флуоцинол, флуоцинонид, преднизон, преднизолон, метилпреднизолон; нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), такие как, например, сульфасалазин, содержащие мезаламин лекарственные средства (известные как агенты 5-ASA), цефекоксиб, диклофенак, этодолак, фенпрофен, флурбипрофен, ибупрофен, кетопрофен, меклофамат, мелоксикам, набуметон, напроксен, оксапрозин, пироксикам, рофекоксиб, салицилаты, сулиндак и толметин; ингибиторы фосфодиэстеразы-4, антитела к TNF $\alpha$  REMICADE® (инфликсимаб), SIMPONI® (голимумаб) и HUMIRA® (адалimumаб), талидомид или его аналоги, такие как леналидомид.

Антитела по изобретению можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом одновременно, последовательно или отдельно.

Эффективность лечения ревматоидного артрита можно оценивать, используя эффективность, измеренную по клиническим ответам, определяемым критериями Американского колледжа ревматологии (American College of Rheumatology), критериями Европейской лиги против ревматизма или любыми другими критериями. См., например, Felson et al. (1995) *Arthritis Rheum.* 38: 727-35 и van Gestel et al. (1996) *Arthritis Rheum.* 39: 34-40.

Хотя изобретение описано в общих чертах, варианты осуществления изобретения будут дополнительно описаны в следующих примерах, которые не следует толковать как ограничивающие объем формулы изобретения.

Пример 1. Способы.

Измерения аффинности посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Измерения аффинности проводили с использованием системы ProteOn XPR36.

(BioRad). Биосенсорную поверхность готовили путем связывания антитела к Fc человеческого IgG (Jackson кат. № 109-005-098) с модифицированной слоем альгинатного полимера поверхностью чипа GLC (BioRad, кат. № 176-5011) с использованием инструкций производителя по проведению химической реакции аминного сочетания. Было иммобилизовано приблизительно 5000 отвечающих единиц (RU) mAb. Кинетические эксперименты выполняли при 25°C в подвижном буферном растворе (DPBS+0,01% полисорбат P20+100 мкг/мл BSA). Для проведения кинетических экспериментов иммобилизовали 200 RU mAb с последующим введением аналитов (PD-1 человека и яванского макака) в концентрациях в диапазоне от 1,563 нМ до 400 нМ (4-кратные последовательные разведения). Фазу ассоциации отслеживали в течение 3 минут при 50 мкл/мин с последующим 10 или 15-минутным пропуском потока буферного раствора (фаза диссоциации). Поверхность чипа регенерировали двумя 18-секундными импульсами 100 мМ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, кат. № 7961) при 100 мкл/мин.

Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения ProteOn Manager. Сначала корректировали данные по отношению к фону, используя промежуточные участки. Впоследствии выполняли двойное вычитание эталона данных посредством введения буферного раствора вместо введения аналитов. Кинетический анализ данных выполняли, используя модель связывания Ленгмюра 1:1. Результат для каждого mAb регистрировали в формате K<sub>a</sub> (скорость ассоциации), K<sub>d</sub> (скорость диссоциации) и K<sub>D</sub> (равновесная константа диссоциации).

Ингибирование антиген-специфических T-клеток. Анализ индуцированной цитомегаловирусом (CMV) активации мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) ("CMV-PBMC").

Использовали анализ специфического вторичного ответа на CMV с целью оценки способности созданных антител ингибировать активацию T-клеток, которую измеряли по ингибированию пролиферации клеток при обработке реагирующих на CMV донорских PBMC смесью пептидов CMV (JPT Technologies).

По данным соответствующих поставщиков, PBMC (Astarte Biologics, NemaCare, Precision for Medicine) реагировали на антигены CMV. Замороженные флаконы с PBMC приобретали у поставщиков и хранили в жидком азоте. В день эксперимента размораживали аликвоту замороженных PBMC и клетки ресуспендировали в 10 мл среды для анализа (RPMI-1640/Glutamax/HEPES, содержащей 1% пенициллина/стрептомицина, 1% натрия пирувата, 1% заменимых аминокислот (NEAA), 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (все реактивы приобретены в Thermo Fisher Scientific). Клетки центрифугировали при 200 g в течение 15 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 10 мл среды для анализа и центрифугировали при 250 g в течение 10 мин. После центрифугирования клетки ресуспендировали в 10 мл среды для анализа, пропускали через фильтр 70 мкм и подсчитывали. Концентрацию клеток доводили до 1,5×10<sup>6</sup> клеток/мл или 2×10<sup>6</sup> клеток/мл и клетки наносили по 100 мкл/лунка на обработанные тканевой культурой 96-луночные круглодонные планшеты (Corning). Плотность клеток для посева была специфичной для донора и была определена в предварительных экспериментах для максимального увеличения окна анализа. Смесью пептидов CMV готовили в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце 40 мкл диметилсульфоксида (DMSO) (Sigma) добавляли во флакон, содержащий 25 мкг лиофилизированного порошка смеси пептидов CMV, и осторожно пипетировали для растворения реагента. Маточный раствор смеси

пептидов CMV в DMSO разводили в фосфатно-солевом буфере (PBS) для получения раствора 50 мкг/мл и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Дополнительное разведение выполняли с помощью среды для анализа до четырехкратной конечной концентрации и в каждую стимулированную лунку добавляли по 50 мкл раствора пептидов CMV; а в нестимулированные контрольные лунки одновременно вводили среду без добавок. Конечная концентрация была оптимизирована для определенных донорских РВМС в предварительных экспериментах (0,1-0,2 мкг/мл). Антитело к PD-1 добавляли в одной дозе 10 мкг/мл, последовательно разведенной средой для анализа до четырехкратной конечной концентрации, и в каждую лунку добавляли по 50 мкл разведенного раствора антитела, тогда как в контрольные лунки "без антитела" вводили по 50 мкл среды. Планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 6 дней. После инкубации из каждой лунки отбирали 100 мкл супернатанта и в каждую лунку добавляли по 100 мкл среды для анализа, содержащей 1 мКи/лунка метил-3Н-тимидина (PerkinElmer), и планшеты инкубировали в течение 6 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки собирали на планшеты Unifilter-96, GF/C (PerkinElmer), которые оставляли сушиться в течение ночи при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли по пятьдесят мкл реактива Microscint-20 (PerkinElmer). Планшеты запечатывали и проводили подсчет с помощью прибора TopCount NXT (PerkinElmer).

Ингибирование кластеризации клеток для определения способности антител к блокированию лиганд-рецепторного взаимодействия.

Для оценки способности созданных антител ингибировать в клеточном контексте взаимодействие рецептора и лиганда, которую определяли количественно по ингибированию кластеризации клеток методом проточной цитометрии, применяли анализ смеси 1:1 эмбриональных почечных клеток человека (НЕК) со сверхэкспрессией PD-1 (клетки PD-1-НЕК), или PD-1-лиганда PD-L1 (PD-L1-НЕК), или PD-L2 (клетки PD-L2-НЕК).

Клетки НЕК, сверхэкспрессирующие человеческий PD1 (Crown Bio), метили красителем Violet Cell Trace (Life Technologies). Клетки НЕК, сверхэкспрессирующие PD-L1 или PD-L2 яванского макака, метили красителем Far Red Cell Trace Stain (Life technologies). Вкратце красители солибилизировали в 20 мкл DMSO с получением 5 мМ раствора, затем 5 мкл разводили в 10 мл PBS с получением 2,5 мМ раствора. Клетки подсчитывали и  $50 \times 10^6$  клеток центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Клетки однократно промывали в PBS и  $1 \times 10^6$  клеток оставляли в качестве неокрашенных контролей. После повторного центрифугирования супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в соответствующих растворах красителей, описанных выше, и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 4 мл ледяной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) и инкубировали в течение еще 5 мин. Затем клетки центрифугировали, как описано выше, один раз промывали в буфере для анализа (PBS, 10% FBS, 1 мМ EDTA), снова центрифугировали, аспирировали супернатант, затем каждый тип клеток ресуспендировали в буфере для анализа в концентрации  $3 \times 10^6$  клеток/мл. Исследуемые антитела разводили в три раза до конечной желаемой концентрации (60 мкг/мл) в буфере для анализа. Для получения конечных проб клеток/антител (в трех повторностях) 100 мкл клеток PD-1-НЕК смешивали с 100 мкл антитела. После 10-минутной инкубации добавляли 100 мкл клеток PD-L1-НЕК или PD-L2-НЕК и конечные смешанные пробы инкубировали на льду в течение как минимум одного часа. В конце добавляли 5 мкл пропиций-йодида и пробы осторожно перемешивали, переносили в полистироловые круглодонные пробирки и анализировали на проточном цитометре LSRII (BD Biosciences). После гейтирования событий по живым клеткам определяли процентную долю двойных положительных событий для каналов Pacific Blue и APC с помощью программного обеспечения FlowJo и строили графики в GraphPad Prism 6. Уровень кластеризации, измеренный по процентной доле двойных положительных событий для mAb к PD-1 сравнивали с положительными и отрицательными изотипическими контрольными антителами.

Группы эпитопов по Octet.

Группирование антител по эпитопам с помощью анализа конкурентного связывания проводили на платформе Octet Red384 (Forte Bio), основанной на интерферометрии биослоя. Данная методика измеряет связывание исходного антитела с биодатчиком, покрытым PD-1, по сдвигу длины волны, обусловленному тем, что связанное антитело увеличивает оптическую плотность наконечника биодатчика с течением времени. Если коротко, меченный гистидином антиген PD-1 наносили на датчики HIS. Затем датчики подвергали воздействию 20 мкг/мл первичного антитела к PD-1 с последующим воздействием равной концентрации второго антитела к PD-1. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ForteBio Data Analysis. Дополнительное связывание со вторым антителом после насыщения первым антителом указывает на одновременное связывание двух антител, что обязательно означает уникальные, не перекрывающиеся эпитопы. Альтернативно отсутствие дополнительного связывания указывает на то, что два антитела конкурируют за связывание с антигеном PD-1.

Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC).

Активация человеческих Т-клеток памяти (клеток-мишеней).

Замороженные аликвоты человеческих Т-клеток памяти (AllCells LLC) размораживали на водяной бане при 37°C и ресуспендировали в 40 мл культуральной среды (RPMI+10% FBS или 5% HuSAB+50

мкМ  $\beta$ ME (1:1000) + 1% GlutaMax+10 мМ Нерес. Клетки центрифугировали при 250 g в течение 15 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 10 мл культуральной среды и центрифугировали при 250 g в течение 10 мин. После центрифугирования клетки ресуспендировали в 10 мл среды для анализа и подсчитывали. Концентрацию клеток доводили до  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл и 10 мл клеточной суспензии переносили на планшеты для культивирования тканей, предварительно покрытые антителом к CD3 (eBioscience, 5 мкг/мл в PBS, 1 ч при 37°C). В культуральную среду добавляли 2 мкг/мл антитела к CD28 (eBioscience) и коктейль цитокинов IL-2, IL-15 и IL-7 (R&D systems и Peprotech) в концентрации 100 нг/мл. Предварительные эксперименты показали, что экспрессия PD-1 достигла пикового значения на 5 день после активации, и, следовательно, этот момент времени был выбран для анализа. В качестве контроля также использовали недавно выделенные покоящиеся Т-клетки памяти (не активированные стимуляцией CD3/CD28), поскольку они экспрессируют низкие уровни PD-1.

Получение эффекторных клеток (NK92.CD16 и PBMC).

Клетки NK-92 выращивали во флаконах для тканевой культуры, которые хранили в вертикальном положении, при плотности  $0,5-1,0 \times 10^6$  клеток/мл в 40 мл среды (Myelocult H5100 (StemCell Technologies), 1X пируват натрия/неосновные аминокислоты/Pen Strep (Invitrogen), 4 мкМ гидрокортизона (StemCell Technologies), 100 нг/мл rhIL-2 (R&D Systems)). Замороженные клетки PBMC (Hemacare) размораживали за день до эксперимента и ресуспендировали в среде XVIVO-10 (Lonza), 10% HI FBS (Invitrogen) и 100 нг/мл IL2 (R&D Systems). Клетки центрифугировали при 250 g в течение 15 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 10 мл культуральной среды и центрифугировали при 250 g в течение 10 мин. После центрифугирования клетки ресуспендировали в 10 мл культуральной среды и подсчитывали. Концентрацию клеток довели до  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл, и требуемое число клеток нанесли на чашку для культивирования тканей (TC).

В день проведения анализа клетки PBMC и NK собирали и ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^7$  клеток/мл и  $4 \times 10^6$  клеток/мл соответственно в среде для анализа (RPMI, 10% FBS, 1 мМ пирувата натрия, 0,1 мМ NEAA). Т-клетки памяти промывали один раз, ресуспендировали в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл и маркировали 6 мкл BATDA (Perkin Elmer) на мл клеток при 37°C в течение 30 мин. Меченые BATDA клетки трижды промывали избытком холодной среды для анализа и доводили плотность до  $0,2 \times 10^6$  клеток/мл. Готовили серийные разведения исследуемых mAb, начиная с 20 мкг/мл, в среде для анализа (100 мкл, двукратная конечная концентрация) на 96-луночных планшетах для анализа с U-образным дном. Меченые BATDA клетки-мишени (50 мкл) добавляли в количестве  $0,2 \times 10^6$  клеток/мл и инкубировали с исследуемыми mAb. PBMC (50 мкл) добавили в концентрации  $1 \times 10^7$  клеток/мл с получением соотношения 50:1 эффекторные клетки:клетки-мишени, тогда как NK-клетки (50 мкл) добавляли в концентрации  $4 \times 10^6$  клеток/мл с получением соотношения 20:1 эффекторные клетки:клетки-мишени. Контрольные лунки с максимальным лизисом, содержащие меченые клетки-мишени и 20 мкл 2% Triton X-100, готовили в трех повторностях. Также в трех повторностях готовили контрольные лунки с минимальным лизисом (фоновое высвобождение BATDA), содержащие меченые клетки-мишени в среде для анализа. Конечный объем во всех лунках планшета для анализа составил 200 мкл. Содержимое лунок осторожно перемешали пипеткой. Планшеты центрифугировали в течение непродолжительного времени и инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> в течение 2,5 ч. После инкубации клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 5 мин. Супернатанты (30 мкл) переносили в 96-луночные белые непрозрачные планшеты Nunc (ThermoFisher, 136101), содержащие 200 мкл европейского раствора (PerkinElmer, C135-100). Планшеты закрывали для защиты от света и перемешивали в течение 15 мин на шейкере. Пробы считывали на сканере Envision MultiLabel Reader (PerkinElmer). Процентную долю лизиса рассчитывали следующим образом:  $100 \times (\text{высвобождение в эксперименте} - \text{высвобождение фоновое}) / (\text{высвобождение максимальное} - \text{высвобождение фоновое})$ .

Комплементозависимая цитотоксичность (CDC).

Замороженные аликвоты человеческих общих Т-клеток (Biological Specialty, LSII 49301C) размораживали на водяной бане при 37°C и ресуспендировали в 40 мл предварительно подогретой среды RPMI 1640+Glutamax+25 мМ НЕРЕС (Life Technologies, кат. № 72400-047)+10% FBS (Gibco, 160000-36). Клетки центрифугировали при 250 g в течение 5 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 10-20 мл среды и подсчитывали. Человеческие общие Т-клетки (Biological Specialty, LSII 49301C) активировали в течение 5-6 дней до анализа CDC с помощью гранул Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads™ (Life Technologies, кат. № 11132D). Вкратце 75 мкл предварительно промытых гранул Dynabeads смешивали с Т-клетками  $6,0 \times 10^6$  клеток/флакон, добавляли к T175 в 10-20 мл среды и инкубировали в течение 6 дней при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Через 6 дней из смеси удалили гранулы с помощью магнитов EasySep™ (STEMCELL Technologies, 18000).

При подготовке к анализам на CDC клетки центрифугировали при 250 g в течение 5 мин при комнатной температуре. После центрифугирования супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 10 мл бессывороточной культуральной среды и подсчитывали. Концентрацию клеток доводили до  $1,6 \times 10^6$  клеток/мл в бессывороточной среде и сеяли по 50 мкл/лунка на 96-луночные планшеты с U-образным дном

(Falcon, 353077). Исследуемые антитела последовательно одиннадцать раз разводили в соотношении 1:3 в бессывороточной среде, начиная с концентрации 25 мкг/мл (трехкратная). В соответствующие лунки с клетками-мишенями добавляли исследуемые антитела по 50 мкл/лунка. В лунки для фона и контроля лизирования добавляли бессывороточную среду по 50 мкл/лунка. Планшеты закрывали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (комн. темп.). В исследуемые лунки добавляли по 50 мкл/лунка 10% (трехкратный) кроличий комплемент (Invitrogen, 31038-100), разведенный в бессывороточной среде. В лунки для фона добавляли бессывороточную среду по 50 мкл/лунка. В лунки контроля лизиса добавляли 2% Triton-X в бессывороточной среде по 50 мкл/лунка. Планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 60 мин. Клетки центрифугировали при 250 g в течение 5 мин. Удаляли по 50 мкл супернатанта из лунки и переносили в 96-луночные плоскодонные планшеты для спектроскопии в УФ- и видимой области (Corning, 3635). В каждый образец добавляли по 50 мкл/лунка реагента для обнаружения лактатдегидрогеназы (LDG) (Roche, 11-644-793-001); планшеты закрывали и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Поглощение определяли при 490 нм и 650 нм на спектрофотометре SpectraMax Plus M5 (Molecular Devices). Статистический анализ проводили с использованием Microsoft Excel и GraphPad Prism 6. Поглощение при 650 нм вычитали из значения при 490 нм для нормализации по мутности. Процент (%) цитотоксичности определяли для каждого образца с использованием следующей формулы:

$$(\text{экспериментальное значение}-\text{низкий контроль})/(\text{высокий контроль}-\text{низкий контроль})\times 100,$$

где "высокий контроль" представляет собой среднее значение в лунках контроля лизиса с Triton-X, а "низкий контроль" представляет собой среднее значение для контрольных лунок фона (только среда). Использовали модель аппроксимации при помощи четырехпараметрической логистической кривой, [зависимость log(агониста) от ответа - переменный наклон (четыре параметра)], в GraphPad Prism для зависимости log<sub>10</sub> концентрации антитела от вычисленного % цитотоксичности. Пробы анализировали в двух повторностях и анализ проводили дважды.

