



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.01.26

(21) Номер заявки
201991546

(22) Дата подачи заявки
2017.12.21

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ПРОТИВ НЕЙРОПИЛИНА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/438,733

(32) 2016.12.23

(33) US

(43) 2020.01.17

(86) PCT/US2017/067782

(87) WO 2018/119171 2018.06.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПОТЕНЗА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Хиклин Даниэл, Зайдель-Дуган
Синтия, Уинстон Уилльям,
Сальмерон-Гарсия Хосе-Андрес,
Нильсон Нельс П., Бродкин Хитер
(US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2007056470
WO-A2-2014058915
LIANG W.C. ET AL.: "Function Blocking Antibodies to Neuropilin-1 Generated from a Designed Human Synthetic Antibody Phage Library", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 366, № 3, 23 February 2007 (2007-02-23), p. 815-829, XP026268831, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2006.11.021 [retrieved on 2007-02-01], the whole document, p. 817, col. 1, table 1; p. 819, col. 2, par 2-3; p. 822-823

WO-A1-2012006503

APPLETON BRENT A. ET AL.: "Structural studies of neuropilin/antibody complexes provide insights into semaphorin and VEGF binding", EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, WILEY, DE, vol. 26, № 23, 28 November 2007 (2007-11-28), p. 4902-4912, XP002504809, ISSN: 0261-4189, DOI: 10.1038/SJ.EMBOJ.7601906, cited in the application, the whole document

GREG M. DELGOFFE ET AL.: "Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis", NATURE, vol. 501, № 7466, 4 August 2013 (2013-08-04), p. 252-256, XP055250992, GB, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature12428, cited in the application, the whole document

-& GREG M. DELGOFFE ET AL.: "Supplementary Information: Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis", NATURE, vol. 501, № 7466, 4 August 2013 (2013-08-04), p. 252-256, XP055462706, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature12428, claims, fig. 2, examples; the whole document

WO-A2-2008143666

T.-H. SHIN ET AL.: "Enhancement of the Tumor Penetration of Monoclonal Antibody by Fusion of a Neuropilin-Targeting Peptide Improves the Antitumor Efficacy", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 13, № 3, 16 January 2014 (2014-01-16), p. 651-661, XP055196026, ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0748, the whole document

(57) Изобретение относится к антигенсвязывающим белкам (АВР), которые селективно связываются с NRP-1 и с его изоформами и гомологами, а также к композициям, содержащим АВР. Также оно относится к способам применения АВР, таким как терапевтические и диагностические способы.

Область техники

Изобретение относится к антигенсвязывающим белкам (ABP), обладающим специфичностью связывания с NRP-1, и композициям, содержащим такие ABP, включая фармацевтические композиции, диагностические композиции и наборы. Также оно относится к способам получения ABP NRP-1 и способам применения ABP NRP-1, например, в терапевтических целях, диагностических целях и исследовательских целях.

Уровень техники

Многочисленные исследования продемонстрировали, что опухоли способны создавать иммуносупрессивное микроокружение, чтобы избежать иммунного надзора и способствовать развитию опухолей. Регуляторные Т-клетки (Treg) являются важным компонентом иммуносупрессивной среды в опухолевом окружении и действуют путем ослабления Т-клеточного иммунитета по отношению к опухолеспецифическим антигенам. Следовательно, Treg являются основным препятствием на пути эффективного противоопухолевого иммунного ответа. Истощение Treg в мышиных моделях злокачественных новообразований ингибирует рост опухоли; однако сопутствующие аутоиммунные и воспалительные расстройства, связанные с полным истощением Treg, могут ограничивать клиническую полезность этого подхода. Стратегии, которые конкретно нацелены на Treg в воспалительном микроокружении опухолей, могут быть жизнеспособной альтернативой. Недавние исследования в нескольких лабораториях выявили нейропептилин 1 (NRP-1) в качестве потенциальной мишени для модуляции активности Treg в опухолях без воздействия на Treg на периферии (см., например, Chaudhary and Elkord, *Vaccines* (2016) Sep; 4(3):28; Bos et al., *J. Exp. Med.* (2013), 210(11):2435-66; Teng et al., *Cancer Res.* (2010), 70 (20):7800-...).

NRP-1 представляет собой многофункциональный трансмембранный белок 130 кДа с большим внеклеточным доменом, содержащим два N-концевых домена CUB (a1 и a2), два гомологичных домена фактора свертывания V/VIII (b1 и b2) и один домен MAM (c). Цитоплазматический хвост короткий, и сам по себе не проявляет каталитической активности. NRP-1 представляет собой рецептор с множеством известных лигандов и ко-рецепторов, включая, среди прочего, семафорины, VEGF, PlGF и плексины (Arpleton et al., *Embo J.* (2007) Nov 28, 26(23):4902-4912).

NRP-1 экспрессируется на Treg человека и мыши, и эта экспрессия идентифицирует высоко-супрессивную подгруппу Treg. В микроокружении опухоли экспрессия NRP-1 необходима для стабильности и функции Treg, но не влияет на Treg вне воспалительной среды опухолей. Недавние исследования идентифицировали экспрессируемый иммунными клетками лиганд семафорин 4A (Sema4a) в качестве дополнительного лиганда для NRP-1, и продемонстрировали, что взаимодействие Sema4a/NRP-1 является важным медиатором стабильности Treg *in vitro* и в местах воспаления *in vivo*. Эти данные предполагают, что NRP-1 необходим для стабильности и функционирования линии Treg (см., например, Delgoffe et al., *Nature* (2013) Sep 12, 501(7466):252-6).