Для подтверждения целевой экспрессии уровня PD-1 на активированных человеческих общих Т-клетках измеряли методом проточной цитометрии на 5- или 6-й день после активации. Вкратце Т-клетки центрифугировали при 250 g в течение 5 мин и ресуспендировали в концентрации  $1\times 10^6$  клеток/мл в буферном растворе BSA Stain Buffer (BD Biosciences, 554657). 100-200 тыс. клеток инкубировали в 100 мкл общего объема с насыщающими концентрациями антител к PE-PD-1 (Biolegend, 329906). Клетки дважды промывали буфером BSA Stain Buffer и ресуспендировали в равном объеме буфера, содержащего краситель DRAQ7 для живых/мертвых клеток (Cell Signaling Technology, 7406S). Медианную интенсивность флуоресценции регистрировали для 5 тыс. событий живых клеток на проточном цитометре MACSQuant Analyzer 10. Уровни рецепторов определяли с использованием стандартной кривой, созданной с помощью гранул Quantibrite™ PE Beads (BD, 340495), и выражали в виде количества связанных антител на клетку.

Пример 2. Получение агонистических антител, которые специфически связываются с PD-1, и их структурная характеристика.

Три мыши Balb/c и три мыши С3Н иммунизировали внеклеточным доменом (ECD) человеческого PD-1 (SEQ ID NO: 1), конъюгированным с Fc (huPD-1-Fc), и получали гибридомы с использованием стандартных протоколов. Гибридомы подвергали скринингу с помощью ИФА на связывание с рекомбинантным PD-1 (ECD). Попаданиями считали пробы, дающие сигнал ИФА более чем в пять раз превышающий усредненное значение отрицательного контроля. Позитивные клоны подвергали перекрестному скринингу относительно нерелевантного гибридного белка Fc и относительно связывания с мышинным PD-1. Супернатанты из клонированных из одиночной клетки гибридом тестировали на связывание с белком PD-1 человека и яванского макака. Попаданиями считали сигнал, превышающий средний показатель отрицательных контролей+3 станд. откл.

Выбранные мышинные антитела клонировали в человеческий IgG<sub>1</sub> в виде химерных mAb и тестировали на способность ингибировать антиген-специфическую Т-клеточную активацию в анализе вторичного ответа на CMV в соответствии с протоколом, описанным в примере 1 (анализ CMV-РВМС). На фиг. 1А и 1В показано, что большинство исследованных антител ингибировало пролиферацию Т-клеток с уровнем свыше 50% или более. PD1B199 представляет собой антагонистическое mAb к PD-1. CNT03930: изотипический контроль.

**SEQ ID NO: 1 PD-1 ECD**

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQ  
TDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRTVQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQI  
KESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV

**SEQ ID NO: 131 FL зрелый PD-1**

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQ  
TDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRTVQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQI  
KESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVGGLLGSLLVWVLAVICS  
RAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVF  
PSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

Пример 3. Гуманизация антител к PD-1.

Несколько исходных антител, включая PD1B505, PD1B506 и PD1B512, подвергли гуманизации. Чтобы найти наилучшую комбинацию гуманизированных VH и VL, для каждого из антител отобрали одну или более последовательностей V-области тяжелой и легкой цепей зародышевой линии человека. Человеческие J-сегменты для VL и VH каждого исходного антитела выбирали путем сравнения исходной последовательности J-сегментов с человеческими последовательностями J-сегментов для максимального повышения идентичности последовательностей. Все гуманизированные пары VH/VL каждого антитела изготовили и протестировали в матриксе в виде неочищенных супернатантов для связывания антигена и экспрессии белка. На основании этих данных очистили антитела, демонстрирующие сопоставимое или более высокое связывание с PD-1, чем у исходного мышинового антитела, и протестировали их на эффективность в анализе CMV-PBMC.

Полученные антитела проанализировали на возможные нежелательные риски посттрансляционной модификации. Высокорисковые мотивы деамидирования, расположенные в CDR, и свободные цистеины в любом месте антитела удаляли путем мутагенеза и полученные антитела тестировали на их связывание с PD-1 и эффективность в анализе CMV-PBMC.

Гуманизированные антитела и их варианты клонировали в виде IgG<sub>1</sub>.

В табл. 3 показаны созданные антитела. В табл. 4 показаны номера SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей областей VH, VL, HC и LC антител. В табл. 5 показаны номера SEQ ID NO для полинуклеотидных последовательностей, кодирующих области VH, VL, HC и LC антител. В табл. 6 показаны номера SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей областей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител. В табл. 7 показаны аминокислотные последовательности областей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 антител. В табл. 8 показаны аминокислотные последовательности областей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител. В табл. 9 показаны аминокислотные последовательности областей VH и VL антител. В табл. 10 показаны полинуклеотидные последовательности, кодирующие области VH антител. В табл. 11 показаны полинуклеотидные последовательности, кодирующие области VL антител. В табл. 12 показаны аминокислотные последовательности области HC. В табл. 13 показаны аминокислотные последовательности области LC. В табл. 14 показаны полинуклеотидные последовательности, кодирующие области HC антител. В табл. 15 показаны полинуклеотидные последовательности, кодирующие области LC антител.

Таблица 3

mAb	Происхождение антитела	Название VH	Название VL
PD1B505	Исходное	PD1H93	PD1L30
PD1B742	Гуманизированное PD1B505	PD1H384	PD1L468
PD1B743	Гуманизированное PD1B505	PD1H384	PD1L469
PD1B878	C84S-вариант PD1B743	PD1H405	PD1L469
PD1B506	Исходное	PD1H90	PD1L28
PD1B750	Гуманизированное PD1B506	PD1H388	PD1L470
PD1B751	Гуманизированное PD1B506	PD1H388	PD1L471
PD1B845	G56A-вариант PD1B750	PD1H399	PD1L470
PD1B846	N55D, G56A-вариант PD1B750	PD1H400	PD1L470
PD1B847	N55Q-вариант PD1B750	PD1H401	PD1L470
PD1B848	N55K-вариант PD1B750	PD1H402	PD1L470
PD1B849	N55E-вариант PD1B750	PD1H403	PD1L470
PD1B850	G56I-вариант PD1B750	PD1H404	PD1L470
PD1B512	Исходное	PD1H81	PD1L43
PD1B756	Гуманизированное PD1B512	PD1H389	PD1L472
PD1B757	Гуманизированное PD1B512	PD1H389	PD1L473

Таблица 4

mAb	Название VH	Название VL	Аминокислотная последовательность SEQ			
			ID NO:			
			VH	VL	HC	LC
PD1B505	PD1H93	PD1L30	8	14	20	26
PD1B742	PD1H384	PD1L468	9	15	21	27
PD1B743	PD1H384	PD1L469	9	16	21	28
PD1B878	PD1H405	PD1L469	10	16	22	28
PD1B506	PD1H90	PD1L28	44	60	66	82
PD1B750	PD1H388	PD1L470	45	61	67	83
PD1B751	PD1H388	PD1L471	45	62	67	84
PD1B845	PD1H399	PD1L470	46	61	68	83
PD1B846	PD1H400	PD1L470	47	61	69	83
PD1B847	PD1H401	PD1L470	48	61	70	83
PD1B848	PD1H402	PD1L470	49	61	71	83
PD1B849	PD1H403	PD1L470	50	61	72	83
PD1B850	PD1H404	PD1L470	51	61	73	83
PD1B512	PD1H81	PD1L43	94	98	104	108
PD1B756	PD1H389	PD1L472	95	99	105	109
PD1B757	PD1H389	PD1L473	95	100	105	110

Таблица 5

mAb	Название VH	Название VL	Полинуклеотидная последовательность SEQ			
			ID NO:			
			VH	VL	HC	LC
PD1B505	PD1H93	PD1L30	11	17	23	29
PD1B742	PD1H384	PD1L468	12	18	24	30
PD1B743	PD1H384	PD1L469	12	19	24	31
PD1B878	PD1H405	PD1L469	13	19	25	31
PD1B506	PD1H90	PD1L28	52	63	74	85
PD1B750	PD1H388	PD1L470	53	64	75	86
PD1B751	PD1H388	PD1L471	53	65	75	87
PD1B845	PD1H399	PD1L470	54	64	76	86
PD1B846	PD1H400	PD1L470	55	64	77	86
PD1B847	PD1H401	PD1L470	56	64	78	86
PD1B848	PD1H402	PD1L470	57	64	79	86
PD1B849	PD1H403	PD1L470	58	64	80	86
PD1B850	PD1H404	PD1L470	59	64	81	86
PD1B512	PD1H81	PD1L43	96	101	106	111
PD1B756	PD1H389	PD1L472	97	102	107	112
PD1B757	PD1H389	PD1L473	97	103	107	113

Таблица 6

Антитело	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PD1B505	2	3	4	5	6	7
PD1B742	2	3	4	5	6	7
PD1B743	2	3	4	5	6	7
PD1B878	2	3	4	5	6	7
PD1B506	32	33	40	41	42	43
PD1B750	32	33	40	41	42	43
PD1B751	32	33	40	41	42	43
PD1B845	32	34	40	41	42	43
PD1B846	32	35	40	41	42	43
PD1B847	32	36	40	41	42	43
PD1B848	32	37	40	41	42	43
PD1B849	32	38	40	41	42	43
PD1B850	32	39	40	41	42	43
PD1B512	88	89	90	91	92	93
PD1B756	88	89	90	91	92	93
PD1B757	88	89	90	91	92	93

Таблица 7

Антитело	HCDR1 (SEQ ID NO:)	HCDR2 (SEQ ID NO:)	HCDR3 (SEQ ID NO:)
PD1B505	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID NO: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B742	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID NO: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B743	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID NO: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B878	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID NO: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B506	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 32)	EINPNNGGIN (SEQ ID NO: 33)	DYYDYGGY (SEQ ID NO: 40)
PD1B750	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 32)	EINPNNGGIN (SEQ ID NO: 33)	DYYDYGGY (SEQ ID NO: 40)
PD1B751	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 32)	EINPNNGGIN (SEQ ID NO: 33)	DYYDYGGY (SEQ ID NO: 40)
PD1B845	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 32)	EINPNNAGIN (SEQ ID NO: 34)	DYYDYGGY (SEQ ID NO: 40)
PD1B846	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 32)	EINPNDAGIN (SEQ ID NO: 35)	DYYDYGGY (SEQ ID NO: 40)
PD1B847	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 32)	EINPNQGGIN (SEQ ID NO: 36)	DYYDYGGY (SEQ ID NO: 40)
PD1B848	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 32)	EINPNKGGIN (SEQ ID NO: 37)	DYYDYGGY (SEQ ID NO: 40)
PD1B849	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 32)	EINPNEGGIN (SEQ ID NO: 38)	DYYDYGGY (SEQ ID NO: 40)
PD1B850	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 32)	EINPNNIGIN (SEQ ID NO: 39)	DYYDYGGY (SEQ ID NO: 40)
PD1B512	GFSLSTSGMGVS (SEQ ID NO: 88)	HIYWDDDKR (SEQ ID NO: 89)	KGYDYGYVMDY (SEQ ID NO: 90)
PD1B756	GFSLSTSGMGVS (SEQ ID NO: 88)	HIYWDDDKR (SEQ ID NO: 89)	KGYDYGYVMDY (SEQ ID NO: 90)
PD1B757	GFSLSTSGMGVS (SEQ ID NO: 88)	HIYWDDDKR (SEQ ID NO: 89)	KGYDYGYVMDY (SEQ ID NO: 90)

Таблица 8

Антитело	LCDR1 (SEQ ID NO:)	LCDR2 (SEQ ID NO:)	LCDR3 (SEQ ID NO:)
PD1B505	TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 5)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B742	TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 5)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B743	TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 5)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B878	TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 5)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B506	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 41)	SASYRYS (SEQ ID NO: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 43)
PD1B750	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 41)	SASYRYS (SEQ ID NO: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 43)
PD1B751	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 41)	SASYRYS (SEQ ID NO: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 43)
PD1B845	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 41)	SASYRYS (SEQ ID NO: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 43)
PD1B846	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 41)	SASYRYS (SEQ ID NO: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 43)
PD1B847	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 41)	SASYRYS (SEQ ID NO: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 43)
PD1B848	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 41)	SASYRYS (SEQ ID NO: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 43)
PD1B849	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 41)	SASYRYS (SEQ ID NO: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 43)
PD1B850	KASQNVGTNVA (SEQ ID NO: 41)	SASYRYS (SEQ ID NO: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID NO: 43)
PD1B512	RSSKLLHSGITYLN (SEQ ID NO: 91)	QMSNLAS (SEQ ID NO: 92)	AQNLELPLT (SEQ ID NO: 93)
PD1B756	RSSKLLHSGITYLN (SEQ ID NO: 91)	QMSNLAS (SEQ ID NO: 92)	AQNLELPLT (SEQ ID NO: 93)
PD1B757	RSSKLLHSGITYLN (SEQ ID NO: 91)	QMSNLAS (SEQ ID NO: 92)	AQNLELPLT (SEQ ID NO: 93)

Таблица 9

Название цепи VH или VL (SEQ ID NO)	Аминокислотная последовательность
PD1H93 (SEQ ID NO: 8)	DVQLQESGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHVVKQAPGKG LKWMGWINIETGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNPKNE
PD1H384 (SEQ ID NO: 9)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYSMHVVRQAPGQ GLEWMGWINIETGEPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQICSLKAE
PD1H405 (SEQ ID NO: 10)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYSMHVVRQAPGQ GLEWMGWINIETGEPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAE
PD1H90 (SEQ ID NO: 44)	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTTYWMHWVKQRPGQ GLEWIGEINPNNGGINYNEKFKKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSE
PD1H388 (SEQ ID NO: 45)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPNNGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLR
PD1H399 (SEQ ID NO: 46)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPNAGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLR
PD1H400 (SEQ ID NO: 47)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPDAGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLR
PD1H401 (SEQ ID NO: 48)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPNQGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLR
PD1H402 (SEQ ID NO: 49)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPNKGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLR
PD1H403 (SEQ ID NO: 50)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPNEGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLR
PD1H404 (SEQ ID NO: 51)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPNIGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLR
PD1H81 (SEQ ID NO: 94)	QVTLKESGPELLQPSQTLSTLCTFSFGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKG LEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTAD
PD1H389 (SEQ ID NO: 95)	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSFGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKAL EWLAHIYWDDDKRYSPLKSRLTITKDTSKNQVVLTMNMDPVD
PD1L30 (SEQ ID NO: 14)	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQKPKGSSPK LWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQY
PD1L468 (SEQ ID NO: 15)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLCTASSSVSSSYLHWYQKPKGLAPR LLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYH
PD1L469 (SEQ ID NO: 16)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLCTASSSVSSSYLHWYQKPKGLAPR LLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCHQYH
PD1L28 (SEQ ID NO: 60)	DIVMTQSQKFMSTSVRDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQKPKGQS PKALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLAEIFCQ
PD1L470 (SEQ ID NO: 61)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQKPKPEKAP KSLIYSASYRYSVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQY
PD1L471 (SEQ ID NO: 62)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQKPKPEKAP KALIYSASYRYSVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQY
PD1L43 (SEQ ID NO: 98)	DIVMTQAALSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLNWYLQKPG QSPQLLIYQMSNLAGVPPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYY
PD1L472 (SEQ ID NO: 99)	DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLNWYLQKPGQ SPQLLIYQMSNLAGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
PD1L473 (SEQ ID NO: 100)	DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSNGITYLNWYLQKPGQ SPQLLIYQMSNLAGVPPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC

Таблица 10

VH-цепь (полинуклеотид SEQ ID NO)	Полинуклеотидная последовательность
PD1H93 (SEQ ID NO: 11)	GATGTACAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGA GAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTTCACAG ACTATTCAATGCACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTAA AGTGGATGGGCTGGATAAACATTGAGACTGGTGAGCCAACATATG CAGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGC CAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACAC GGCTACATATTTCTGTGCTAGAGATTACTACGGTACTTACTTCTAT GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
PD1H384 (SEQ ID NO: 12)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGGA GCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGTACACCTTCACCG ACTACAGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGG AATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACCGGCGAGCCACCTACG CCCAGGGCTTTACCGGACGGTTCGTGTTACAGCTGGATACATCTGT GTCTACAGCCTATCTGCAGATCTGCTCTCTGAAGGCCGAAGATAC AGCCGTGTACTTCTGCGCCCGGACTACTACGGCACCTACTTCTAC GCCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H405 (SEQ ID NO: 13)	CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAAAAACCTGGC GCCTCCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTTACC GACTACAGCATGCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAAGGCTTG GAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACAGGCGAGCCACATAC GCCAGGGCTTTACCGGACAGATTTCGTGTTACGCTGGACACCTCTG TGCCACCGCTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATA CCGCCGTGTACTTCTGCGCCAGAGACTACTACGGCACCTACTTCTA CGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTTACCGTTTCTTCT
PD1H90 (SEQ ID NO: 52)	CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGG GCTTCAGTGAAGTTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCA CCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTG AGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAACAAATGGTGGTATTAATTACA ATGAGAAGTTCAAGAAGAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCT CCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACT CTGCGGTCTATTACTGTACAATAGACTACTATGATTACGGGGGCTA CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
PD1H388 (SEQ ID NO: 53)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGA GCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGTACACCTTCACCA CCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGG AATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAACGGCGGCATCAACTACG CCCAGAAATTTACGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCA TCTCTACAGCCTACATGGAACCTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACA CAGCCGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCT ACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

<p>PD1H399 (SEQ ID NO: 54)</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGA GCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCA CCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGG AATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAACGCCGGCATCAACTACG CCCAGAAATTTTCAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCA TCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACA CAGCCGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCT ACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT</p>
<p>PD1H400 (SEQ ID NO: 55)</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGA GCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCA CCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGG AATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACGACGCCGGCATCAACTACG CCCAGAAATTTTCAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCA TCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACA CAGCCGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCT ACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT</p>
<p>PD1H401 (SEQ ID NO: 56)</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGA GCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCA CCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGG AATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACCAGGGCGGCATCAACTACG CCCAGAAATTTTCAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCA TCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACA CAGCCGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCT ACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT</p>
<p>PD1H402 (SEQ ID NO: 57)</p>	<p>AGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGA GCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCA CCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGG AATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAAGGGCGGCATCAACTAC GCCAGAAATTTTCAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGC ATCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGAC ACAGCCGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGC</p>

	TACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H403 (SEQ ID NO: 58)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGA GCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCA CCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGG AATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACGAGGGCGGCATCAACTAC GCCAGAAATTTACAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGC ATCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGAC ACAGCCGTGTAATACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGC TACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H404 (SEQ ID NO: 59)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGA GCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCA CCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGG AATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAACATCGGCATCAACTACG CCCAGAAATTTACAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCA TCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACA CAGCCGTGTAATACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCT ACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H81 (SEQ ID NO: 96)	CAGGTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGTATTGCAGCCCTCCC AGACCCTCAGTCTGACTTGTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACT TCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGT CTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTAT AACCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAAGATACCTCC AGCAACCAGGTATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACTGCAGAT ACTGGCACATACTACTGTGTTTCGAAAGGGCTACTATGATTACGGCT ATGTAATGGACTACTGGGTCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT CA
PD1H389 (SEQ ID NO: 97)	CAGATCACACTGAAAGAATCTGGACCTACACTGGTGAAACCTACA CAGACCCTGACACTGACCTGTACCTTCAGCGGCTTCAGCCTGAGC ACCAGCGGCATGGGCGTGAGCTGGATTCGGCAGCCTCCTGGAAAG GCCCTGGAATGGCTGGCCACATCTACTGGGACGACGACAAGCGG TACAGCCCTAGCCTGAAGTCTCGGCTGACAATCACCAAGGATACC TCTAAGAACCAGGTGGTGTGACAATGACCAACATGGACCCTGTG GACACAGGCACCTACTACTGCGTGCGGAAGGGCTACTACGACTAC GGCTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTG TCTTCT

Таблица 11

Название VL- цепи (полинуклеотид SEQ ID NO)	кДНК VL
PD1L30 (SEQ ID NO: 17)	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAG GGGAACGGGTACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTT CCAGTACTTGCACCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCA AACTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCAGC TCGCTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATC AGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAG TATCATCGTTCCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGC TGAAA
PD1L468 (SEQ ID NO: 18)	GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCTCCTG GAGAACGGGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGCAGCGTGAGC AGCAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGACTGGCCCCT CGGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGGCATCCCT GATCGGTTTTCTGGCAGCGGATCTGGCACAGATTTTACACTGACCA TCAGCCGGCTGGAACCTGAGGATTTTGCCGTGTACTACTGCCACC AGTACCACCGAGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGG AAATCAAG
PD1L469 (SEQ ID NO: 19)	GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCTCCTG

	GAGAACGGGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGCAGCGTGAGC AGCAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGACTGGCCCT CGGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGGCATCCCT GATCGGTTTTCTGGCAGCGGATCTGGCACAGATTACACACTGACC ATCAGCCGGCTGGAACCTGAGGATTTTGCCGTGTACTACTGCCAC CAGTACCACCGGAGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTG GAAATCAAG
PD1L28 (SEQ ID NO: 63)	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTA AGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGG CACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAA AGCACTGATTTACTCGGCATCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGAT CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC ACCAATGTGCACTCTGAAGACTTGGCAGAATATTTCTGTCCAGCAA TATAACATCTATCCGTACACGTTCCGGATCGGGGACCAAGCTGGAA ATGAAA
PD1L470 (SEQ ID NO: 64)	GACATCCAGATGACACAGTCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCTGTGG GAGATCGGGTGACAATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGGC ACCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGAAAAAGCCCCTAAG AGCCTGATCTACAGCGCCAGCTACCGGTACAGCGGCGTGCCTTCT CGGTTTAGCGGCTCTGGAAGCGGAACAGATTTCACTGACCATC TCTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCACATACTACTGCCAGCAGT ACAACATCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAA TCAAG
PD1L471 (SEQ ID NO: 65)	GACATCCAGATGACACAGTCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCTGTGG GAGATCGGGTGACAATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGGC ACCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGAAAAAGCCCCTAAG GCCCTGATCTACAGCGCCAGCTACCGGTACAGCGGCGTGCCTTCT CGGTTTAGCGGCTCTGGAAGCGGAACAGATTTCACTGACCATC TCTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCACATACTTTTGCCAGCAGT ACAACATCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAA TCAAG
PD1L43 (SEQ ID NO: 101)	GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACTCTCCAATCCAGTCACTCTTG GAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACA TAGTAATGGCATCACTTATTTGAATTGGTATCTGCAGAAGCCAGG

	CCAGTCTCCTCAGCTCCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCA GGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTAGCAGTGGGTGAGGAACTGATTTTC ACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTAT TACTGTGCTCAAATCTAGAACTTCCGCTCACGTTCGGATCGGGG ACCAAGCTGGAAATGAAA
PD1L472 (SEQ ID NO: 102)	GACATCGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTGCCTGTGACACCTG GCGAACCTGCCTCTATCAGCTGCCGGAGCAGCAAGAGCCTGCTGC ACAGCAACGGCATCACCTACCTGAACTGGTACCTGCAGAAACCTG GACAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACCAGATGAGCAACCTGGCCA GCGGCGTGCCTGATCGGTTTAGCGGCTCTGGAAGCGGCACAGACT TCACACTGAAGATCTCTCGGTTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGT ACTACTGCGCCAGAACCTGGAGCTGCCCTGACCTTCGGAGGCG GAACAAAGGTGGAGATCAAG
PD1L473 (SEQ ID NO: 103)	GACATCGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTGCCTGTGACACCTG GCGAACCTGCCTCTATCAGCTGCCGGAGCAGCAAGAGCCTGCTGC ACAGCAACGGCATCACCTACCTGAACTGGTACCTGCAGAAACCTG GACAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACCAGATGAGCAACCTGGCCA GCGGCGTGCCTGATCGGTTTAGCAGCTCTGGAAGCGGCACAGACT TCACACTGAAGATCTCTCGGTTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGT ACTACTGCGCCAGAACCTGGAGCTGCCCTGACCTTCGGAGGCG GAACAAAGGTGGAGATCAAG

Таблица 12

mAb	HC
HC PD1B505 (SEQ ID NO: 20)	DVQLQESGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHWVKQAPGKGLK WMGWINIETGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNETATY FCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HC PD1B742	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTDYSMHWVRQAPGQGLE

<p>PD1B743 (SEQ ID NO: 21)</p>	<p>WMGWINIETGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVY FCARDYYGTYFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVNF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>HC PD1B878 (SEQ ID NO: 22)</p>	<p>QVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYFTDYSMHWVRQAPGQGLE WMGWINIETGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVY FCARDYYGTYFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVFWESNGQPENNYKTTTPVI.DSDGSFFI.YSKI.TVDKSRWQQGNVNF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>HC PD1B506 (SEQ ID NO: 66)</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYFTTYWMHWVQRPGQGL EWIGEINPNNGGINYNEKFKKKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YYCTIDYYDYGGYWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVNFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>HC PD1B750, PD1B751 (SEQ ID NO: 67)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTTYWMHWVRQAPGQGL EWMGEINPNNGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCTIDYYDYGGYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTV VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV</p>

	EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HC PD1B845 (SEQ ID NO: 68)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGL EWMGEINPNNAGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCTIDYYDYGGYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HC PD1B846 (SEQ ID NO: 69)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGL EWMGEINPDAGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCTIDYYDYGGYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HC PD1B847 (SEQ ID NO: 70)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGL EWMGEINPNQGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCTIDYYDYGGYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HC PD1B848	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGL

(SEQ ID NO: 71)	EWMGEINPNKGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTA VYYCTIDYDYGGYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HC PD1B849 (SEQ ID NO: 72)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTTYWMHWVRQAPGQGL EWMGEINPNEGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTA VYYCTIDYDYGGYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HC PD1B850 (SEQ ID NO: 73)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTTYWMHWVRQAPGQGL EWMGEINPNNIGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAV YYCTIDYDYGGYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HC PD1B512 (SEQ ID NO: 104)	QVTLKESGPGLLQPSQTLSTLTCFSFGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLE WLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTGTYY CVRKGYDYGYVMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HC PD1B756, PD1B757 (SEQ ID NO: 105)	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEW LAHIYWDDDKRYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDGTYY CVRKGYDYGYVMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Таблица 13

mAb	LC (SEQ ID NO:)
LC PD1B505 (SEQ ID NO: 26)	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKLW IYSTSNLASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSP LTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
LC PD1B742 (SEQ ID NO: 27)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVSSSYLHWYQQKPLAPRLLI YSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSP FGQGTKLEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
LC PD1B743, PD1B878 (SEQ ID NO: 28)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVSSSYLHWYQQKPLAPRLLI YSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSP FGQGTKLEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
LC PD1B506 (SEQ ID NO: 82)	DIVMTQSQKFMSTSVRDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPK ALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLAEYFCQQYNI YPYTFGSGTKLEMKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PD1B750, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848, PD1B849, LC PD1B850 (SEQ ID NO: 83)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPEKAPKSL IYSASYRYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNI PYTFGQGTKLEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
LC PD1B751 (SEQ ID NO: 84)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPEKAPKAL IYSASYRYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYNI PYTFGQGTKLEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
LC PD1B512 (SEQ ID NO: 108)	DIVMTQAALSNPVTLGTSASISCRSSKLLHSNGITYLNWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQN LELPLTFGSGTKLEMKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE ECHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
LC PD1B756 (SEQ ID NO: 109)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKLLHSNGITYLNWYLQKPGQSP QLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQN LELPLTFGGGKVEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
LC PD1B757 (SEQ ID NO: 110)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKLLHSNGITYLNWYLQKPGQSP QLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQN LELPLTFGGGKVEIKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 14

кДНК HC (SEQ ID NO:)					
HC	PD1B505	(SEQ	ID	NO:	23)
GATGTACAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAA					
GATCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCACTGGGTGAA					
GCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACATTTGAGACTGGTG					
AGCCAACATATGCAGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTG					
CCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATAT					
TTCTGTGCTAGAGATTACTACGGTACTTACTTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAA					
GGCACCCTCTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG					
GCACCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA					
GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG					
GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG					
TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC					
ACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA					
AACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT					
CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACAC					
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG					
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA					
CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATG					
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAA					
ACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC					
ATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT					
TCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAAC					
TACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAG					
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT					
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA					
AA					
HC PD1B742, PD1B743 (SEQ ID NO: 24)					
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGGAGCCTCT					
GTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACAGCATGCACTG					
GGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGA					
CCGGCGAGCCCACCTACGCCAGGGCTTTACCGGACGGTTCGTGTTACGCCTGGATA					
CATCTGTGTCTACAGCCTATCTGCAGATCTGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCG					
TGACTTCTGCGCCCGGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCATGGACTACTGGG					
GCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTCC					
CCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG					
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC					
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAG					

CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG  
TGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT  
GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC  
AGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCATGATCTCCCGACCCCTGA  
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT  
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA  
GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT  
GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCG  
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG  
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAA  
AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA  
ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA  
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC  
GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG  
GGTAAA

HC PD1B878 (SEQ ID NO: 25)

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAAAACCTGGCGCCTCCG  
TGAAGGTGTCCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTTACCGACTACAGCATGCACTGG  
GTCCGACAGGCTCCAGGACAAGGCTTGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGAC  
AGGCGAGCCACATACGCCAGGGCTTTACCGCAGATTTCGTGTTTCAGCCTGGACA  
CCTCTGTGTCCACCGCTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCG  
TGTACTTCTGCGCCAGAGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCATGGATTACTGGG  
GCCAGGGCACCCCTGGTTACCGTTTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGTCTTCC  
CCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG  
GTCAAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC  
CAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG  
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG  
TGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT  
GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC  
AGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCATGATCTCCCGACCCCTGA  
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT  
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA  
GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT  
GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCG  
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG

CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA  
 AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA  
 ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACA  
 GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC  
 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG  
 GGTA

HC PD1B506 (SEQ ID NO: 74)

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAG  
 TGAAGTTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGGG  
 TGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAACAAT  
 GGTGGTATTAATTACAATGAGAAGTTCAAGAAGAAGGCCACACTGACTGTAGACAA  
 ATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGT  
 CTATTACTGTACAATAGACTACTATGATTACGGGGGCTACTGGGGCCAAGGCACCA  
 CTCTCACAGTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCT  
 CCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC  
 TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA  
 CACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC  
 CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC  
 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC  
 ACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC  
 CCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGT  
 GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG  
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC  
 GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG  
 AGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC  
 TCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCG  
 GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC  
 CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAA  
 GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC  
 CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG  
 AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA

HC PD1B750, PD1B751 (SEQ ID NO: 75)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCT  
 GTGAAAGTGTCTTGTAAAGCCAGCGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGG  
 GTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACA

ACGGCGGCATCAACTACGCCAGAAATTCAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGAT  
 AAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGC  
 CGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAA  
 CACTGGTGACAGTGTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCAC  
 CCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC  
 TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT  
 GCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT  
 GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA  
 AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAT  
 CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC  
 TTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGC  
 GTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA  
 CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC  
 ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA  
 GGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA  
 TCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC  
 CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  
 TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGACCCGAGAACAACACTAC  
 AAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC  
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA

HC PD1B845 (SEQ ID NO: 76)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCT  
 GTGAAAGTGTCTTGTAAAGCCAGCGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGG  
 GTGCGGCAGGCCCTGGACAGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACA  
 ACGCCGGCATCAACTACGCCAGAAATTCAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGAT  
 AAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGC  
 CGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAA  
 CACTGGTGACAGTGTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCAC  
 CCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC  
 TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT  
 GCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT  
 GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA  
 AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAT  
 CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC

TTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCACATGC  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA  
 CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC  
 ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA  
 GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA  
 TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC  
 CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  
 TCCACGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACACTAC  
 AAGACCACGCTCCCGTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC  
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

HC PD1B846 (SEQ ID NO: 77)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCT  
 GTGAAAGTGTCTTGTAAAGCCAGCGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGG  
 GTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACG  
 ACGCCGCATCAACTACGCCAGAAATTTAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGAT  
 AAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGC  
 CGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAA  
 CACTGGTGACAGTGTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC  
 CCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGAC  
 TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCT  
 GCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT  
 GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA  
 AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAAT  
 CACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCCTGAGTCTTCTCTC  
 TTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCACATGC  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA  
 CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC  
 ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA  
 GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA  
 TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC  
 CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  
 TCCACGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACACTAC  
 AAGACCACGCTCCCGTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC  
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA

TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
HC PD1B847 (SEQ ID NO: 78)
<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCT  GTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGG  GTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACCA  GGGCGGCATCAACTACGCCAGAAATTCAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATA  AGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCC  GTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAAC  ACTGGTGACAGTGTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACC  CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT  ACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG  CACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG  ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA  GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTC  ACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT  TCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGC  GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA  CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC  ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGGTGAATGGCAA  GGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA  TCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC  CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC  AAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC  ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>
HC PD1B848 (SEQ ID NO: 79)
<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCT  GTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGG  GTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACA  AGGGCGGCATCAACTACGCCAGAAATTCAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGAT  AAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGC  CGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAA  CACTGGTGACAGTGTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCAC  CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC</p>

TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT  
GCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT  
GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA  
AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAT  
CACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC  
TTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC  
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA  
CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC  
ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA  
GGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA  
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC  
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  
TCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC  
AAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC  
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  
TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

PD1B849 (SEQ ID NO: 80)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCT  
GTGAAAGTGTCTTGTAAAGCCAGCGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGG  
GTGCGGCAGGCCCCGTGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACG  
AGGGCGGCATCAACTACGCCAGAAATTTACAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGAT  
AAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGC  
CGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAA  
CACTGGTGACAGTGTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCAC  
CCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGAC  
TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT  
GCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT  
GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA  
AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAT  
CACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC  
TTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC  
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA  
CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC  
ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA  
GGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA

TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC  
 CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  
 TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC  
 AAGACCACGCCTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTC  
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

HC PD1B850 (SEQ ID NO: 81)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCT  
 GTGAAAGTGTCTTGTAAAGCCAGCGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGG  
 GTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACA  
 ACATCGGCATCAACTACGCCAGAAATTCAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGAT  
 AAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGC  
 CGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAA  
 CACTGGTGACAGTGTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCAC  
 CCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC  
 TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT  
 GCACACCTTCCCCTGTCTTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT  
 GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA  
 AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC  
 CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTC  
 TTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGC  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA  
 CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC  
 ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA  
 GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA  
 TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC  
 CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  
 TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC  
 AAGACCACGCCTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTC  
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

HC PD1B512 (SEQ ID NO: 106)

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGTTATTGCAGCCCTCCAGACCC  
 TCAGTCTGACTTGTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAG  
 CTGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGG

ATGATGACAAGCGCTATAACCCATCCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAAGAT  
 ACCTCCAGCAACCAGGTATTCTCAAGATCACCAGTGTGGACTGCAGATACTGG  
 CACATACTACTGTGTTGAAAGGGCTACTATGATTACGGCTATGTAATGGACTACTG  
 GGGTCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT  
 CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT  
 GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCCCTGA  
 CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCA  
 GCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC  
 GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG  
 TGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCACAGCCTGAACTCCTGGGGGGACCGT  
 CAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG  
 AGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC  
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC  
 AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGG  
 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCAT  
 CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC  
 CTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGT  
 CAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG  
 AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGTCTTCTTCTCT  
 ACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC  
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT  
 CCGGGTAAA

HC PD1B756, PD1B757 HC (SEQ ID NO: 107)

CAGATCACACTGAAAGAATCTGGACCTACACTGGTGAACCTACACAGACCC  
 TGACACTGACCTGTACCTTCAGCGGCTTCAGCCTGAGCACCCAGCGGCATGGGCGTG  
 AGCTGGATTCGGCAGCCTCCTGAAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCACATCTACTG  
 GGACGACGACAAGCGGTACAGCCCTAGCCTGAAGTCTCGGCTGACAATCACC AAGG  
 ATACCTTAAGAACCAGGTGGTGTGACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACA  
 GGCACCTACTACTGCGTGCAGGAAAGGGCTACTACGACTACGGTACGTGATGGACTA  
 CTGGGGCCAGGGAACACTGGTGTGACAGTGTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG  
 TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT  
 GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCC  
 CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCC  
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
 AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT

CTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA  
 CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC  
 CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT  
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG  
 GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGA  
 CTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC  
 CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC  
 ACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCT  
 GGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC  
 CGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGTCTTCTTCC  
 TCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA  
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG  
 TCTCCGGGTAAA

кДНК LC (SEQ ID NO:)
LC PD1B505 (SEQ ID NO: 29) САААТТГТТСТСАСССAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACG GGTCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTТАCTTGCACCTGGTA CCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACTCTGGATTTATAGCACATССААСТGG СТТСТGGAGTCCСAGСТСGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACСТСТТАСТСТСТСА СААТCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCATC GTTCCCCGCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCСGСATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAСТGCC TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAГ GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAG САAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAАAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCСGTC АСААAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
LC PD1B742 (SEQ ID NO: 30) GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCTCCTGGAGAAC GGGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGCAGCGTGAGCAGCAGCTACCTGCACTGG TACCAGCAGAAACCTGGACTGGCCCTCGGGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAACCT GGCCAGCGGCATCCCTGATCGGTTTTCTGGCAGCGGATCTGGCACAGATTTTACACT GACCATCAGCCGGCTGGAACCTGAGGATTTTGCCGTGТАCTACTGCCACCAGTACCA CCGGAGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGAACAАAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGG

<p>CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTG  CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA  AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC  AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA  CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG  TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>
<p>LC PD1B743, PD1B878 (SEQ ID NO: 31)</p> <p>GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCCGCCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAAA  GAGCCACACTGAGCTGTACCGCCAGCAGCTCTGTGTCCAGCAGCTACCTGCACTGGT  ATCAGCAGAAGCCTGGACTGGCCCTCGGCTGCTGATCTACAGCACAAGCAATCTG  GCCAGCGCATCCCCGATAGATTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTACACCCT  GACAAATCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACC  ACAGAAGCCCTCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTG  GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC  GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG  AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGA  CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT  ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG  GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>
<p>LC PD1B506 (SEQ ID NO: 85)</p> <p>GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAAGAGACA  GGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGCACTAATGTAGCCTGGTAT  CAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTA  CAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC  CATCACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAATATTTCTGTGCAATATAACAT  CTATCCGTACACGTTCCGGATCGGGACCAAGCTGGAAATGAAACGTACGGTGGCTG  CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCT  CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAG  GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG  CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG  AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>
<p>LC PD1B750, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848, PD1B849, PD1B850 (SEQ  ID NO: 86)</p> <p>GACATCCAGATGACACAGTCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCTGTGGGAGATC</p>

GGGTGACAATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGGCACCAACGTGGCCTGGTAC  
 CAGCAGAAAACCTGAAAAAGCCCCTAAGAGCCTGATCTACAGCGCCAGCTACCGGTA  
 CAGCGGCGTGCCTTCTCGGTTTAGCGGCTCTGGAAGCGGAACAGATTTACACTGAC  
 CATCTCTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCACATACTACTGCCAGCAGTACAACAT  
 CTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTG  
 CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCT  
 CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAG  
 GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG  
 CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG  
 AGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
 ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LC PD1B751 (SEQ ID NO: 87)

GACATCCAGATGACACAGTCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCTGTGGGAGATC  
 GGGTGACAATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGGCACCAACGTGGCCTGGTAC  
 CAGCAGAAAACCTGAAAAAGCCCCTAAGGCCCTGATCTACAGCGCCAGCTACCGGTA  
 CAGCGGCGTGCCTTCTCGGTTTAGCGGCTCTGGAAGCGGAACAGATTTACACTGAC  
 CATCTCTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCACATACTTTTGCCAGCAGTACAACAT  
 CTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTG  
 CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCT  
 CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAG  
 GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG  
 CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG  
 AGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
 ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

LC PD1B512 (SEQ ID NO: 111)

GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAAACATC  
 AGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGCATCACTTA  
 TTTGAATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATTTATCAGAT  
 GTCCAACCTTGCCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTAGCAGTGGGTCAGGAACTG  
 ATTTACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTG  
 CTCAAAATCTAGAACTCCGCTCACGTTTCGGATCGGGACCAAGCTGGAAATGAAA  
 CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA  
 TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA  
 GTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTAC  
 AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC

AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
LC PD1B756 (SEQ ID NO: 112) GACATCGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCC TGCCTCTATCAGCTGCCGGAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAACGGCATCACCT ACCTGAACTGGTACCTGCAGAAACCTGGACAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACCAGA TGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCTGATCGGTTTAGCGGCTCTGGAAGCGGCACA GACTTCACACTGAAGATCTCTCGGGTGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTG CGCCAGAACCTGGAGCTGCCCTGACCTTCGGAGGCGGAACAAAGGTGGAGATCA AGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
LC PD1B757 (SEQ ID NO: 113) GACATCGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCC TGCCTCTATCAGCTGCCGGAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAACGGCATCACCT ACCTGAACTGGTACCTGCAGAAACCTGGACAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACCAGA TGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCTGATCGGTTTAGCAGCTCTGGAAGCGGCACA GACTTCACACTGAAGATCTCTCGGGTGAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTACTACTG CGCCAGAACCTGGAGCTGCCCTGACCTTCGGAGGCGGAACAAAGGTGGAGATCA AGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

Последовательности кДНК, кодирующие области VH, VL, HC и LC антитела, предложенные в настоящем документе, могут быть кодон-оптимизированными для экспрессии в различных клетках, например для экспрессии в клетках НЕК или CHO. Дополнительные последовательности кДНК, которые можно использовать для кодирования и экспрессии областей VH, VL, HC и LC антител PD1B878 и PD1B849, показаны ниже.

**SEQ ID NO: 132** кДНК VH PD1B878

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAAAACCTGGCGCCTCCG

TGAAGGTGTCCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTTACCGACTACAGCATGCACTGGG  
TCCGACAGGCTCCAGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACA  
GGCGAGCCACATACGCCCAGGGCTTTACCGGCAGATTCGTGTTACAGCTGGACACC  
TCTGTGTCCACCGCTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTG  
TACTTCTGCGCCAGAGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCATGGATTACTGGGGC  
CAGGGCACCCCTGGTTACCGTTTCTTCT

**SEQ ID NO: 133** κДНК VL PD1B878

GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCCGCCACACTGTCAGTGTCTCCAGGCGAAA  
GAGCCACACTGAGCTGTACCGCCAGCAGCTCTGTGTCCAGCAGCTACCTGCACTGGT  
ATCAGCAGAAGCCTGGACTGGCCCTCGGCTGTGATCTACAGCACAAGCAATCTG  
GCCAGCGGCATCCCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTACACCCCTG  
ACAATCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTAATACTGCCACCAGTACCA  
CAGAAGCCCTCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAATCAAG

**SEQ ID NO: 134** κДНК HC PD1B878

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAAAAACCTGGCGCCTCCG  
TGAAGGTGTCCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTTACCGACTACAGCATGCACTGGG  
TCCGACAGGCTCCAGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACA  
GGCGAGCCACATACGCCCAGGGCTTTACCGGCAGATTCGTGTTACAGCTGGACACC  
TCTGTGTCCACCGCTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTG  
TACTTCTGCGCCAGAGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCATGGATTACTGGGGC  
CAGGGCACCCCTGGTTACCGTTTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC  
TGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA  
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC  
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT  
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA  
AACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT  
CCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTAC  
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA  
CAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG  
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAA  
CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCA  
TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT  
CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACT  
ACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA

**SEQ ID NO: 135** κДНК LC PD1B878

GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCCGCCACACTGTCAGTGTCTCCAGGCGAAA

GAGCCACACTGAGCTGTACCGCCAGCAGCTCTGTGTCCAGCAGCTACCTGCACTGGT  
 ATCAGCAGAAGCCTGGACTGGCCCCCTCGGCTGCTGATCTACAGCACAAGCAATCTG  
 GCCAGCGGCATCCCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTACACCCTG  
 ACAATCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACCA  
 CAGAAGCCCTCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGG  
 CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTG  
 CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA  
 AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC  
 AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA  
 CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCC  
 TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

**SEQ ID NO: 136** кДНК VH PD1B849

CAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGCGCCTCTG  
 TGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGGG  
 TCCGACAGGCTCCAGGACAAGGCTTGGAGTGGATGGGCGAGATCAACCCCAATGAA  
 GGC GG CATCAACTACGCCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGTGGACAA  
 GAGCATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGGAGTGGATCCGATGACACCGCCG  
 TGTA TACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTATTGGGGCCAGGGCACAC  
 TGGTTACAGTGTCTCT

**SEQ ID NO: 137** кДНК VL PD1B849

GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGATA  
 GAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGGCACCAATGTGGCCTGGTAT  
 CAGCAGAAGCCTGAGAAGGCCCTAAGAGCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATA  
 CAGCGGCGTGCCAAGCAGATTTTCTGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGA  
 CAATTAGTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAACA  
 TCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

**SEQ ID NO: 138** кДНК HC PD1B849

CAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGCGCCTCTG  
 TGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGGG  
 TCCGACAGGCTCCAGGACAAGGCTTGGAGTGGATGGGCGAGATCAACCCCAATGAA  
 GGC GG CATCAACTACGCCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGTGGACAA  
 GAGCATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGGAGTGGATCCGATGACACCGCCG  
 TGTA TACTGCACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTATTGGGGCCAGGGCACAC  
 TGGTTACAGTGTCTCTGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC  
 CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT  
 TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCAC  
 ACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC  
 GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC  
 AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC  
 ATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC

CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT  
 GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG  
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA  
 CCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT  
 ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC  
 AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGA  
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA  
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC  
 CACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT  
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG  
 CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGATAA

**SEQ ID NO: 139** кДНК LC PD1B849

GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGATA  
 GAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGGCACCAATGTGGCCTGGTAT  
 CAGCAGAAGCCTGAGAAGGCCCTAAGAGCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATA  
 CAGCGGCGTGCCAAGCAGATTTTCTGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCCTGA  
 CAATTAGTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAACA  
 TCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCT  
 GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTACC  
 TCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGGAAG  
 GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG  
 CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG  
 AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC  
 ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

На фиг. 2А и 2В показано выравнивание аминокислотных последовательностей VH и VL mAb линии PD1B505 соответственно.

На фиг. 3А и 3В показано выравнивание аминокислотных последовательностей VL и VL mAb линии PD1B506 соответственно.

На фиг. 4А и 4В показано выравнивание аминокислотных последовательностей VH и VL mAb линии PD1B512 соответственно.

Пример 4. Гуманизированные антитела к PD-1 ингибируют антиген-специфические Т-клетки.

Выбранные гуманизированные антитела характеризовали по их способности ингибировать активированные Т-клетки в анализе вторичного CMV-специфического ответа (анализ CMV-РВМС, описанный в примере 1). Исходные антитела PD1B505 и PD1B506 продемонстрировали надежное ингибирование активированных Т-клеток при оценке по трем разным донорам в нескольких отдельных экспериментах, как показано в табл. 16, в которой результаты представлены в виде процентного (%) ингибирования пролиферации Т-клеток при концентрации mAb 10 мкг/мл. На фиг. 5А показано среднее процентное ингибирование и стандартное отклонение для PD1B505 ( $57,8\% \pm 9,5\%$ ) и PD1B506 ( $77,0\% \pm 7,8\%$ ) по сравнению с изотипическим контролем (человеческий IgG<sub>1</sub>) ( $-9,5\% \pm 28,8\%$ ). Гуманизированные антитела PD1B743, PD1B750 и PD1B756 также ингибировали Т-клеточную активацию, что показано в табл. 17 в виде процентного ингибирования в концентрации 10 мкг/мл. На фиг. 5В показано процентное ингибирование и стандартное отклонение для PD1B743 ( $58,0\% \pm 11,3\%$ ), PD1B750 ( $65,9\% \pm 13,2\%$ ), PD1B756 ( $36,7\% \pm 15,5\%$ ), по сравнению с изотипическим контролем (человеческий IgG<sub>1</sub>) ( $3,5\% \pm 25,6\%$ ). Результаты свыше 25% стандартного отклонения исключали из анализа. Сконструированные антитела PD1B878 и PD1B849 аналогичным образом ингибировали активированные Т-клетки, как показано в табл. 18. На фиг. 5С показано среднее процентное ингибирование и стандартное отклонение для PD1B878 ( $78,3\% \pm 18,1\%$ ) и PD1B849 ( $69,0\% \pm 4,0\%$ ) по сравнению с изотипическим контролем (человеческий IgG<sub>1</sub>) ( $4,1\% \pm 28,7\%$ ).

Таблица 16

Донор	PD1B505		PD1B506		Изотип	
	Среднее	Станд. откл.	Среднее	Станд. откл.	Среднее	Станд. откл.
D1	86,5	9,0	95,2	1,4	4,7	13,3
D2	74,8	0,8	100,1	3,3	13,2	12,9
D1	77	23,0	98	9,8	4,2	33,6
D2	87,7	3,7	100,0	5,8	-16,6	30,6
D3	0,7	8,3	49,5	11,4	6,1	5,7
D1	77,1	4,1	87,8	4,0	-33,1	59,1
D1	69,7	5,4	85,2	2,7	3,1	24,5
D3	63,4	4,9	101,4	8,7	-23,5	44,3
D1	84,5	7,2	86,4	6,5	-35,6	60,4
D1	76,6	2,5	103,1	5,2	-17,7	28,1
D1	49,8	12,7	64,2	11,5	-14,9	19,5
D1	-7,0	17,1	3,8	12,1	-20,0	29,3
D2	49,1	16,6	76,6	6,8	-0,9	28,1
D1	20,1	17,0	26,2	20,7	-2,0	14,2

Таблица 17

Донор	PD1B743		PD1B750		PD1B756		Изотип	
	Среднее	Станд. откл.						
D1	90,1	3,1	97,2	10,0	59,3	18,2	-17,7	28,1
D3	21,1	13,8	74,9	16,7	27,4	14,2	-6,6	17,7
D4	30,5	23,6	24,2	15,5	0,3	17,1	2,7	7,7
D5	64,0	5,9	75,0	9,9	69,3	12,8	14,1	35,6
D1	66,7	14,8	58,1	19,8	27,4	15,4	-13,1	45,2
D3	35,1	8,2	55,6	5,8			0,5	20,8
D1	84,2	2,2	72,1	18,8			43,1	17,5
D1	58,4	8,4	64,7	7,3			5,8	31,6
D1	72,1	21,4	71,6	14,8			2,5	25,9

Таблица 18

Донор	PD1B878		PD1B849		Изотип	
	Среднее	Станд. откл.	Среднее	Станд. откл.	Среднее	Станд. откл.
D1			64,3	2,5	5,8	31,6
D1	78,3	18,1	73,7	5,6	2,5	25,9

Пример 5. Антитела к PD-1 связываются с человеческим PD-1 с высокой аффинностью.

Аффинность исходных и гуманизированных антител к PD-1 измеряли с использованием SPR, как описано в примере 1.

В табл. 19 показаны результаты измерений аффинности. Антитела связывали PD-1 со значением  $K_D$  в диапазоне от  $5,2 \times 10^{-8}$  М и  $2,1 \times 10^{-8}$  М.

Таблица 19

mAb	$K_a$ (1/Mc)	$K_d$ (1/c)	$K_D$ (M)
PD1B505	8,11E+04	2,36E - 03	2,91E - 08
PD1B742			
PD1B743	9,15E+04	3,00E - 03	3,28E - 08
PD1B878	5,98E+04	3,51E - 03	5,89E - 08
PD1B506	1,95E+05	1,02E - 02	5,24E - 08
PD1B750	3,59E+05	8,32E - 03	2,32E - 08
PD1B751			
PD1B845*	3,51E+05	8,43E - 03	2,40E - 08
PD1B846*	3,49E+05	7,53E - 03	2,16E - 08
PD1B847*	3,03E+05	7,44E - 03	2,46E - 08
PD1B848*	2,53E+05	9,91E - 03	3,92E - 08
PD1B849	1,88E+05	8,83E - 03	4,71E - 08
PD1B850*	3,13E+05	7,19E - 03	2,30E - 08
PD1B512			
PD1B756	1,18E+05	2,14E - 03	1,81E - 08
PD1B757			

\*Связывание оценивали для неочищенных супернатантов

Пример 6. Антитела к PD-1 по-разному блокируют взаимодействие PD-1/лиганд.

Блокирование лиганда анализировали путем оценки влияния антител на кластеризацию клеток, сверхэкспрессирующих либо PD-1, либо лиганд PD-1 (PD-L1 или PD-L2), с использованием протокола, описанного в примере 1. Более низкая процентная доля (%) зарегистрированных двойных положительных событий указывала, что исследуемое mAb блокировало связывание PD-1 с исследуемым лигандом.

На фиг. 6А показана процентная доля кластеров клеток PD-1-НЕК и PD-L1-НЕК, оставшихся после обработки клеток антителами PD1B743, PD1B750 или PD1B756. PD1B743 и PD1B756 не блокировали связывание PD-L1 с PD-1, тогда как PD1B750 блокировало связывание. Аналогично PD1B743 и PD1B756 не блокировали связывание PD-L2 с PD-1, тогда как PD1B750 блокировало связывание (фиг. 6В). В экспериментах в качестве положительного контроля использовали известное блокирующее лиганд mAb к PD-1.

Пример 7. Группирование антител по эпитопам.

В исходных матричных анализах с использованием химерных антител и протокола, описанного в примере 1, идентифицировали пять различных эпитопных групп. Группы 4 и 5 не обладали перекрестной конкуренцией ни с какими другими группами. Группы 1, 2 и 3 были частично перекрывающимися; группа 1 конкурировала с группой 2 и 3, а группы 2 и 3 конкурировали с группой 1. Группы 1, 2, 3 и 4 не блокировали связывание PD-L1 с PD-1, тогда как группа 5 блокировала взаимодействие PD-L1/PD-1. На фиг. 7 показаны отдельные эпитопные группы и антитела каждой группы.

Был проведен контрольный эксперимент с добавлением изотипического контроля в качестве первого антитела, чтобы продемонстрировать, каким образом второе антитело будет само по себе связываться с человеческим PD-1. Затем в эксперименте с конкуренцией сигнал (нм) ассоциации второго антитела получали через 180 с после начала этой стадии. Сигнал каждого потенциально конкурирующего антитела сравнивали со средним значением сигнала от 3 прогонов того же антитела, добавленного после изотипического контроля. Определяли соотношение этих сигналов. Если соотношение было ниже 0,7, то считали, что второе антитело не может связаться с человеческим PD-1, и что два антитела делят один и тот же эпитоп. Если соотношение было больше 0,7, то считали, что второе антитело может связываться в присутствии первого антитела, и, следовательно, два антитела связываются с неконкурирующими эпитопами.