Несколько доказательств подтверждают полезность нацеливания взаимодействия NRP-1 и связанных с ним белков, в частности, нацеливания оси NRP-1/Sema на Treg в качестве стратегии модулирования иммуносупрессивного микроокружения, обнаруженной в опухолях. Например, мыши, нокаутные по NRP-1, нацеленному на Treg, демонстрируют пониженный рост опухоли в нескольких моделях опухолей мыши без каких-либо других аутоиммунных фенотипов. Кроме того, антагонисты NRP-1 или Sema обращают вспять супрессивную активность Treg и снова демонстрируют противоопухолевую эффективность в отсутствие аутоиммунных нежелательных явлений. Кроме того, ось NRP-1-VEGFA была предложена в качестве важного пути, регулирующего хемотаксис Treg в микроокружении опухоли, и антагонистическое Ab, которое блокирует это взаимодействие с Treg, может ингибировать приток этих супрессивных клеток в опухоль.

Появляются доказательства того, что NRP-1 экспрессируется на поверхности иммунных клеток в опухолях человека. NRP-1+ Treg обнаружены в дренирующих лимфатических узлах (DLN) у пациентов с раком шейки матки, и имело место значительное снижение процента Treg в DLN у пациентов с патологическим ответом на предоперационную химиолучевую терапию. Кроме того, NRP-1+Treg наблюдаются в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL) у пациентов с меланомой и плоскоклеточным раком головы и шеи.

Таким образом, существует потребность в терапевтических средствах, которые могут противодействовать NRP-1 без индукции аутоиммунного заболевания. В настоящем изобретении предложены ABP, которые удовлетворяют этой потребности.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены ABP, которые специфично связываются с NRP-1, и способы применения таких ABP.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен выделенный поливалентный антигенсвязывающий белок (ABP), который специфично связывается с человеческим NRP-1 (hNRP-1; SEQ ID NO: 130), где ABP содержит следующие шесть последовательностей CDR:

(a) CDR-H3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47;

(b) CDR-H2, имеющую последовательность $X_1ISGSGGX_2TYYADSVX_3G$, где X_1 представляет собой I или A, X_2 представляет собой S или A и X_3 представляет собой K или E, как представлено в SEQ ID NO: 136;

(c) CDR-H1, имеющую последовательность $FTFX_1SX_2AMV$, где X_1 представляет собой A, K или S и X_2 представляет собой Y или V, как представлено в SEQ ID NO: 137;

(d) CDR-L3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 81;

(e) CDR-L2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71; и

(f) CDR-L1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63.

В одном варианте осуществления ABP содержит CDR-H3 SEQ ID NO: 47, CDR-H2 SEQ ID NO: 27, CDR-H1 SEQ ID NO: 12, CDR-L3 SEQ ID NO: 81 CDR-L2 SEQ ID NO: 71 и CDR-L1 SEQ ID NO: 63; или CDR-H3 SEQ ID NO: 47, CDR-H2 SEQ ID NO: 28, CDR-H1 SEQ ID NO: 13, CDR-L3 SEQ ID NO: 81, CDR-L2 SEQ ID NO: 71 и CDR-L1 SEQ ID NO: 63; или CDR-H3 SEQ ID NO: 47, CDR-H2 SEQ ID NO: 29, CDR-H1 SEQ ID NO: 14, CDR-L3 SEQ ID NO: 81, CDR-L2 SEQ ID NO: 71 и CDR-L1 SEQ ID NO: 63; или CDR-H3 SEQ ID NO: 47, CDR-H2 SEQ ID NO: 30, CDR-H1 SEQ ID NO: 14, CDR-L3 SEQ ID NO: 81, CDR-L2 SEQ ID NO: 71 и CDR-L1 SEQ ID NO: 63.

В другом варианте осуществления ABP содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 92 и последовательность V_L SEQ ID NO: 104; последовательность V_H SEQ ID NO: 93 и последовательность V_L SEQ ID NO: 104; последовательность V_H SEQ ID NO: 94 и последовательность V_L SEQ ID NO: 104; последовательность V_H SEQ ID NO: 95 и последовательность V_L SEQ ID NO: 104; или последовательность V_H SEQ ID NO: 96 и последовательность V_L SEQ ID NO: 104.

В другом варианте осуществления ABP содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 114 и легкую цепь SEQ ID NO: 126; тяжелую цепь SEQ ID NO: 115 и легкую цепь SEQ ID NO: 126; тяжелую цепь SEQ ID NO: 116 и легкую цепь SEQ ID NO: 126; тяжелую цепь SEQ ID NO: 117 и легкую цепь SEQ ID NO: 126; или тяжелую цепь SEQ ID NO: 118 и легкую цепь SEQ ID NO: 126.

В другом аспекте предложен выделенный поливалентный антигенсвязывающий белок (ABP), который специфично связывается с человеческим NRP-1 (hNRP-1; SEQ ID NO: 130), где ABP содержит следующие шесть последовательностей CDR:

(a) CDR-H3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

(b) CDR-H2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

(c) CDR-H1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8;

(d) CDR-L3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 77;

(e) CDR-L2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, и

(f) CDR-L1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59.

В одном варианте осуществления ABP содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 85 и последовательность V_L SEQ ID NO: 100; или последовательность V_H SEQ ID NO: 86 и последовательность V_L SEQ ID NO: 100. В другом варианте осуществления ABP содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 107 и легкую цепь каппа SEQ ID NO: 122; и тяжелую цепь SEQ ID NO: 108 и легкую цепь каппа SEQ ID NO: 122.

В другом аспекте предложен выделенный поливалентный антигенсвязывающий белок (ABP), который специфично связывается с человеческим NRP-1 (hNRP-1; SEQ ID NO: 130), где ABP содержит следующие последовательности CDR:

(a) CDR-H3, имеющую последовательность ARDLGYYGSGMNX, где X представляет собой A или V, как представлено в SEQ ID NO: 138;

(b) CDR-H2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24;

(c) CDR-H1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9;

(d) CDR-L3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78;

(e) CDR-L2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 68; и

(f) CDR-L1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60.