Не ожидается, что гуманизация и конструирование пост-трансляционных модификаций (PTM) будет приводить к сдвигу эпитопа, и поэтому ожидается, что PD1B743, PD1B742 и PD1B878 будут связываться с тем же эпитопом, что и исходное химерное антитело PD1B505 из группы 1. Аналогично предполагается, что PD1B750, PD1B751 и PD1B849 будут связываться с тем же эпитопом, что и исходное химерное антитело PD1B506 из группы 5, а также ожидается, что PD1B756 будет связываться с тем же эпитопом, что и исходное химерное антитело PD1B512 из группы 2.

Антитело PD1B503 содержит последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 114 и 115 соответственно.

Антитело PD1B517 содержит последовательности VH и VL с SEQ ID NO: 116 и 117 соответственно.

**SEQ ID NO: 114** VH PD1B503 (PD1H96)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPG  
DGSTKYNEKFKGKATLTTDKSSSTAYMQFSRLTSEDSAVYFCARGGMRQLGRFVYWG  
QGTTTLTVSS

**SEQ ID NO: 115** VL PD1B503 (PD1L32)

DIVLTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQKPKDGTIKRLIYAASLTDSG  
VPKRFSGRSGSDYSLTISSEDFADYYCLQYASNPYTFGGGTKLEIK

**SEQ ID NO: 116** VH PD1B517 (PD1H73)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNVKDTYFHWVKQRPDQGLEWIGRIVS  
ANGDTKYAPKLQDKATITTTDSSNTAYLQLSRLTSEDTAVYYCVLIYYGFEEGDFWGWG  
GTTTLTVSS

**SEQ ID NO: 117** VL PD1B517 (PD1L34)

DIVMTQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPGNVPKLLIYKASNLH  
TGVPFRFSGSGSGTFTLNISLQPEDATYYCQQGQSFPLTFGAGTKLELK

Пример 8. Созревание аффинности PD1B878.

Для повышения аффинности связывания PD1B878 проводили сканирование CDR как для тяжелых, так и для легких цепей. Были разработаны некомбинаторные библиотеки для диверсификации каждого из положений всех шести CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3).

Вкратце конструировали библиотеки Fab в системе pIX-фагового дисплея Fab, как описано в WO 2009/085462, Shi et al., J. Mol. Biol. 397: 385-396 (2010) и Tornetta et al. J. Immunol. Methods 360: 39-46 (2010) с незначительными модификациями в сайтах для рестрикционных ферментов. Эти библиотеки подвергали пэннингу относительно биотинилированного человеческого PD-1/PDCD1 (Acro Biosystems, кат. № PD1-H82E4) в соответствии с известными в данной области схемами пэннинга, например, как

описано в WO 2009/085462 и Shi et al., J. Mol. Biol. 397: 385-396 (2010). Фаги получали с помощью инфекции хелперного фага. Связывающие фаги извлекали путем добавления гранул с образованием комплекса гранула/антиген/фаг. После последней промывки фаг высвобождали путем инфицирования экспоненциально растущих клеток *Escherichia coli* TG-1.

Для последующего скрининга готовили плазмидную ДНК из культивированной в течение ночи культуры клеток *Escherichia coli* TG-1 и ген pIX извлекали путем расщепления при помощи NheI/SpeI. После лигирования ДНК трансформировали в клетки TG-1 и выращивали на планшетах LB/Agar в течение ночи. На следующий день собирали колонии, выросшие в течение ночи, и культуры использовали:

- (i) для проведения секвенирования V-участков, а также
- (ii) для индукции получения Fab.

Для получения Fab культивированную в течение ночи культуру разбавляли в 100 раз новой средой и выращивали в течение 5-6 ч при 37°C. Продукцию Fab индуцировали путем добавления свежей среды, содержащей IPTG, и культуры выращивали в течение ночи при 30°C. На следующий день культуры центрифугировали и супернатанты, содержащие растворимые Fab-белки, использовали для ИФА Fab. Для проведения ИФА, растворимые Fab-белки захватывали на планшеты с помощью поликлонального антитела к Fd(CH1). После промывки и блокирования добавляли биотинилированный человеческий PD-1/PDCD1 в концентрации 5 нМ. Такая концентрация позволяет ранжировать Fab-варианты по кратности изменения относительно исходного антитела, причем исходный Fab, присутствующий в качестве контроля на всех планшетах, берется за 100%. Биотинилированный человеческий PD-1 обнаруживали стрептавидином, конъюгированным с HRP, и хемилюминисценцию анализировали в спектрофотометре для планшетов. По этому критерию были выбраны 3 тяжелых и 2 легких цепи, связывающие человеческий PD-1 в 10 или более раз сильнее, чем исходный Fab.

В табл. 20 показан вариант с заменами в позиции 57 в HCDR2 из VH и позиции.

29 или 30 в LCDR1 из VL. В табл. 21 показаны номера SEQ ID N0 для CDR антител. В табл. 22 показаны номера SEQ ID N0 для аминокислотных последовательностей областей VH, VL, HC и LC. В табл. 23 показаны номера SEQ ID N0 для полинуклеотидов, кодирующих области VH, VL, HC и LC антител. В табл. 24 показаны аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3. В табл. 25 показаны аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3. В табл. 26 показаны аминокислотные последовательности области VH. В табл. 27 показаны аминокислотные последовательности области VL. Ожидается, что варианты с созревшей аффинностью будут связывать тот же эпитоп на PD-1, что и исходное антитело PD1B878.

Таблица 20

Идентификатор mAb	Идентификатор пептида VH	Мутация VH по сравнению с исходным вариантом	Идентификатор пептида VL	Мутация VL по сравнению с исходным вариантом
PD1B1085	PD1H585	E57Y	PD1L469	
PD1B1086	PD1H586	E57H	PD1L469	
PD1B1087	PD1H587	E57W	PD1L469	
PD1B1088	PD1H405		PD1L651	V29F
PD1B1089	PD1H405		PD1L652	S30P
PD1B1090	PD1H585	E57Y	PD1L651	V29F
PD1B1091	PD1H586	E57H	PD1L651	V29F
PD1B1092	PD1H587	E57W	PD1L651	V29F
PD1B1093	PD1H585	E57Y	PD1L652	S30P
PD1B1094	PD1H586	E57H	PD1L652	S30P
PD1B1095	PD1H587	E57W	PD1L652	S30P

Таблица 21

Антитело	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PD1B1085	2	145	4	5	6	7
PD1B1086	2	146	4	5	6	7
PD1B1087	2	147	4	5	6	7
PD1B1088	2	3	4	148	6	7
PD1B1089	2	3	4	149	6	7
PD1B1090	2	145	4	148	6	7
PD1B1091	2	146	4	148	6	7
PD1B1092	2	147	4	148	6	7
PD1B1093	2	145	4	149	6	7
PD1B1094	2	146	4	149	6	7
PD1B1095	2	147	4	149	6	7

Таблица 22

Идентификатор mAb	Идентификатор пептида VH	Идентификатор пептида VL	VH SEQ ID NO:	cVL SEQ ID NO:	cHC SEQ ID NO:	cLC SEQ ID NO:
PD1B1085	PD1H585	PD1L469	140	16	150	28
PD1B1086	PD1H586	PD1L469	141	16	151	28
PD1B1087	PD1H587	PD1L469	142	16	152	28
PD1B1088	PD1H405	PD1L651	10	143	22	153
PD1B1089	PD1H405	PD1L652	10	144	22	154
PD1B1090	PD1H585	PD1L651	140	143	150	153
PD1B1091	PD1H586	PD1L651	141	143	151	153
PD1B1092	PD1H587	PD1L651	142	143	152	153
PD1B1093	PD1H585	PD1L652	140	144	150	154
PD1B1094	PD1H586	PD1L652	141	144	151	154
PD1B1095	PD1H587	PD1L652	142	144	152	154

Таблица 23

Идентификатор mAb	Название пептида VH	Название пептида VL	кДНК VH SEQ ID NO:	кДНК VL SEQ ID NO:	кДНК HC SEQ ID NO:	кДНК LC SEQ ID NO:
PD1B1085	PD1H585	PD1L469	155	19	160	31
PD1B1086	PD1H586	PD1L469	156	19	161	31
PD1B1087	PD1H587	PD1L469	157	19	162	31
PD1B1088	PD1H405	PD1L651	13	158	25	163
PD1B1089	PD1H405	PD1L652	13	159	25	164
PD1B1090	PD1H585	PD1L651	155	158	160	163
PD1B1091	PD1H586	PD1L651	156	158	161	163
PD1B1092	PD1H587	PD1L651	157	158	162	163
PD1B1093	PD1H585	PD1L652	155	159	160	164
PD1B1094	PD1H586	PD1L652	156	159	161	164
PD1B1095	PD1H587	PD1L652	157	159	162	164

Таблица 24

Антитело	HCDR1 (SEQ ID NO:)	HCDR2 (SEQ ID NO:)	HCDR3 (SEQ ID NO:)
PD1B1085	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGYPT (SEQ ID NO: 145)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B1086	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGHPT (SEQ ID NO: 146)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B1087	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGWPT (SEQ ID NO: 147)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B1088	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID NO: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B1089	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID NO: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B1090	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGYPT (SEQ ID NO: 145)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B1091	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGHPT (SEQ ID NO: 146)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B1092	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGWPT (SEQ ID NO: 147)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B1093	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGYPT (SEQ ID NO: 145)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B1094	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGHPT (SEQ ID NO: 146)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)
PD1B1095	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 2)	WINIETGWPT (SEQ ID NO: 147)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID NO: 4)

Таблица 25

Антитело	LCDR1 (SEQ ID NO:)	LCDR2 (SEQ ID NO:)	LCDR3 (SEQ ID NO:)
PD1B1085	TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 5)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B1086	TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 5)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B1087	TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO: 5)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B1088	TASSSFSSSYLH (SEQ ID NO: 148)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)

PD1B1089	TASSVPSSYLH (SEQ ID NO: 149)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B1090	TASSSFSSSYLH (SEQ ID NO: 148)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B1091	TASSSFSSSYLH (SEQ ID NO: 148)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B1092	TASSSFSSSYLH (SEQ ID NO: 148)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B1093	TASSVPSSYLH (SEQ ID NO: 149)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B1094	TASSVPSSYLH (SEQ ID NO: 149)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)
PD1B1095	TASSVPSSYLH (SEQ ID NO: 149)	STSNLAS (SEQ ID NO: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID NO: 7)

Таблица 26

Название пептида VH	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO:
PD1H585	QVQLVQSGSELK KPGASVKV SCKASGYTFTDYSMHWVRQAP GQGLEWMGWINIETGYPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGLTVTVSS	140
PD1H586	QVQLVQSGSELK KPGASVKV SCKASGYTFTDYSMHWVRQAP GQGLEWMGWINIETGHPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGLTVTVSS	141
PD1H587	QVQLVQSGSELK KPGASVKV SCKASGYTFTDYSMHWVRQAP GQGLEWMGWINIETGWPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGLTVTVSS	142

Таблица 27

Название пептида VL	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO:
PD1L651	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSFSSSYLHWYQQKPLAP RLLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSDYTLTISRLEPEDFAVYYCH QYHRSPLTFGQGTKLEIK	143
PD1L652	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSVPSSYLHWYQQKPLA PRLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSDYTLTISRLEPEDFAVYYC HQYHRSPLTFGQGTKLEIK	144

**SEQ ID NO: 150** HC PD1B1085, PD1B1090, PD1B1093

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTDYSMHWRQAPGQGLEWMGWIN  
IETGYPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARDYYGTYFYAMDYW  
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG  
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC  
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 151** HC PD1B1086, PD1B1091, PD1B1094

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTDYSMHWRQAPGQGLEWMGWIN  
IETGHPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARDYYGTYFYAMDYW  
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG  
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC  
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 152** HC PD1B1087, PD1B1092, PD1B1095

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTDYSMHWRQAPGQGLEWMGWIN  
IETGWPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARDYYGTYFYAMDY  
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 153** LC PD1B1088, PD1B1090, PD1B1091, PD1B1092

EIVLTQSPATLSLSPGERATLCTASSSFSSYLHWYQQKPKGLAPRLLIYSTSNLAS  
GIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL  
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 154** LC PD1B1089, PD1B1093, PD1B1094, PD1B1095

EIVLTQSPATLSLSPGERATLCTASSVPSYLHWYQQKPKGLAPRLLIYSTSNLAS  
GIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL  
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 155** кДНК PD1H585

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGGAGCCTCTG  
TGAAAGTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCGACTACAGCATGCACTGGG

TGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACC  
GGCTATCCCACCTACGCCAGGGCTTTACCGGACGGTTCGTGTTACAGCCTGGATACA  
TCTGTGTCTACAGCCTATCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCGTG  
TACTTCTGCGCCCGGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCATGGACTACTGGGGC  
CAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

**SEQ ID NO: 156** κДНК PD1H586

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGGAGCCTCTG  
TGAAAGTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCGACTACAGCATGCACTGGG  
TGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACC  
GGCCATCCCACCTACGCCAGGGCTTTACCGGACGGTTCGTGTTACAGCCTGGATACA  
TCTGTGTCTACAGCCTATCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCGTG  
TACTTCTGCGCCCGGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCATGGACTACTGGGGC  
CAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

**SEQ ID NO: 157** κДНК PD1H587

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGGAGCCTCTG  
TGAAAGTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCGACTACAGCATGCACTGGG  
TGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACC  
GGCTGGCCACCTACGCCAGGGCTTTACCGGACGGTTCGTGTTACAGCCTGGATACA  
TCTGTGTCTACAGCCTATCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCGTG  
TACTTCTGCGCCCGGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCATGGACTACTGGGGC  
CAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

**SEQ ID NO: 158** κДНК PD1L651

GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCTCCTGGAGAACG  
GGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGCAGCTTACAGCAGCAGCTACCTGCACTGGT  
ACCAGCAGAAACCTGGACTGGCCCCCTCGGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAACCTG  
GCCAGCGGCATCCCTGATCGGTTTTCTGGCAGCGGATCTGGCACAGATTACACACTG  
ACCATCAGCCGGCTGGAACCTGAGGATTTTGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACCAC  
CGGAGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATCAAG

**SEQ ID NO: 159** κДНК PD1L652

GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCTCCTGGAGAACG  
GGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGCAGCGTGCCAAGCAGCTACCTGCACTGGT  
ACCAGCAGAAACCTGGACTGGCCCCCTCGGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAACCTG  
GCCAGCGGCATCCCTGATCGGTTTTCTGGCAGCGGATCTGGCACAGATTACACACTG  
ACCATCAGCCGGCTGGAACCTGAGGATTTTGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACCAC  
CGGAGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATCAAG

**SEQ ID NO: 160** κДНК HC PD1B1085, PD1B1090, PD1B1093

TCTGATAAGAGTCAGAGGTAACCTCCCGTTGCGGTGCTGTTAACGGTGGAGGG  
CAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTG  
ACAGACTAACAGACTGTTCCCTTCCATGGGTCTTTCTGCAGTCACCGTCCTTAGATC  
CACTAGTCCAGTGTGGTGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTA

TTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTATACAGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG  
 AAGCGAACTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCT  
 ACACCTTACCGACTACAGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTG  
 GAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACCGGCTATCCACCTACGCCCAGGGCTT  
 TACCGGACGGTTCGTGTTACAGCCTGGATACATCTGTGTCTACAGCCTATCTGCAGAT  
 CAGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCGTGTACTIONTCTGCGCCCGGGACTACTACGG  
 CACCTACTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTC  
 TGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC  
 TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGA  
 CGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCC  
 TACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT  
 TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG  
 GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCC  
 AGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA  
 CACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCA  
 CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG  
 CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC  
 CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTC  
 CAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGC  
 CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC  
 CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGA  
 CTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCCGTATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC  
 GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGATAGTTCGAATCCTAGAAGACAT  
 GATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAATAAGATGCAGTGAATAAAT  
 GCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAA  
 TAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGT  
 GTGGGA

**SEQ ID NO: 161** κДНК HC PD1B1086, PD1B1091, PD1B1094

TCTGATAAGAGTCAGAGGTAACCTCCCGTTGCGGTGCTGTTAACGGTGGAGGG  
 CAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTG  
 ACAGACTAACAGACTGTTCCCTTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCCTAGATC  
 CACTAGTCCAGTGTGGTGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTA  
 TTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTATACAGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG  
 AAGCGAACTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCT  
 ACACCTTACCGACTACAGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTG  
 GAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACCGGCCATCCACCTACGCCCAGGGCTT  
 TACCGGACGGTTCGTGTTACAGCCTGGATACATCTGTGTCTACAGCCTATCTGCAGAT  
 CAGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCGTGTACTIONTCTGCGCCCGGGACTACTACGG

CACCTACTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTC  
 TGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTC  
 TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA  
 CGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC  
 TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT  
 TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG  
 GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCC  
 AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA  
 CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA  
 CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG  
 CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC  
 CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC  
 CAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC  
 CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC  
 CAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCTCCCGTGTGGGA  
 CTCGGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC  
 GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGATAGTTCGAATTCCTAGAAGACAT  
 GATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAAT  
 GCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAA  
 TAAACAAGTTAAACAACAACAATTGCATTCATTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGT  
 GTGGGA

**SEQ ID NO: 162** κДНК HC PD1B1087, PD1B1092, PD1B1095

TCTGATAAGAGTCAGAGGTAACCTCCCGTTGCGGTGCTGTAAACGGTGGAGGG  
 CAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTG  
 ACAGACTAACAGACTGTTCCCTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCTTAGATC  
 CACTAGTCCAGTGTGGTGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTA  
 TTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTATACAGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG  
 AAGCGAACTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCT  
 ACACCTTACCAGACTACAGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTG  
 GAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACCGGCTGGCCACCTACGCCAGGGCTT  
 TACCGGACGGTTCGTGTTACGCTGGATACATCTGTGTCTACAGCCTATCTGCAGAT  
 CAGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCGTGACTTCTGCGCCCGGGACTACTACGG  
 CACCTACTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTC  
 TGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTC  
 TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA  
 CGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC  
 TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT  
 TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG

GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCC  
 AGCACCTGAACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGA  
 CACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA  
 CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG  
 CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC  
 CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC  
 CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC  
 CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC  
 CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
 TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGA  
 CTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC  
 GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATAGTTCGAATTCCTAGAAGACAT  
 GATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACACTAGAATGCAGTGAAAAAAT  
 GCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAA  
 TAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGT  
 GTGGGA

**SEQ ID NO: 163** κДНК LC PD1B1088, PD1B1090, PD1B1091, PD1B1092

TCTGATAAGAGTCAGAGGTAACCTCCCGTTGCGGTGCTGTTAACGGTGGAGGG  
 CAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTG  
 ACAGACTAACAGACTGTTCCCTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTACCGTCTTAGATC  
 CACTAGTCCAGTGTGGTGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTA  
 TTCCTGATGGCGGCCGCCAAAGTATACAGGCCGAGATCGTGTGACACAGTCTCCT  
 GCCACACTGTCTGTCTCCTGGAGAACGGGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGC  
 AGCTTCAGCAGCAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGACTGGCCCCCTG  
 GCTGTGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGGCATCCCTGATCGGTTTTCTGG  
 CAGCGGATCTGGCACAGATTACACACTGACCATCAGCCGGCTGGAACCTGAGGATT  
 TTGCCGTGTAATACTGCCACCAGTACCACCGGAGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGAA  
 CAAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT  
 CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT  
 ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC  
 TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG  
 CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG  
 TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT  
 TAGTGATTGCAATTCCTAGAAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACC  
 ACAACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCT  
 TTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTAT  
 TTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGA

**SEQ ID NO: 164** κДНК LC PD1B1089, PD1B1093, PD1B1094, PD1B1095

TCTGATAAGAGTCAGAGGTAACCTCCCGTTGCGGTGCTGTTAACGGTGGAGGG

CAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGGCCACCAGACATAATAGCTG  
 ACAGACTAACAGACTGTTCTTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCTTAGATC  
 CACTAGTCCAGTGTGGTGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTA  
 TTCCTGATGGCGGCCGCCAAAGTATACAGGCCGAGATCGTGTGACACAGTCTCCT  
 GCCACACTGTCTGTCTCCTGGAGAACGGGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGC  
 AGCGTGCCAAGCAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGACTGGCCCCCTCG  
 GCTGCTGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGGCATCCCTGATCGGTTTCTGG  
 CAGCGGATCTGGCACAGATTACACACTGACCATCAGCCGGCTGGAACCTGAGGATT  
 TTGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACCACCGGAGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGAA  
 CAAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCAT  
 CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT  
 ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC  
 TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG  
 CACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG  
 TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT  
 TAGTGATTGCAATTCCTAGAAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGACAAACC  
 ACAACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCT  
 TTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTAT  
 TTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGA

Аффинность антител к PD-1 человека и яванского макака измеряли с использованием SPR, как описано в примере 1. Антитела связывали человеческий PD-1 со значением  $K_D$  в диапазоне от  $1 \times 10^{-8}$  М до  $10 \times 10^{-10}$  М (табл. 28) и PD-1 яванского макака со значением  $K_D$  в диапазоне от  $7 \times 10^{-8}$  М до  $1 \times 10^{-9}$  М (табл. 26). Аффинности большинства вариантов PD1B878 с созревшей аффинностью улучшились приблизительно в 100 раз по сравнению с исходным антителом.

Таблица 28

mAb	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	KD (M)
PD1B1085	1,56E+05	1,42E - 04	9,11E - 10
PD1B1086	1,24E+05	3,94E - 04	3,19E - 09
PD1B1087	1,66E+05	2,39E - 04	1,44E - 09
PD1B1088	3,13E+04	3,41E - 04	1,09E - 08
PD1B1089	5,86E+04	4,74E - 04	8,09E - 09
PD1B1090	1,06E+05	2,37E - 05	2,23E - 10
PD1B1091	7,77E+04	6,44E - 05	8,30E - 10
PD1B1092	1,40E+05	3,00E - 05	2,14E - 10
PD1B1093	1,25E+05	4,36E - 05	3,49E - 10
PD1B1094	1,05E+05	9,16E - 05	8,71E - 10
PD1B1095	1,51E+05	7,12E - 05	4,71E - 10

Таблица 29

mAb	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	KD (M)
PD1B1085	2,00E+05	1,29E - 03	6,45E - 09
PD1B1086	1,71E+05	5,44E - 03	3,18E - 08
PD1B1087	2,12E+05	2,47E - 03	1,16E - 08
PD1B1088	6,61E+04	4,79E - 03	7,24E - 08
PD1B1089	9,32E+04	8,39E - 03	9,00E - 08
PD1B1090	1,30E+05	1,85E - 04	1,43E - 09
PD1B1091	9,91E+04	9,24E - 04	9,32E - 09
PD1B1092	1,29E+05	4,11E - 04	3,18E - 09
PD1B1093	1,69E+05	3,68E - 04	2,18E - 09
PD1B1094	1,35E+05	1,62E - 03	1,20E - 08
PD1B1095	1,85E+05	7,81E - 04	4,23E - 09

Антитела PD1B1086, PD1B1090 и PD1B1094 характеризовали по способности ингибировать активированные Т-клетки в анализе вторичного CMV-специфического ответа (анализ CMV-PBMC, описанный в примере 1). В табл. 30 показано среднее процентное ингибирование для двух доноров в одном эксперименте. Все исследованные антитела ингибировали в анализе CMV-специфичный вторичный ответ на величину 70% или более.

Таблица 30

	PD1B1086	PD1B1090	PD1B1094	IgG1
Средний %	72,7	74,8	77,9	6,0

Пример 9. Агонистические антитела к PD-1 избирательно воздействуют на хронически активиро-

ванные Т-клетки памяти.

Было обнаружено, что PD-1 главным образом экспрессировался на Т-клетках памяти (клетки CD45RO<sup>+</sup>), но не на интактных Т-клетках, и была обнаружена повышенная экспрессия при активации Т-клеток. Экспрессия PD-1 повышалась в Т-клетках памяти, стимулированных пептидами CMV (фиг. 8А).

Антитела PD1B849 и PD1B878 тестировали на их способность ингибировать пролиферацию активированных Т-клеток памяти CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> с использованием РВМС, активированных CMV. Как PD1B849, так и PD1B878 ингибировали пролиферацию CDV-специфических активированных РВМС в анализе вторичного ответа CMV-РВМС (фиг. 8В).

Пример 10. Агонистические антитела к PD-1 снижают число активированных, но не покоящихся Т-клеток памяти посредством ADCC.

Антитела PD1B849 и PD1B878 тестировали на способность опосредовать ADCC для активированных Т-клеток памяти или покоящихся Т-клеток памяти с использованием NK или РВМС в качестве эффекторных клеток. Было установлено, что активированные Т-клетки памяти имеют более высокую экспрессию PD-1 по сравнению с покоящимися Т-клетками памяти. Эксперимент проводили в соответствии с протоколом, описанным в примере 1. PD1B849 и PD1B878 экспрессировали в двух отдельных клеточных линиях CHO, причем одна линия производила антитела с нормальным для CHO профилем гликозилирования, а другая производила антитела, имеющие сниженное содержание углевода фукозила (например, низкофукозная (LF) клеточная линия). Антитела, экспрессированные в низкофукозной клеточной линии, имели содержание фукозила около 1-15%.

PD1B849 и PD1B878 вызывали ADCC в активированных Т-клетках памяти как в присутствии NK в качестве эффекторных клеток (фиг. 9А, левая панель), так и РВМС (фиг. 9А, правая панель). Антитела с низким содержанием фукозы (PD1B849-LF и PD1B878-LF) демонстрировали более сильную активность ADCC в отношении Т-клеток памяти. PD1B849 и PD1B878 оказались неспособны вызывать определенную ADCC в покоящихся Т-клетках, которые экспрессируют низкие уровни PD-1, в присутствии в качестве эффекторных клеток как NK (фиг. 10А, левая панель), так и РВМС (фиг. 10А, правая панель). PD1B849-LF и PD1B878-LF вызывали низкий уровень ADCC в присутствии NK-клеток или РВМС.

Пример 11. Агонистические антитела к PD-1 не вызывают CDC.

PD1B849 и PD1B878 тестировали на способность опосредовать CDC для активированных общих Т-клеток при добавлении кроличьего комплемента. Активированные Т-клетки имеют более высокую экспрессию PD-1 по сравнению с покоящимися Т-клетками. Эксперимент проводили в соответствии с протоколом, описанным в примере 1. PD1B849 и PD1B878 не вызывали CDC активированных Т-клеток в исследуемых концентрациях (фиг. 11). Положительный контроль ОКТЗ демонстрировал CDC-активность в отношении активированных Т-клеток в присутствии, но не в отсутствие комплемента.

Пример 12. Антитела с созревшей аффинностью не блокируют связывание PD-1 с PD-L1.

Выбранные антитела тестировали на способность блокировать связывание декстрамеризованного PD-L1-Fc с экспрессирующими PD-1 клетками Jurkat. Эксперимент проводили в соответствии с протоколом, описанным ниже. PD1B878, PD1B1090 и PD1B1094 не блокировали связывание PD-L1 в исследуемых концентрациях (фиг. 12). В качестве положительного контроля было показано известное антитело-антагонист, которое конкурирует с PD-L1 за связывание с PD-1 дозозависимым образом.

Способ. Биотинилированный PD-L1-Fc (Acro Biosystems) и декстрамеры, конъюгированные с SA и APC (Immudex), готовили в четырехкратной концентрации и смешивали в соотношении 100 нМ:10 нМ в буфере для окрашивания. Для получения отрицательных контролей и контролей неспецифического связывания таким же образом готовили смеси биотинилированного IgG<sub>1</sub>-Fc с декстрамерами и только декстрамеров со средой. Эту смесь накрывали фольгой и инкубировали на льду в течение одного часа при подготовке остальной части эксперимента. Готовили последовательные разведения исследуемых антител в буфере для окрашивания с двукратной концентрацией по 20, 2 и 0,2 нМ. Клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1, собирали в день анализа и однократно промывали буфером для окрашивания (BD Pharmingen) путем центрифугирования клеток при 300 g в течение 5 мин при 4°C. Клетки подсчитывали, проверяли на жизнеспособность и ресуспендировали в концентрации 2×10<sup>6</sup> клеток/мл в буфере для окрашивания. Клетки добавляли по 25 мкл/лунка (50 000 клеток/лунка) в 96-луночный планшет для анализа с U-образным дном с последующим добавлением подготовленных исследуемых антител по 50 мкл/лунка. Клетки с антителами инкубировали на льду в течение 15 мин. Предварительно смешанные комплексы PD-L1-Fc:декстрамер, биотинилированный IgG<sub>1</sub>-Fc:декстрамер и декстрамеры:буфер добавляли по 25 мкл в лунку. Эту смесь клеток, антител и PD-L1, связанного с декстрамерами, инкубировали на льду в течение 1 ч и закрывали фольгой.

Клетки дважды промывали путем добавления 150 мкл буфера для окрашивания, центрифугировали при 300 g в течение 5 мин для осаждения клеток и встряхивали планшеты для удаления супернатанта. Клеточный осадок после последней промывки ресуспендировали в 40 мкл подвижного буфера IntelliCyt (буфер BD для окрашивания с добавлением 1 mM ЭДТА и 0,1% плуроновой кислоты), содержащего разведенный 1: 1000 зеленый краситель на жизнеспособность клеток Sytox green live/dead cell (ThermoFisher). Конечные концентрации антител в анализе составляли 10, 1 и 0,1 нМ. Конечная концентрация биотинилированного белка лиганда PD-L1-Fc составляла 25 нМ. Конечная концентрация декст-

рамера составила 2,5 нМ.

Планшеты анализировали на приборе iQue Screener (IntelliCyt). Вкратце клетки гейтировали на FCS/SCS для удаления мусора. Синглеты гейтировали на SCS-A/SCS-H и из популяции синглетов гейтировали живые клетки на канале с низким BL1 как отрицательные по зеленому окрашиванию Sytox на жизнеспособность. Процентное содержание положительных живых клеток, связывающихся с комплексами PD-L1-Fc-декстрамер, оценивали по геометрическим средним на канале RL1/APC и сравнивали с отрицательным контролем, связывание только с комплексом декстрамер-Fc. С использованием продвинутых показателей в программном обеспечении ForeCyt (программное обеспечение компании IntelliCyt) вычисляли положительную по PD-1 популяцию в % от популяции живых клеток. Процентное значение специфического связывания с PD-L1 рассчитывали следующим образом:

$$(\% \text{ положительных с mAb} - \% \text{ положительных с комплексом IgG}_1\text{-Fc биотин декстрамер}) / (\% \text{ положительных с изотипическим контролем} - \% \text{ положительных с комплексом IgG}_1\text{-Fc биотин декстрамер}) \times 100.$$

Конечные результаты сведены в таблицу Excel и графически представлены в Prism, с демонстрацией % связывания лиганда PD-L1 в присутствии mAb к PD-1.

Пример 13. Агонистические антитела к PD-1 эффективны в мышинной модели реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD).

Для изучения влияния mAb-агонистов PD-1 на патогенные Т-клетки *in vivo* была разработана модель реакции ксеногенного трансплантата против хозяина (Xeno-GVHD) путем адоптивного переноса мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) мышам линии NOD-scid IL-2R $\gamma^{\text{null}}$  (NSG) с иммунной недостаточностью. Самки мышей линии NSG (возраст 7-9 недель) были получены из Jackson Labs. Перед использованием мыши были помещены в карантин в виварии на одну неделю. Замороженные PBMC человека, выделенные из лейкоцитарной пленки, были получены от компании AllCells, г. Аламеда, штат Калифорния, США. Перед инъекцией замороженные клетки быстро размораживали при 37°C на водяной бане и промывали 3 раза стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS) путем центрифугирования при 500 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Клетки суспендировали в холодном PBS с получением конечной концентрации клеток 50×10<sup>6</sup>/мл.

Животных рандомизировали по массе тела и разделяли на различные группы лечения (N=10/группа). После рандомизации находящиеся в сознании и свободно перемещающиеся мыши получали облучение всего тела 100 рад (1 Гр) при помощи прибора Gammacell® 3000 Elan Irradiator (9,72 Гр/мин). Мышей возвращали обратно в клетки, где они содержались.

Каждая мышь получала 25×10<sup>6</sup> человеческих PBMC в объеме 500 мкл внутрибрюшинно. Ежедневно регистрировали показатели клинической оценки и массу тела каждого животного в соответствии с табл. 31. Мышей, потерявших ≥20% от массы тела, умерщвляли, и регистрировали их показатели клинической оценки в конечной точке в соответствии с рекомендациями организации IACUC. Всех животных подвергали эвтаназии на 21 день. Отбирали селезенки для анализа цитометрией посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS). Для гистологического анализа отбирали ткани кожи и толстой кишки.

Таблица 31

Описание	Показатели клинической оценки
Обычное состояние бодрости и реакций	0
Взъерошенная шерсть, сниженная активность, выделения из глаз	1
Сутулая поза, умеренная гипотермия или гипертермия, затрудненное дыхание при подталкивании	2
Затрудненное дыхание в покое, атаксия, тремор, гипотермия или гипертермия	3
Потеря способности к перемещению при подталкивании, бессознательное состояние	4
Смерть	5

Мышам внутрибрюшинно вводили 10 мг/кг mAb PD1B505, PD1B506, PD1B849 и PD1B878, которые были клонированы как химерные антитела mIgG2a, а также mAb-антагонисты к PD-1 (PD1B786 на мышинном эффекторном неактивном Fc) по схеме дважды в день 4 дня/дважды в день 3 дня (введение в дни 0, 4, 7, 11, 14 и 18). CTLA-4-Ig, который использовали в качестве контроля, вводили по схеме дважды в день 3 дня (день 0, 3, 6, 9, 12, 15 и 18) 10 мг/кг внутрибрюшинно.

После завершения исследования селезенки извлекали в холодную среду RPMI1640. После протирания селезенки через фильтр 70 мкм и осаждения клеток центрифугированием при 1200 об/мин в течение 5 мин при 4°C, эритроциты лизировали в лизирующем буфере ACK (Lonza) на льду в течение 5 мин и

многократно промывали в буфере для цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) (PBS/0,5% BSA/2 mM EDTA). Жизнеспособность спленоцитов оценивали путем окрашивания клеток красителем на жизнеспособность eF506 (eBioscience) в соответствии с инструкциями производителя. Спленоциты инкубировали с блокировщиком человеческого и мышинного Fc (BD Biosciences) на льду в течение 15 мин, затем окрашивали оптимальными концентрациями конъюгированных с флуорохромом mAb ( $1 \times 10^6$  клеток в 100 мкл буфера Brilliant Stain) в микротитровальных планшетах с U-образным дном при 4°C в течение 30 мин и фиксировали буфером Fixation (BD Biosciences). К каждому образцу добавляли гранулы Count Brite (ThermoFisher). В качестве отрицательных контролей для каждого фторохрома готовили FMO-контроли (флуоресценция минус один). Образцы анализировали на приборе LSRII (BD Biosciences). Для анализа на регуляторные Т-клетки использовали следующие mAb: антитело к человеческому CD45/белок перидинин-хлорофилл-альфа (PCP, клон 2D1), антитело к FoxP3/аллофикиоцианин (APC, клон pCH101), антитело к человеческому CD3 /аллофикиоцианин 7 (APC-Cy7, клон HIT3a), антитело к человеческому CD4/Brilliant Violet 605 (BV605, клон OKT4) и антитело к человеческому CD25/Brilliant violet 650 (BV650, клон M-A251). Регуляторные Т-клетки определяли как hCD45<sup>+</sup> hCD3<sup>+</sup> hCD4<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>.

На фиг. 13А показано, что обработка PD1B505-mIgG2a и PD1B506-mIgG2a предотвращала развитие заболевания в мышинной модели GvHD. На фиг. 13В показано, что обработка PD1B505-mIgG2a и PD1B506-mIgG2a предотвращала потерю веса в мышинной модели GvHD. На фиг. 14А показано, что обработка PD1B849-mIgG2a и PD1B878-mIgG2a предотвращала развитие заболевания в мышинной модели GvHD. На фиг. 14В показано, что обработка PD1B849-mIgG2a и PD1B878-mIgG2a предотвращала потерю веса в мышинной модели GvHD. Уменьшение потери веса и показателей клинической оценки было связано с увеличением числа регуляторных Т-клеток в селезенке. На фиг. 15 показана частота появления Treg в селезенке животных, обработанных PD1B849-mIgG2a или PD1B878-mIgG2a.

Пример 14. Агонистические антитела к PD-1 уничтожают фолликулярные Т-хелперы (T<sub>FH</sub>) и периферические Т-хелперы (T<sub>PH</sub>).

Человеческие РВМС извлекали из криохранилища с жидким азотом и быстро размораживали на водяной бане при 37°C до полного оттаивания. Содержимое флакона переносили в стерильную коническую пробирку емкостью 50 мл (для каждого донора использовали отдельные пробирки) и добавляли в каждую пробирку по каплям полную среду RPMI (10% FBS, 1× пенициллин/стрептомицин, 1× пируват натрия) до общего объема 15 мл. Клетки центрифугировали при 250 g в течение 10 мин при комнатной температуре, затем удаляли супернатант и ресуспендировали клетки в 5-10 мл полной среды и подсчитывали с использованием вытеснения трипанового синего. Клетки ресуспендировали в концентрации  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл и сеяли по  $2,5 \times 10^5$  клеток/лунка (=100 мкл в лунке) в трех повторностях в 96-луночный стерильный полистирольный планшет с U-образным дном. mAb к PD-1 или изотипический контроль - человеческий IgG<sub>1</sub> - разводили до четырехкратной конечной концентрации и добавляли по 50 мкл/лунка в соответствующие лунки. После добавления антител добавляли сыворотку здорового человека до конечной концентрации 5%. Общий объем в каждой лунке составил 200 мкл, и клетки инкубировали в течение 96 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. В дополнение к пробам на несколько дополнительных лунок наносили клетки, добавляли 5% человеческой сыворотки и инкубировали вместе с обработанными пробами в качестве контролей для окрашивания в проточной цитометрии.

После инкубации планшеты центрифугировали при 350 g в течение 5 мин и откачивали воздух от супернатантов. Клетки ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержимое лунок-повторов объединяли и переносили на новый 96-луночный планшет с U-образным дном для окрашивания в проточной цитометрии. Объединенные клетки центрифугировали при 350 g в течение 5 мин, от супернатантов откачивали воздух и в каждую лунку с образцом добавляли флуоресцентный коктейль антител (таблица использованных антител приведена ниже). Дополнительные клетки, предназначенные для контролей, окрашивали коктейлями FMO для выявления критических маркеров, таких как, помимо прочего, PD-1, CXCR5, ICOS, для применения в анализе с целью гейтирования. Клетки окрашивали в течение 25 мин в темноте при комнатной температуре, а затем центрифугировали при 350 g в течение 5 мин. Клетки дважды промывали в 200 мкл PBS, после чего в каждую лунку добавляли по 100 мкл 4%-го параформальдегида для фиксации клеток. Клетки фиксировали в течение 10 мин в темноте при 4°C, затем промывали один раз PBS+1% BSA и ресуспендировали в 200 мкл PBS+1% BSA. Гранулы для подсчета (Invitrogen) добавляли в количестве 5 мкл/лунка (5000 гранул) на каждую пробу и анализировали пробы на проточном цитометре BD LSRII. Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo. Подсчет проб нормализовали по количеству гранул следующим образом: кол-во клеток в образце=(кол-во подсчитанных клеток×5000 добавленных гранул)/(кол-во подсчитанных гранул). Образцы нормализовали по изотипическому контролю - huIgG<sub>1</sub> - следующим образом:

(нормализованное по гранулам количество клеток "образца"/нормализованное по гранулам количество клеток "изотипа")×100 и выражали в процентах (%).

Для данных построили графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (7 версия).

В ходе анализа были описаны следующие популяции клеток:

фолликулярные Т-хелперы (Т<sub>ФН</sub>): живые, CD19<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>/HLADR<sup>+</sup>/CXCR5<sup>+</sup>/ICOS<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>; периферические Т-хелперы (Т<sub>РН</sub>): живые, CD19<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>/HLADR<sup>+</sup>/CXCR5<sup>+</sup>/ICOS<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>; комбинированная популяция Т<sub>ФН</sub>/Т<sub>РН</sub>: живые, CD19<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>/HLADR<sup>+</sup>/ICOS<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>.

На фиг. 16 показана кривая зависимости доза-эффект для уменьшения численности объединенной популяции Т<sub>ФН</sub>/Т<sub>РН</sub>, опосредованного антителами PD1B878, PD1B878-FL (низкофукозное), PD1B1090 и PD1B1094. Данные представлены в виде среднего % изменения численности клеток Т<sub>ФН</sub>/Т<sub>РН</sub> относительно изотипического контроля при использовании n=8 здоровых доноров-людей (n=7 для PD1B1090). Антитело PD1B878-FL наиболее эффективно уменьшало численность популяции Т<sub>ФН</sub>/Т<sub>РН</sub>.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-1, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 и 7 соответственно.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет одно, два, три, четыре или пять из следующих свойств:

а) не блокировать связывание PD-L1 с PD-1; причем отсутствие блокирования измеряют по неспособности антитела ингибировать кластеризацию клеток, экспрессирующих PD-L1, и клеток, экспрессирующих PD-1, как описано в примере 1;

б) связываться с PD-1 с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $5 \times 10^{-8}$  М или менее, причем  $K_D$  измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C;

в) связываться с PD-1 с константой ассоциации ( $K_a$ ) около  $3 \times 10^4$  1/Мс или более, причем  $K_a$  измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C;

г) связываться с PD-1 с константой диссоциации ( $K_d$ ) около  $3 \times 10^{-3}$  1/с или менее, причем  $K_d$  измеряют с помощью системы ProteOn XPR36 при +25°C; или

е) ингибировать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток; при этом пролиферацию оценивают в анализе CMV-PBMC, как описано в примере 1.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащие:

а) каркас варибельной области тяжелой цепи (VH), полученный из IGHV7-4-1\*1 (SEQ ID NO: 125);

б) каркас варибельной области легкой цепи (VL), полученный из IGKV3D-20\*1 (SEQ ID NO: 126);

или

в) каркас VH, полученный из IGHV7-4-1\*1 (SEQ ID NO: 125) и каркас VL, полученный из IGKV3D-20\*1 (SEQ ID NO: 126).

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, содержащие:

а) варибельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 10;

б) варибельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 16; или

в) VH и VL с SEQ ID NO: 10 и 16 соответственно.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент:

а) является агонистом PD-1;

б) опосредует антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) клеток, экспрессирующих PD-1; или

в) является агонистом PD-1 и опосредует ADCC клеток, экспрессирующих PD-1.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, причем клетки, экспрессирующие PD-1, представляют собой активированные Т-клетки памяти, фолликулярные хелперные Т-клетки (Т<sub>ФН</sub>), периферические хелперные Т-клетки (Т<sub>РН</sub>) или любую их комбинацию.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет изотип IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> или IgG<sub>4</sub>.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит в Fc антитела по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует связывание антитела с рецептором Fc (FcR).

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, причем по меньшей мере одна мутация представляет собой:

а) мутацию S267E;

б) мутацию S267D;

в) мутацию S267E/I332E;

г) мутацию S267E/L328F;

д) мутацию G236D/S267E;

е) мутацию P238D; или

ж) мутацию P238D/E233D/G237D/H268D/P271G/A330R.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, причем антитело

содержит:

- a) тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 22;
- b) легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 28; или
- c) HC с SEQ ID NO: 22 и LC с SEQ ID NO: 28.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет 2-антенарную структуру гликанов с содержанием фукозы в диапазоне от около 1% до около 15%.

12. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11.

13. Вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид по п.12.

14. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.13.

15. Клетка-хозяин по п.14, которая представляет собой эукариотическую клетку, прокариотическую клетку, клетку CHO, клетку HEK293 или гибридому.

16. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п.14 в условиях, при которых экспрессируется антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая:

- a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11; и
- b) фармацевтически приемлемый носитель.

18. Способ подавления активации Т-клетки, экспрессирующей PD-1, у пациента, включающий введение пациенту выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11 в течение времени, достаточного для подавления активации Т-клетки, экспрессирующей PD-1.

19. Способ по п.18, в котором Т-клетка, экспрессирующая PD-1, представляет собой антиген-специфическую Т-клетку CD4<sup>+</sup> и/или антиген-специфическую Т-клетку CD8<sup>+</sup>.

20. Способ снижения иммунного ответа, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11.

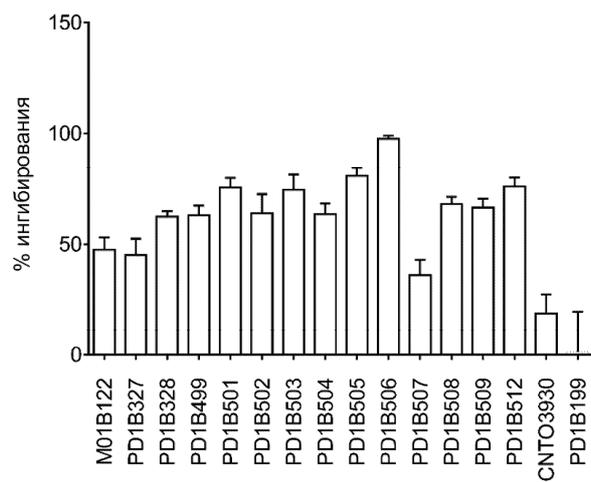
21. Способ лечения иммунного расстройства, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-11.

22. Способ по п.21, в котором иммунное расстройство представляет собой волчанку, системную красную волчанку, синдром Шегрена, артрит, ревматоидный артрит, астму, ХОБЛ, воспалительное заболевание тазовых органов, болезнь Альцгеймера, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, болезнь Пейрони, целиакию, заболевание желчного пузыря, пилонидальную болезнь, перитонит, псориаз, псориатический артрит, васкулит, хирургические спайки, инсульт, диабет I типа, болезнь Лайма, менингоэнцефалит, аутоиммунный увеит, рассеянный склероз, синдром Гийена-Барре, atopический дерматит, аутоиммунный гепатит, фиброзирующий альвеолит, базедову болезнь, обусловленную IgA нефропатию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, болезнь Меньера, пузырчатку, первичный билиарный цирроз, саркоидоз, склеродермию, гранулематоз Вегенера, другие аутоиммунные расстройства, панкреатит, реакцию "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата, бесплодие, связанное с отсутствием толерантности плода к матери, синдром Шегрена, витилиго, миастению гравис или системную склеродермию.

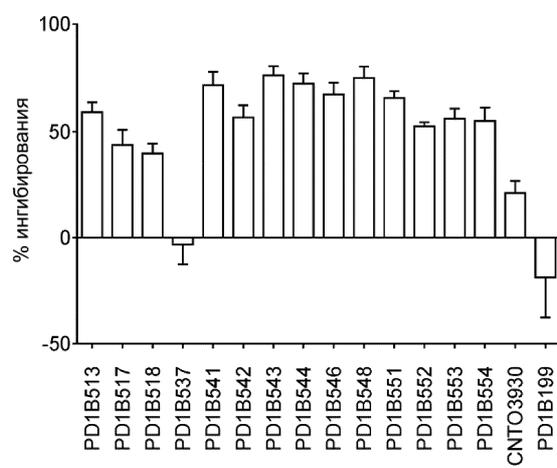
23. Способ по любому из пп.18-22, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводятся в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

24. Иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, конъюгированные с детектируемой меткой.

25. Иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, конъюгированные с цитотоксическим агентом.



Фиг. 1А



Фиг. 1В

1  
 PD1H93\_8 DVQLQESGPELKKPGETVKISCKASGYTFT  
 PD1H384\_9 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFT  
 PD1H405\_10 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFT  
 PD1H585\_140 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFT  
 PD1H586\_141 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFT  
 PD1H587\_142 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFT  
 :\*\*\* :\*\*.\*\*\*\*\*\* :\*\*:\*\*\*\*\*\*

PD1H93\_8 DYSMHWVKQAPGKGLKWMGWINIETGEPTY  
 PD1H384\_9 DYSMHWVRQAPGQGLEWWMGWINIETGEPTY  
 PD1H405\_10 DYSMHWVRQAPGQGLEWWMGWINIETGEPTY  
 PD1H585\_140 DYSMHWVRQAPGQGLEWWMGWINIETGYPTY  
 PD1H586\_141 DYSMHWVRQAPGQGLEWWMGWINIETGHPTY  
 PD1H587\_142 DYSMHWVRQAPGQGLEWWMGWINIETGWPTY  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*:\*:\*\*\*\*\*\* \*\*

PD1H93\_8 ADDFKGRFAPSLETSASTAYLQINNLKNE  
 PD1H384\_9 AQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQICSLKAED  
 PD1H405\_10 AQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAED  
 PD1H585\_140 AQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAED  
 PD1H586\_141 AQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAED  
 PD1H587\_142 AQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAED  
 \*:.\*.\*\*\*.\*\*\*:\*\*\*.\*\*\*\*\*\* .\*\* \*\*

121  
 PD1H93\_8 TATYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS  
 PD1H384\_9 TAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS  
 PD1H405\_10 TAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS  
 PD1H585\_140 TAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS  
 PD1H586\_141 TAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS  
 PD1H587\_142 TAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS  
 \*\*.\*\*\*\*\*\*:\*\*\*\*:\*\*\*

Фиг. 2А

1  
 PD1L30\_14 QIVLTQSPA<sup>1</sup>IMASASLGERVTMTCTASSSVS  
 PD1L468\_15 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVS  
 PD1L469\_16 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVS  
 PD1L651\_143 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSFS  
 PD1L652\_144 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVP  
 :\*\*\*\*\* :\* \* \* \* .\*:\*\*\*\*\*..

PD1L30\_14 SSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVP  
 PD1L468\_15 SSYLHWYQQKPLAPRLLIYSTSNLASGIP  
 PD1L469\_16 SSYLHWYQQKPLAPRLLIYSTSNLASGIP  
 PD1L651\_143 SSYLHWYQQKPLAPRLLIYSTSNLASGIP  
 PD1L652\_144 SSYLHWYQQKPLAPRLLIYSTSNLASGIP  
 \*\*\*\*\* :\*:\*\*\*\*\*:\*

PD1L30\_14 ARFSGSGSGTSYSLTIS<sup>1</sup>SMEAEDAATYYCH  
 PD1L468\_15 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCH  
 PD1L469\_16 DRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCH  
 PD1L651\_143 DRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCH  
 PD1L652\_144 DRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCH  
 \*\*\*\*\*.:\*\*\*\*:\*\*\*.\*\*\*\*\*\*

108  
 PD1L30\_14 QYHRSPLTFGAGTKLELK  
 PD1L468\_15 QYHRSPLTFGQGTKLEIK  
 PD1L469\_16 QYHRSPLTFGQGTKLEIK  
 PD1L651\_143 QYHRSPLTFGQGTKLEIK  
 PD1L652\_144 QYHRSPLTFGQGTKLEIK  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*

Фиг. 2В

1  
 PD1H90 QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT  
 PD1H388 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT  
 PD1H399 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT  
 PD1H400 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT  
 PD1H401 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT  
 PD1H402 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT  
 PD1H403 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT  
 PD1H404 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT  
 \*\*\*\* \* .\*\*\*: \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

PD1H90 TYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPNNGGINY  
 PD1H388 TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNNGGINY  
 PD1H399 TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNNAGINY  
 PD1H400 TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNDAGINY  
 PD1H401 TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNQGGINY  
 PD1H402 TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNKGGINY  
 PD1H403 TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNEGGINY  
 PD1H404 TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNNIGINY  
 \*\*\*\*\*: \* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* . \*\*\*\*

PD1H90 NEKFKKKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSED  
 PD1H388 AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDD  
 PD1H399 AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDD  
 PD1H400 AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDD  
 PD1H401 AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDD  
 PD1H402 AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDD  
 PD1H403 AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDD  
 PD1H404 AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDD  
 :\*\* : .\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\* \* \* :\*

117

PD1H90 SAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS  
 PD1H388 TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS  
 PD1H399 TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS  
 PD1H400 TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS  
 PD1H401 TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS  
 PD1H402 TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS  
 PD1H403 TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS  
 PD1H404 TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS  
 :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*

Фиг. 3А

1  
 PD1L28 DIVMTQSQKFMSTSVRDRVSVTCKASQNVG  
 PD1L470 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVG  
 PD1L471 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVG  
 \*\* \*\*\*\* . :\*:\*\* \*\*\*:\*\*\*\*\*

PD1L28 TNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSQVDP  
 PD1L470 TNVAWYQQKPEKAPKSLIYSASYRYSQVPS  
 PD1L471 TNVAWYQQKPEKAPKALIYSASYRYSQVPS  
 \*\*\*\*\* :\*:\*\*\*\*\*

PD1L28 RFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLAEYFCQQ  
 PD1L470 RFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ  
 PD1L471 RFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQ  
 \*\*:\*\*\*\*\*:\*. \* :\*\*\* \* :\*\*\*

107

PD1L28 YNIYPYTFGSGTKLEMK  
 PD1L470 YNIYPYTFGQGTKLEIK  
 PD1L471 YNIYPYTFGQGTKLEIK  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Фиг. 3В

043064

1  
PD1H81 QVTLKESGPGLLQPSQTLTSLTCSFSGFSL  
PD1H389 QITLKESGPTLVKPTQTLTTLCTFSGFSL  
\*:\*\*\*\*\* \*:\*:\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*

PD1H81 TSGMGVSWIRQPSGKLEWLAHIYWDDDKR  
PD1H389 TSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKR  
\*\*\*\*\*.\*.\*\*\*\*\*

PD1H81 YNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTA  
PD1H389 YSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPV  
\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*.\*.\*.:\*.:\*..