В одном варианте осуществления ABP содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 42, CDR-H2 SEQ ID NO: 24, CDR-H1 SEQ ID NO: 9, CDR-L3 SEQ ID NO: 78, CDR-L2 SEQ ID NO: 68 и CDR-L1 SEQ ID NO: 60; или CDR-H3 SEQ ID NO: 43, CDR-H2 SEQ ID NO: 24, CDR-H1 SEQ ID NO: 9, CDR-L3 SEQ ID NO: 78, CDR-L2 SEQ ID NO: 68 и CDR-L1 SEQ ID NO: 60. В другом варианте осуществления ABP содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 87 и последовательность V_L SEQ ID NO: 101; или ABP содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 88 и последовательность V_L SEQ ID NO: 101. В другом варианте осуществления ABP содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 109 и легкую цепь каппа SEQ ID NO: 123; или ABP содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 110 и легкую цепь каппа SEQ ID NO: 123.

В другом аспекте предложен выделенный поливалентный антигенсвязывающий белок (ABP), который специфично связывается с человеческим NRP-1 (hNRP-1; SEQ ID NO: 130), где ABP содержит следующие шесть последовательностей CDR:

(a) CDR-H3, имеющую последовательность ARDRGMYASGFXP, где X представляет собой G или N, как предложено в (SEQ ID NO: 139);

(b) CDR-H2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25;

(c) CDR-H1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10;

(d) CDR-L3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79;

(e) CDR-L2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69; и

(f) CDR-L1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61.

В одном варианте осуществления ABP содержит CDR-H3 SEQ ID NO: 44, CDR-H2 SEQ ID NO: 25, CDR-H1 SEQ ID NO: 10, CDR-L3 SEQ ID NO: 79, CDR-L2 SEQ ID NO: 69 и CDR-L1 SEQ ID NO: 61; или CDR-H3 SEQ ID NO: 45, CDR-H2 SEQ ID NO: 25, CDR-H1 SEQ ID NO: 10, CDR-L3 SEQ ID NO: 79, CDR-L2 SEQ ID NO: 69 и CDR-L1 SEQ ID NO: 61. В другом варианте осуществления ABP содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 89 и последовательность V_L SEQ ID NO: 102; или последовательность V_H SEQ ID NO: 90 и последовательность V_L SEQ ID NO: 102. В другом варианте осуществления ABP содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 111 и легкую цепь каппа SEQ ID NO: 124; или ABP содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 112 и легкую цепь каппа SEQ ID NO: 124.

В другом аспекте предложен выделенный поливалентный антигенсвязывающий белок (ABP), который специфично связывается с человеческим NRP-1 (hNRP-1; SEQ ID NO: 130), включающий следующие шесть последовательностей CDR:

- (a) CDR-H3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46;
- (b) CDR-H2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26;
- (c) CDR-H1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11;
- (d) CDR-L3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80;
- (e) CDR-L2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70; и
- (f) CDR-L1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62.

В одном варианте осуществления ABP содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 91 и последовательность V_L SEQ ID NO: 103. В другом варианте осуществления ABP содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 113 и легкую цепь каппа SEQ ID NO: 125.

В другом аспекте предложен выделенный поливалентный антигенсвязывающий белок (ABP), который специфично связывается с человеческим NRP-1 (hNRP-1; SEQ ID NO: 130), включающий следующие шесть последовательностей CDR:

- (a) CDR-H3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48;
- (b) CDR-H2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31;
- (c) CDR-H1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15;
- (d) CDR-L3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82;
- (e) CDR-L2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 68; и
- (f) CDR-L1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64.

В одном варианте осуществления ABP содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 97 и последовательность V_L SEQ ID NO: 105 или последовательность V_H SEQ ID NO: 98 и последовательность V_L SEQ ID NO: 105. В другом варианте осуществления АД включает в себя тяжелую цепь SEQ ID NO: 119 и легкую цепь каппа SEQ ID NO: 127; или тяжелую цепь SEQ ID NO: 120 и легкую цепь каппа SEQ ID NO: 127.

В другом аспекте предложен выделенный поливалентный антигенсвязывающий белок (ABP), который специфично связывается с человеческим NRP-1 (hNRP-1; SEQ ID NO: 130), включающий следующие шесть последовательностей CDR:

- (a) CDR-H3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49;
- (b) CDR-H2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32;
- (c) CDR-H1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16;
- (d) CDR-L3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83;
- (e) CDR-L2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72; и
- (f) CDR-L1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65.

В одном варианте осуществления ABP содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 99 и последовательность V_L SEQ ID NO: 106. В другом варианте осуществления ABP содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 121 и легкую цепь каппа SEQ ID NO: 128.

В другом аспекте предложен выделенный антигенсвязывающий белок (ABP), который специфично связывается с человеческим NRP-1 (hNRP-1; SEQ ID NO: 130), включающий CDR-H3, обладающую идентичностью по меньшей мере примерно 80% с CDR-H3 из области V_H , выбранной из SEQ ID NO: 41-49; CDR-H2, обладающую идентичностью по меньшей мере примерно 80% с CDR-H2 области V_H , выбранной из SEQ ID NO: 23-32; CDR-H1, обладающую идентичностью по меньшей мере примерно 80% с CDR-H1 области V_H , выбранной из SEQ ID NO: 8-16; CDR-L3, обладающую идентичностью по меньшей мере примерно 80% с CDR-L3 области V_L , выбранной из SEQ ID NO: 77-83; CDR-L2, обладающую идентичностью по меньшей мере примерно 80% с CDR-L2 области V_L , выбранной из SEQ ID NO: 67-72; и CDR-L1, обладающую идентичностью по меньшей мере примерно 80% с CDR-L1 области V_L , выбранной из SEQ ID NO: 59-65. В одном варианте осуществления CDR-H3, CDR-H2, CDR-H1, CDR-L3, CDR-L2 и CDR-L1, каждая идентифицируется согласно схеме нумерации, выбранной из схемы нумерации Kabat, схемы нумерации Chothia или схема нумерации IMGT. В другом варианте осуществления CDR-H1 идентифицируется, как определено схемами нумерации Chothia и Kabat, включая границы обеих схем нумерации. В одном варианте осуществления CDR-H3 содержит CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO: 41-49, или ее вариант, имеющий 1, 2 или 3 аминокислотных замены; CDR-H2 содержит CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO: 23-32, или ее вариант, имеющий 1, 2 или 3 аминокислотных замены; CDR-H1 содержит CDR-H1, выбранную из SEQ ID NO: 8-16, или ее вариант, имеющий 1 или 2 аминокислотных замены;

CDR-L3 содержит CDR-L3, выбранную из SEQ ID NO: 77-83, или ее вариант, имеющий 1 или 2 аминокислотных замены; CDR-L2 содержит CDR-L2, выбранную из SEQ ID NO: 67-72, или ее вариант, имеющий 1 аминокислотную замену; и CDR-L1 содержит CDR-L1, выбранную из SEQ ID NO: 59-65, или ее вариант, имеющий 1 или 2 аминокислотных замены. В одном варианте осуществления аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

В другом аспекте предложен АБР, который специфично связывается с человеческим NRP-1, где АБР

(a) конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание с NRP-1 с антителом, выбранным из MAB1, MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7, MAB8, MAB9, MAB10, MAB11, MAB12, MAB13, MAB14 или MAB15, каждое из которых представлено в приложении А настоящего изобретения;

(b) является специфичным для клеточной поверхности NRP-1;

(c) специфично блокирует связывание NRP-1 с трансмембранным полипептидом семафорина;

(d) блокирует взаимодействие между полипептидом NRP-1 и полипептидом фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF);

(e) способен ингибировать подавление Treg у пациента-человека;

(f) ко-стимулирует эффекторную Т-клетку в комбинации с презентацией антигена из антиген-презентирующей клетки;

(g) ингибирует подавление эффекторной Т-клетки регуляторной Т-клеткой;

(h) уменьшает количество эффекторных Т-клеток в ткани или в системном кровотоке;

(i) по существу не связывается с тромбоцитами;

(j) по существу не вызывает тромбоцитопению при введении пациенту;

(k) блокирует связывание SEMA3 с NRP-1;

(l) не связывается с NRP-1-отрицательными клетками;

(m) способен на любую комбинацию (a)-(l).

В одном варианте осуществления антитело АБР не конкурирует или не конкурирует перекрестно за связывание с антителом, выбранным из MAB1, MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7, MAB8, MAB9, MAB10, MAB11, MAB12, MAB13, MAB14 или MAB15, каждое из которых представлено в Приложении А настоящего изобретения. В одном варианте осуществления АБР представляет собой АБР, выбранный из MAB1, MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7, MAB8, MAB9, MAB10, MAB11, MAB12, MAB13, MAB14 или MAB15, каждый из которых представлен в Приложении А настоящего изобретения. В одном варианте осуществления NRP-1 выбран из hNRP-1 (SEQ ID NO: 130), cNRP-1 (SEQ ID NO: 132), mNRP-1 (SEQ ID NO: 134), rNRP-1 (SEQ ID NO: 135) и их комбинации.

В одном варианте осуществления АБР содержит антитело. В одном варианте осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В другом варианте осуществления антитело выбрано из человеческого антитела, гуманизированного антитела или химерного антитела. В одном варианте осуществления АБР является поливалентным. В другом варианте осуществления АБР содержит фрагмент антитела. В другом варианте осуществления АБР содержит альтернативный каркас. В другом варианте осуществления АБР содержит константную область иммуноглобулина. В другом варианте осуществления АБР содержит константную область тяжелой цепи класса, выбранного из IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В другом варианте осуществления АБР содержит константную область тяжелой цепи класса IgG и подкласса, выбранного из IgG4, IgG1, IgG2 или IgG3. В другом варианте осуществления IgG представляет собой IgG4. В другом варианте осуществления IgG представляет собой IgG1.

В одном варианте осуществления АБР содержит обычное антитело легкой цепи, антитело с модификацией "выступы-во-впадины", scFv, присоединенный к IgG, Fab, присоединенный к IgG, диатело, тетравалентное биспецифичное антитело, DVD-IgMAB, DARTT M, DuoBody®, CovX-Body, Fcab-антитело, TandAb®, тандем Fab, ZybodyMAB или их комбинации.

В одном варианте осуществления АБР блокирует связывание семафорина 3А (SEMA3А) с NRP-1, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80% или по меньшей мере примерно на 90%. В одном варианте осуществления АБР уменьшает связывание семафорина 3А с NRP-1 по меньшей мере примерно на 50%. В одном варианте осуществления ткань представляет собой опухоль. В другом варианте осуществления NRP-1 экспрессируется на поверхности клетки-мишени.

В одном варианте осуществления АБР содержит полипептидную последовательность, имеющую остаток пироглутамата (pE) на своем N-конце. В другом варианте осуществления АБР содержит последовательность V_H , в которой N-концевой остаток Q замещен pE. В другом варианте осуществления АБР содержит последовательность V_H , в которой N-концевой остаток E замещен pE. В другом варианте осуществления АБР содержит последовательность V_L , в которой N-концевой остаток E замещен pE. В другом варианте осуществления АБР содержит последовательность тяжелой цепи, в которой N-концевой остаток Q замещен pE. В другом варианте осуществления АБР содержит последовательность тяжелой

цепи, в которой N-концевой остаток E замещен pE. В другом варианте осуществления АВР содержит последовательность легкой цепи, в которой N-концевой остаток E замещен pE.