122  
PD1H81 DTGTYYCVRKGYDYGYVMDYWGQGTVTVSS  
PD1H389 DTGTYYCVRKGYDYGYVMDYWGQGLVTVSS  
\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Фиг. 4А

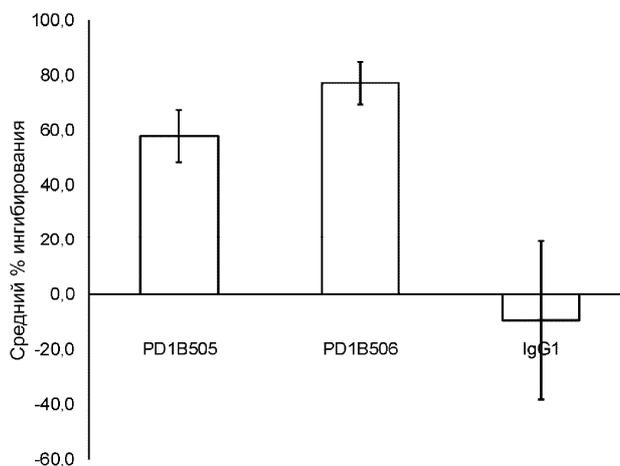
1  
PD1L43 DIVMTQAALSNPVTLGTSASISCRSSKSL  
PD1L472 DIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSKSL  
PD1L473 DIVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSKSL  
\*\*\*\*\*.\*.\* \*\* \* \* .\*\*\*\*\*

PD1L43 HSNGITYLNWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA  
PD1L472 HSNGITYLNWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA  
PD1L473 HSNGITYLNWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA  
\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

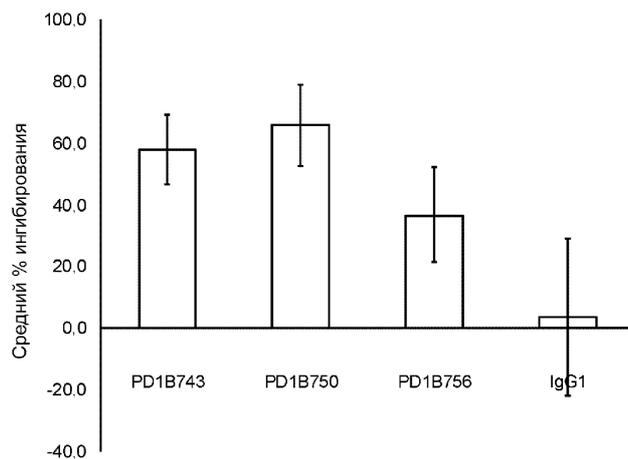
PD1L43 SGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV  
PD1L472 SGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV  
PD1L473 SGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV  
\*\*\*\*\*.\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

112  
PD1L43 YYCAQNLELPLTFGSGTKLEMK  
PD1L472 YYCAQNLELPLTFGGTKVEIK  
PD1L473 YYCAQNLELPLTFGGTKVEIK  
\*\*\*\*\*.\*.\*:\*\*\*:\*\*\*

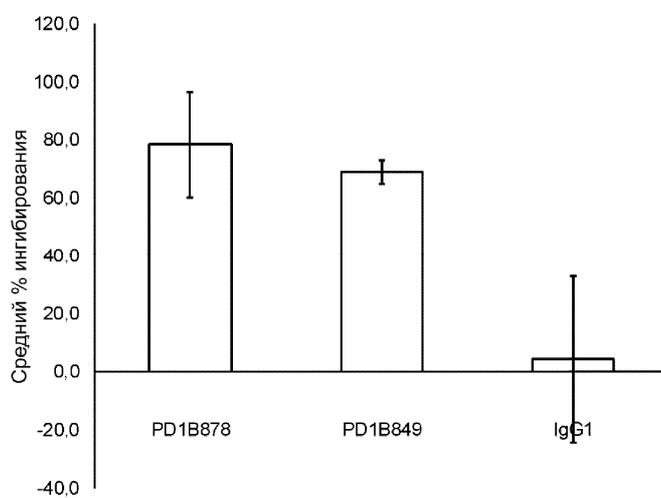
Фиг. 4В



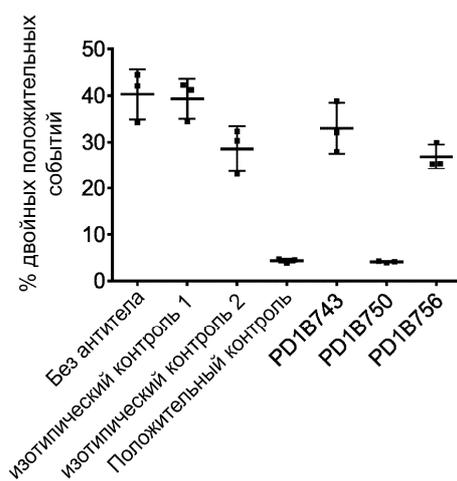
Фиг. 5А



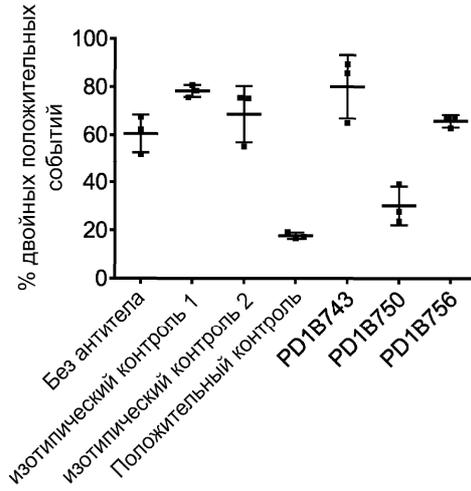
Фиг. 5B



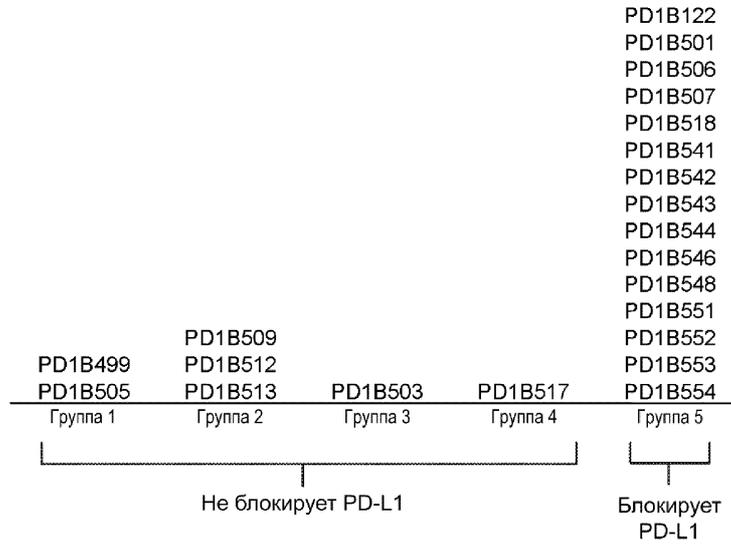
Фиг. 5C



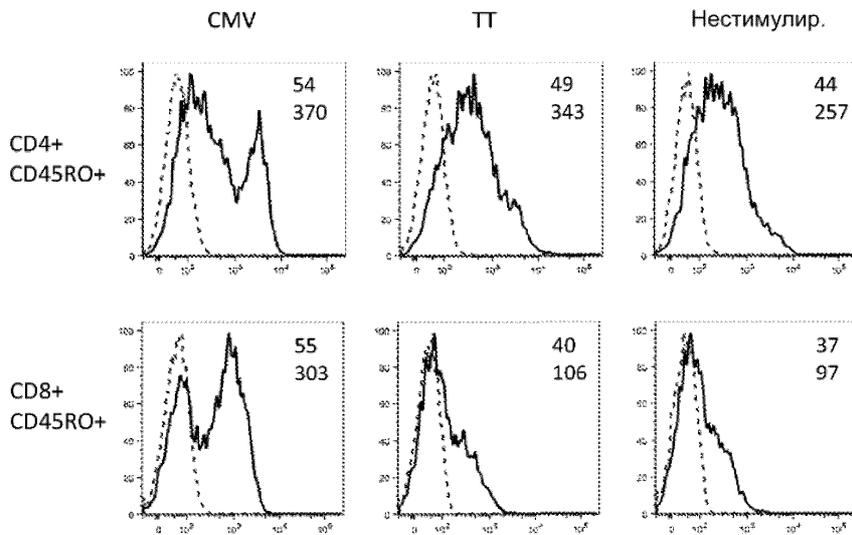
Фиг. 6A



Фиг. 6B

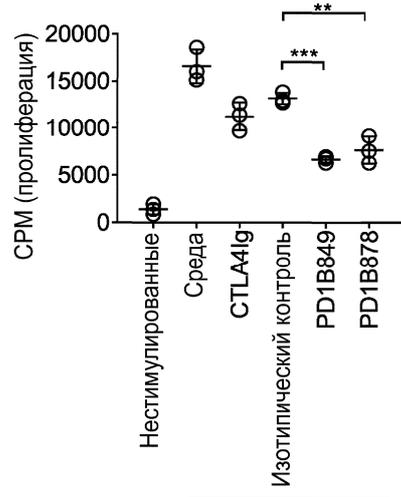


Фиг. 7

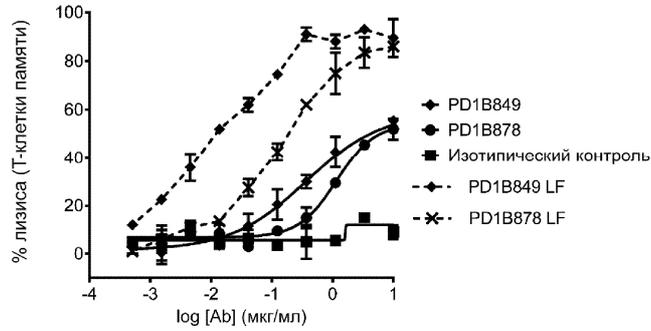


Фиг. 8A

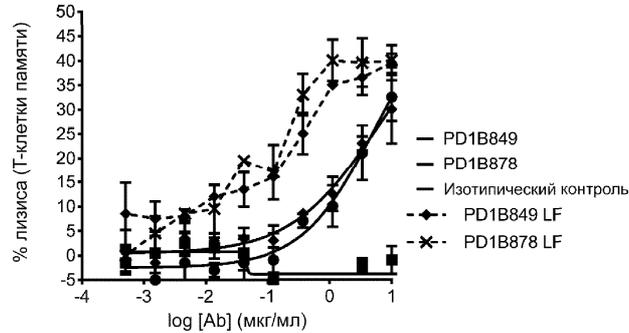
043064



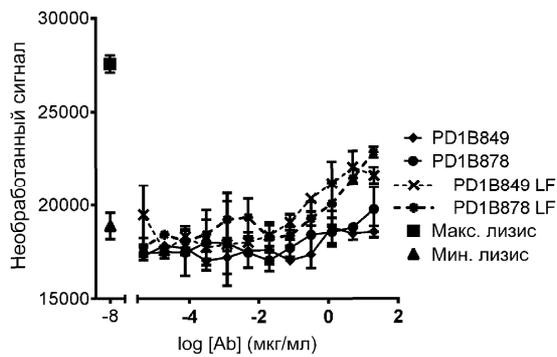
+ смесь пептидов CMV  
Фиг. 8B



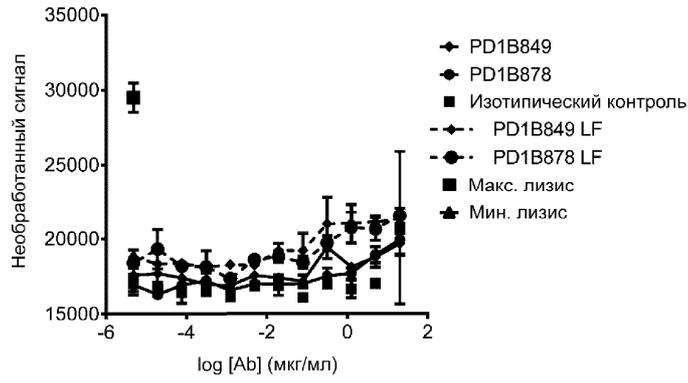
Фиг. 9А



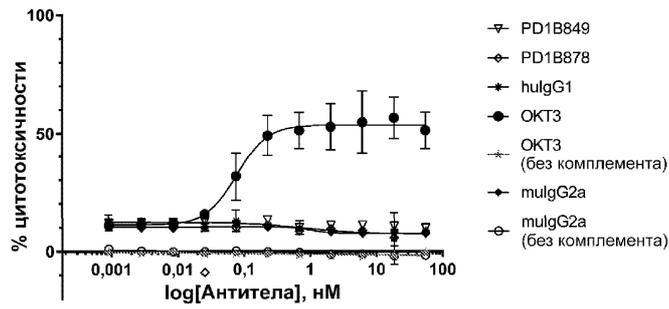
Фиг. 9B



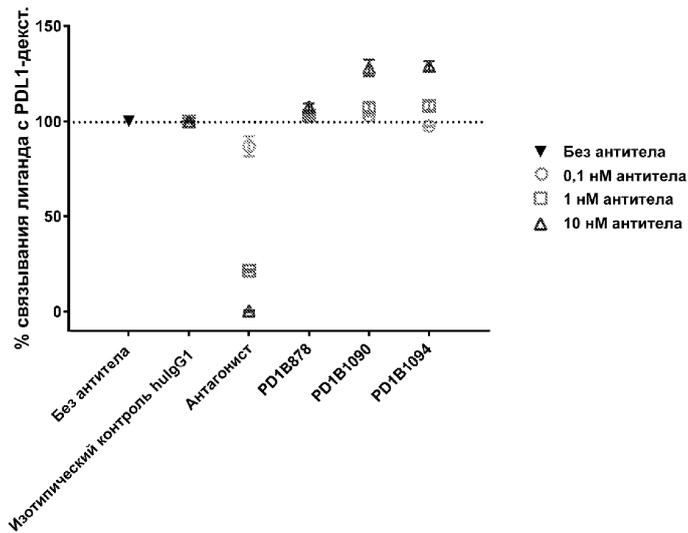
Фиг. 10А



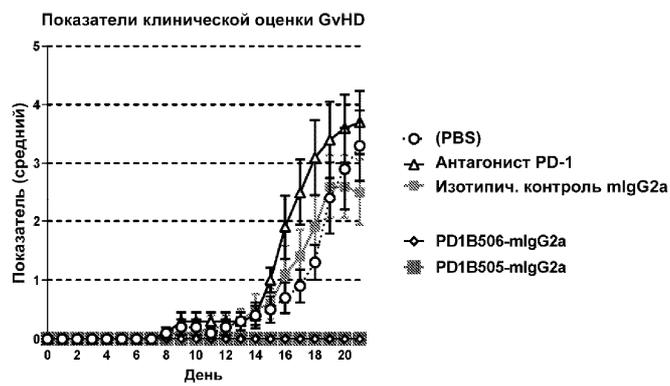
Фиг. 10В



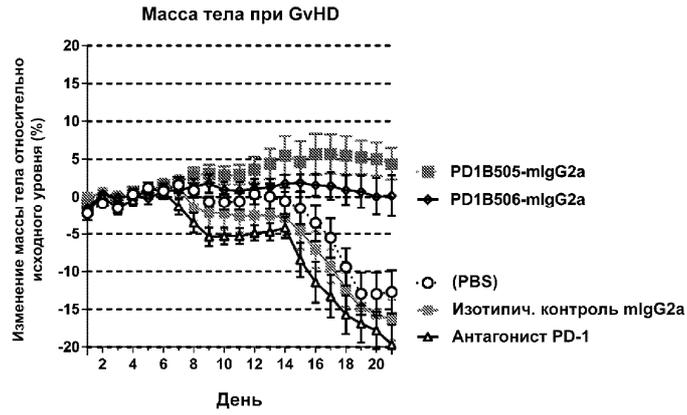
Фиг. 11



Фиг. 12



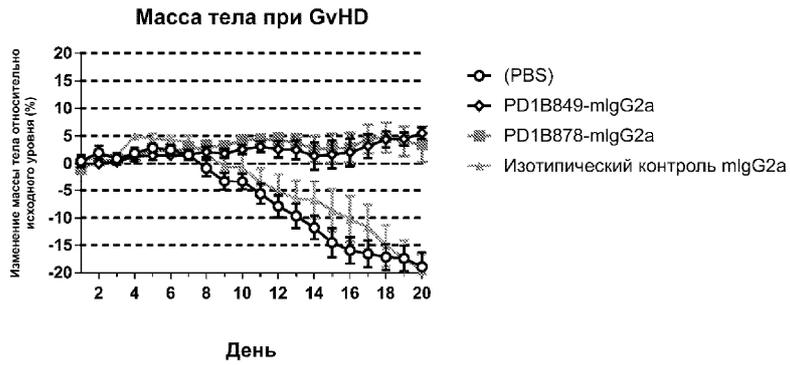
Фиг. 13А



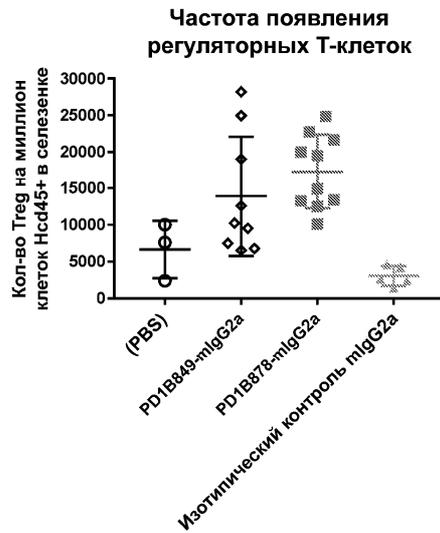
Фиг. 13В



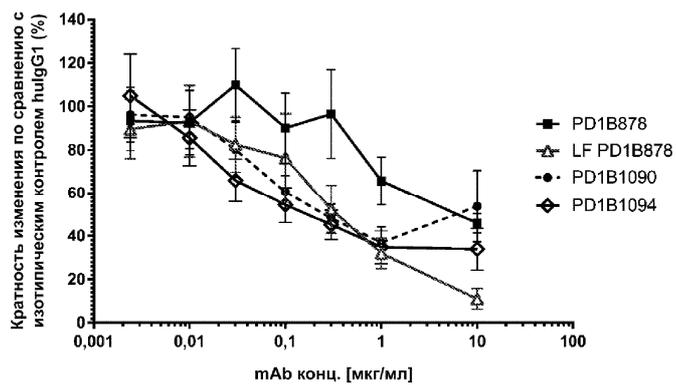
Фиг. 14А



Фиг. 14В



Фиг. 15



Фиг. 16