В одном варианте осуществления АВР специфично связывается с человеческим NRP-1 с kD менее чем 20 нМ, менее чем 10 нМ, менее чем 5 нМ, менее чем 2 нМ, менее чем 1 нМ, менее чем 0,5 нМ или менее чем 0,2 нМ. В другом варианте осуществления АВР специфично связывается с NRP-1 человека, мыши и яванской макаки. В одном варианте осуществления АВР связывается с другим эпитопом на NRP-1, отличным от эпитопа на NRP-1, с которым связывается SEC10. В одном варианте осуществления АВР связывается с доменом a1, a2, b1 или b2 NRP-1. В другом варианте осуществления АВР связывается более чем с одним доменом NRP-1. В другом варианте осуществления АВР связывается с доменом b2 NRP-1. В другом варианте осуществления АВР связывается с доменом b1 NRP-1.

В другом аспекте предложен любой из раскрытых в настоящем изобретении АВР для применения в качестве лекарственного средства. В другом варианте осуществления АВР предназначен для использования при лечении злокачественного новообразования или вирусной инфекции. В одном варианте осуществления злокачественное новообразование выбрано из солидной опухоли и гематологической опухоли.

В другом аспекте предложен набор, содержащий любое из раскрытых в настоящем изобретении АВР и инструкции по применению АВР. В одном варианте осуществления набор содержит лиофилизированный АВР. В другом варианте осуществления набор содержит жидкость для восстановления лиофилизированного АВР.

В другом аспекте предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий раскрытый в настоящем изобретении АВР, его V_H , его V_L , его легкую цепь, его тяжелую цепь или его антигенсвязывающую часть.

В другом аспекте предложен вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, кодирующий раскрытый в настоящем изобретении АВР, его V_H , его V_L , его легкую цепь, его тяжелую цепь или его антигенсвязывающую часть.

В другом аспекте предложена клетка-хозяин, содержащая любой из векторов или полинуклеотидов, описанных в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления клетка-хозяин выбрана из бактериальной клетки, грибной клетки и клетки млекопитающего. В другом варианте осуществления клетка-хозяин выбрана из клетки *E.coli*, клетки *Saccharomyces cerevisiae* и клетки CHO.

В другом аспекте предложена реакция бесклеточной экспрессии, включающая любой из векторов или полинуклеотидов, описанных в настоящем изобретении.

В другом аспекте предложен способ получения АВР, раскрытый в настоящем изобретении, включающий экспрессию АВР в клетке-хозяине, раскрытой в настоящем изобретении, и выделение экспрессированного АВР.

В другом аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая любой из раскрытых в настоящем изобретении АВР и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В одном варианте осуществления АВР присутствует в композиции в количестве, эффективном для локального ингибирования взаимодействия NRP-1: семафорин-4 в опухоли. В одном варианте осуществления антитело против NRP-1 присутствует в композиции в количестве, эффективном для ингибирования взаимодействия между NRP-1 и трансмембранным полипептидом семафорина при введении пациенту-человеку. В другом варианте осуществления антитело против NRP-1 специфически блокирует связывание NRP-1 с трансмембранным полипептидом семафорина. В другом варианте осуществления антитело против NRP-1 блокирует взаимодействие между полипептидом NRP-1 и полипептидом фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF). В другом варианте осуществления антитело против NRP-1 блокирует связывание полипептида семафорина. В одном варианте осуществления антитело против NRP1 блокирует связывание SEMA3. В другом варианте осуществления антитело против NRP-1 блокирует связывание SEMA4. В другом варианте осуществления антитело блокирует взаимодействие между полипептидом NRP-1 и SEMA3. В другом варианте осуществления антитело блокирует взаимодействие между полипептидом NRP-1 и VEGF. В одном варианте осуществления антитело блокирует связывание полипептида семафорина, но не блокирует связывание VEGF. В другом варианте осуществления антитело против NRP-1 способно ингибировать подавление Treg у пациента-человека. В другом варианте осуществления антитело против NRP-1 способно снижать выживаемость и/или стабильность Treg у пациента-человека. В одном варианте осуществления антитело против NRP-1 присутствует в композиции в количестве, эффективном для локального ингибирования взаимодействия NRP-1: семафорин-4 в опухоли. В другом варианте осуществления антитело против NRP-1 присутствует в композиции в количестве, эффективном для предотвращения развития нежелательного аутоиммунного и/или воспалительного проявления. В одном варианте осуществления пациент-человек имеет злокачественное новообразование. В одном варианте осуществления количество АВР в фармацевтической композиции является достаточным для

- (a) уменьшения подавления эффекторных Т-клеток регуляторными Т-клетками;
- (b) активации эффекторных Т-клеток;
- (c) уменьшения количества регуляторных Т-клеток в ткани или системно;
- (d) индукции или усиления пролиферации эффекторных Т-клеток;
- (e) ингибирования скорости роста опухоли;

- (f) вызова регрессии опухоли; или
- (g) их комбинации у пациента.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для применения в качестве лекарственного средства. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для применения при лечении злокачественного новообразования или вирусной инфекции. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для применения при лечении злокачественного новообразования, выбранного из рака головного мозга, предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, кожи и легкого. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В одном варианте осуществления АВР в фармацевтической композиции является достаточным для

- (a) уменьшения подавления эффекторных Т-клеток регуляторными Т-клетками;
- (b) активации эффекторных Т-клеток;
- (c) уменьшения количества регуляторных Т-клеток в ткани или системно;
- (d) индукции или усиления пролиферации эффекторных Т-клеток;
- (e) ингибирования скорости роста опухоли;
- (f) вызова регрессии опухоли; или
- (g) их комбинации у пациента.

В другом аспекте предложен способ ингибирования функции или снижения стабильности регуляторной Т-клетки (Treg) у пациента, включающий воздействие на Treg *in vivo* оси ингибитора нейропиплина-1 (NRP-1):семафорина-4А в Treg, где пациенту вводят эффективное количество АВР, представленного в настоящем изобретении, или фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления способ включает повышение функции эффекторных Т-клеток (T_{eff}) или воздействие на T_{eff} *in vivo* АВР, представленным в настоящем изобретении, причем способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления пациент имеет злокачественное новообразование. В одном варианте осуществления способ индуцирует или усиливает иммунный ответ на опухолеспецифический антиген. В одном варианте осуществления АВР способен

- (a) уменьшать выживание и/или стабильность Treg у пациента-человека;
- (b) связываться с внеклеточным доменом полипептида NRP-1; или
- (c) к их комбинации.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение одного или более дополнительных терапевтических агентов. В одном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент выбирают из облучения, цитотоксического агента, химиотерапевтического агента, цитостатического агента, антигормонального агента, ингибитора VEGF, иммуностимулирующего агента, антиангиогенного агента и их комбинации. В одном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой иммуностимулирующий агент. В одном варианте осуществления иммуностимулирующий агент включает агент, который блокирует передачу сигналов ингибирующего рецептора, экспрессируемого иммунной клеткой, или его лиганда. В одном варианте осуществления ингибирующий рецептор, экспрессируемый иммунной клеткой, или его лиганд выбран из PVRIG, VISTA, CCR4, CD27, CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, Tim3, TIGIT, нейритина, BTLA, KIR и их комбинации. В одном варианте осуществления иммуностимулирующий агент содержит агонист стимулирующего рецептора, экспрессируемого иммунной клеткой. В одном варианте осуществления стимулирующий рецептор, экспрессируемый иммунной клеткой, выбран из OX40, GITR, ICOS, CD28, CD37, CD40, 4-1BB и их комбинаций. В одном варианте осуществления иммуностимулирующий агент содержит цитокин. В другом варианте осуществления иммуностимулирующий агент содержит вакцину против опухолеспецифического антигена.

В другом аспекте предложен способ модулирования иммунного ответа у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение пациенту одного или более дополнительных терапевтических агентов. В одном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой

- (i) агонист стимулирующего рецептора иммунной клетки; или
- (ii) антагонист ингибирующего рецептора иммунной клетки, где рецептор иммунной клетки выбран из OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), CD28, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, GITR, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, CD83 лиганда и их комбинации.

В другом варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой онколитический вирус, выбранный из вируса простого герпеса, вируса везикулярного стоматита, аденовируса, вируса болезни Ньюкасла, вируса коровьей оспы, вируса мараба и их комбинаций. В одном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент включен в состав той же фармацевтической композиции, что и АВР. В другом варианте осуществления терапевтический агент включен в состав фармацевтической композиции, отличной от АВР.

В одном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент вводят до введения АВР.

В другом варианте осуществления дополнительный терапевтический агент вводят после введения ABP. В другом варианте осуществления дополнительный терапевтический агент вводят одновременно с ABP. В одном варианте осуществления способ по существу не вызывает тромбоцитопении у пациента.

В другом аспекте предложено антитело против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H3, состоящую из SEQ ID NO: 47, CDR-H2, состоящую из SEQ ID NO: 30, и CDR-H1, состоящую из SEQ ID NO: 14; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L3, состоящую из SEQ ID NO: 81, CDR-L2, состоящую из SEQ ID NO: 71, и CDR-L1, состоящую из SEQ ID NO: 63.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из любого из следующих (1) и (2):

(1) антитело против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 96, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 104; и

(2) антитело против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 96, в которой аминокислотный остаток E, соответствующий положению 1, модифицирован до пироглутамата, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 104.

В одном варианте осуществления предложен способ получения антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина (клеток-хозяев), выбранной из группы, состоящей из (a)-(c) ниже, для экспрессии четырехвалентного антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента:

(a) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента варианта осуществления (1) выше, и полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(b) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента варианта осуществления (1) выше, и экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(c) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента варианта осуществления (1) выше, и клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В другом варианте осуществления предложен

(1) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента вышеуказанного аспекта; и

(2) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента вышеуказанного аспекта.

В другом варианте осуществления предложен экспрессирующий вектор, содержащий

(a) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента вышеуказанного аспекта; и/или

(b) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента вышеуказанного аспекта.

В другом варианте осуществления предложена клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, выбранная из группы, состоящей из (a)-(d):

(a) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента вышеуказанного аспекта, и полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(b) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента вышеуказанного аспекта, и экс-

прессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента вышеуказанного аспекта;

(с) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента вышеуказанного аспекта; и

(d) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента вышеуказанного аспекта.

В другом варианте осуществления предложено антитело против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с вышеуказанным аспектом, которое выбрано из группы, состоящей из (1)-(4):

(1) антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 118, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126;

(2) антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 118, в которой аминокислотный остаток E, соответствующий положению 1, модифицирован до пироглутамата, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126;

(3) антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, соответствующей положениям аминокислот от 1 до 453 SEQ ID NO: 118, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126;

(4) антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, соответствующей положениям аминокислот от 1 до 453 последовательности SEQ ID NO: 118, в которой аминокислотный остаток E, соответствующий положению 1, модифицирован до пироглутамата, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126.

В одном варианте осуществления антитело против человеческого NRP-1 предназначено для применения для предотвращения или лечения злокачественного новообразования. В другом варианте осуществления антитело против человеческого NRP-1 предназначено для производства фармацевтической композиции для предотвращения или лечения злокачественного новообразования.

Полинуклеотид, который выбран из группы, состоящей из (1) и (2):

(1) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (1); и

(2) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (1).

Экспрессирующий вектор, содержащий

(a) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (1); и/или

(b) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (1).

Клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, выбранная из группы, состоящей из (a)-(d):

(a) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1 вышеуказанного варианта осуществления (1), и полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела;

(b) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (1), и экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела;

(с) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (1); и

(d) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществлением (1).

Способ получения антитела против человеческого NRP-1, включающий культивирование клетки-хозяина (клеток-хозяев), выбранной из группы, состоящей из (a)-(с) ниже, для экспрессии антитела против человеческого NRP-1:

(a) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1 вышеуказанного варианта осуществления (1), и полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующих легкую цепь антитела;

(b) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (1), и экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела;

(c) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (1), и клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела.

В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В другом варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (1), антитело против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (2), антитело против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (3) и/или антитело против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления (4) и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию для лечения злокачественного новообразования. В другом варианте осуществления композицию вводят в комбинации с облучением, цитотоксическим агентом, химиотерапевтическим агентом, цитостатическим агентом, антигормональным агентом, ингибитором VEGF, иммуностимулирующим агентом, антиангиогенным агентом или их комбинациями.

В другом варианте осуществления предложен способ предотвращения или лечения злокачественного новообразования, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела против человеческого NRP-1 в соответствии с вышеуказанным аспектом. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение одного или более дополнительных терапевтических агентов. В одном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент выбирают из группы, состоящей из облучения, цитотоксического агента, химиотерапевтического агента, цитостатического агента, антигормонального агента, ингибитора VEGF, иммуностимулирующего агента, антиангиогенного агента и их комбинации.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1A и 1B представляют собой два графика, показывающие ингибирование роста опухоли у мышей с опухолями CT26, получавших мышинные варианты MAB 2, 3, 4, 5, 7, 12, 13, 14 и 15, а также контрольные IgG и антитело против NRP-1 SEC10 в качестве компаратора. Мыши получали монотерапию MAB (фиг. 1A) или в комбинации с антителом PD-1 (фиг. 1B). Время обработки антителом (дни) показано стрелками. Фиг. 1C представляет собой график, показывающий ингибирование роста опухоли у мышей с опухолями CT26, получавших монотерапию и комбинированную терапию, как описано в настоящем изобретении. Предоставляются i) мышинный вариант MAB12, ii) ингибитор PD-1 и iii) комбинация mMAB12 и ингибитора PD-1. Время обработки антителом (дни) показано стрелками.

Фиг. 2 представляет собой три графика, показывающие ингибирование роста опухоли у мышей с опухолями MC38, получавших мышинные варианты MAB 2, 3, 4, 5, 7, 12, 13, 14 и 15, а также контрольный IgG и SEC10 в качестве компаратора. Мыши получали монотерапию MAB (фиг. 2A) или в комбинации с антителом PD-L1 (фиг. 2B). Время обработки антителом (дни) показано стрелками. Противоопухолевая эффективность mMAB12 отдельно или в комбинации с антителом PD-L1 в модели сингенной опухоли толстой кишки мыши MC38 показана на фиг. 2C.

Фиг. 3 представляет собой два графика, показывающих данные связывания эпитопа для антител против NRP-1, MAB12 и SEC10. На верхней панели показаны данные о связывании для MAB12 и SEC10 с 5 мкг/мл MAB12, иммобилизованными на сенсорах АНС с антителами против человеческого Fc. На нижней панели показаны данные сортировки для MAB12 и SEC10 с 5 мкг/мл SEC10, иммобилизованными на сенсорах. Белок NRP1 связывается с иммобилизованным антителом, и оценивается связывание второго антитела. Следы показывают, что MAB12 и SEC10 способны одновременно связываться с NRP1.

Подробное описание изобретения

1. Определения.

Если не указано иное, то подразумевается, что все термины, обозначения и другая научная терминология, используемые в настоящем изобретении, имеют значения, обычно понятные специалистам в области техники, к которой относится это изобретение. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в настоящем изобретении для ясности и/или для удобства ссылки, и включение таких определений в данное изобретение не обязательно должно истолковываться как представляющее разницу по сравнению с тем, что обычно понимается в данной области техники. Описанные методы и процедуры или те, на которые делается ссылка в настоящем изобретении, как правило, хорошо понятны и обычно используются специалистами в данной области с использованием обычных методологий, таких как, например,

широко используемые методологии молекулярного клонирования, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th ed. (2012), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. В соответствующих случаях процедуры, включающие использование коммерчески доступных наборов и реагентов, как правило, выполняются в соответствии с определенными производителем протоколами и условиями, если не указано иное.

Используемые в настоящем изобретении формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное. Термины "включать", "такие как" и т.п. предназначены для обозначения включения без ограничения, если специально не указано иное.

Используемый в настоящем изобретении термин "содержащий" также конкретно включает варианты осуществления, "состоящие из" и "состоящие по существу из" перечисленных элементов, если специально не указано иное.

Термин "примерно" обозначает и охватывает указанное значение и диапазон выше и ниже этого значения. В некоторых вариантах осуществления термин "примерно" указывает обозначенное значение ± 10 , ± 5 или $\pm 1\%$. В определенных вариантах осуществления, где это применимо, термин "примерно" указывает обозначенное значение(я) \pm одно стандартное отклонение этого значения(ий).

Термин "иммуноглобулин" относится к классу структурно родственных белков, обычно содержащих две пары полипептидных цепей: одну пару легких (L) цепей и одну пару тяжелых (H) цепей. В "интактном иммуноглобулине" все четыре из этих цепей связаны дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов была хорошо охарактеризована. См., например, Paul, *Fundamental Immunology*, 7th ed., ch. 5 (2013), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. Вкратце каждая тяжелая цепь обычно содержит переменную область тяжелой цепи (V_H) и константную область тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи обычно содержит три домена, сокращенно обозначенные как C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь обычно содержит переменную область легкой цепи (V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи обычно содержит один домен, сокращенно обозначенный C_L . Термин "антигенсвязывающий белок" (ABP) относится к белку, содержащему один или более антигенсвязывающих доменов, которые специфично связываются с антигеном или эпитопом. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с антигеном или эпитопом со специфичностью и аффинностью, сходными со специфичностью и аффинностью встречающихся в природе антител. В некоторых вариантах осуществления ABP включает антитело. В некоторых вариантах осуществления ABP состоит из антитела. В некоторых вариантах осуществления ABP по существу состоит из антитела. В некоторых вариантах осуществления ABP содержит альтернативный каркас. В некоторых вариантах осуществления ABP состоит из альтернативного каркаса. В некоторых вариантах осуществления ABP по существу состоит из альтернативного каркаса. В некоторых вариантах осуществления ABP содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления ABP состоит из фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления ABP по существу состоит из фрагмента антитела. "NRP-1 ABP", "анти-NRP-1 ABP" или "NRP-1-специфичный ABP" представляет собой ABP, как указано в настоящем изобретении, который специфично связывается с антигеном NRP-1. В некоторых вариантах осуществления ABP связывается с внеклеточным доменом NRP-1. В определенных вариантах осуществления ABP NRP-1, представленный в настоящем изобретении, связывается с эпитопом NRP-1, который консервативен между или среди белков NRP-1 из разных видов.

Термин "антитело" используется в настоящем изобретении в самом широком смысле и включает определенные типы молекул иммуноглобулина, включающие один или более антигенсвязывающих доменов, которые специфично связываются с антигеном или эпитопом. Антитело, в частности, включает интактные антитела (например, интактные иммуноглобулины), фрагменты антител и полиспецифичные антитела. Антитело - это один из типов ABP.

Термин "антигенсвязывающий домен" означает часть ABP, которая способна специфично связываться с антигеном или эпитопом. Одним примером антигенсвязывающего домена является антигенсвязывающий домен, образованный димером V_H - V_L антитела. Другим примером антигенсвязывающего домена является антигенсвязывающий домен, образованный путем диверсификации определенных петель из десятого домена фибронектина типа III аднектина.

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "цельное антитело" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу сходную со структурой встречающегося в природе антитела, и имеющего тяжелые цепи, которые содержат Fc-область. Например, когда используется для обозначения молекулы IgG, "полноразмерное антитело" представляет собой антитело, которое содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи. "Антитело против человеческого NRP-1" представляет собой интактное антитело, представленное в настоящем изобретении, которое специфично связывается с человеческим NRP-1.

Термин "Fc-область" означает C-концевую область тяжелой цепи иммуноглобулина, которая в природных антителах взаимодействует с рецепторами Fc и некоторыми белками системы комплемента. Структуры Fc-областей различных иммуноглобулинов и содержащиеся в них сайты гликозилирования известны в данной области. См. Schroeder and Cavacini, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, 125:S41-52, кото-

рая включена в настоящее изобретение в качестве ссылки в полном объеме. Fc-область может быть природной Fc-областью или Fc-областью, модифицированной, как описано в данной области техники, или где-либо еще в настоящем изобретении.

Области V_H и V_L могут быть далее подразделены на области гипервариабельности ("гипервариабельные области (HVR)"), также называемые "областями, определяющими комплементарность" (CDR), которые перемежаются с областями, которые являются более консервативными. Более консервативные области называются каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L обычно содержит три CDR и четыре FR, расположенные в следующем порядке (от N-конца до C-конца): FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. CDR участвуют в связывании антигена и влияют на специфичность антигена и аффинность связывания антитела. См. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991), Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, которая включена в настоящее изобретение в качестве ссылки в полном объеме.

Легкая цепь из любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), в зависимости от последовательности ее константной области.

Тяжелая цепь из любых видов позвоночных может быть отнесена к одному из пяти различных классов (или изотипов): IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Эти классы также обозначаются как α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы IgG и IgA далее делятся на подклассы на основе различий в последовательности и функции. У людей экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Границы аминокислотной последовательности CDR могут быть определены специалистом в данной области с использованием любой из ряда известных схем нумерации, в том числе описанных Kabat et al., выше (схема нумерации "Kabat"); Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948 (схема нумерации "Chothia"); MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745 (схема нумерации "Контакт"); Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27:55-77 (схема нумерации "IMGT"); и Honegge and Plückthun, J. Mol. Biol., 2001, 309:657-70 (схема нумерации "AHO"), каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В табл. 1 представлены положения CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, которые определены схемами Kabat и Chothia. Для CDR-H1 нумерация остатков указана с использованием схем нумерации Kabat и Chothia.

CDR могут быть определены, например, с использованием программного обеспечения для нумерации антител, такого как Abnum, доступного по адресу www.bioinf.org.uk/abs/abnum/ и описанного в Abhinandan and Martin, Immunology, 2008, 45:3832-3839, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Таблица 1

Остатки в CDR согласно схемам нумерации Kabat и Chothia

CDR	Kabat	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97
H1 (Нумерация Kabat)	H31-H35B	H26-H32 или H34*
H1 (Нумерация Chothia)	H31-H35	H26-H32
H2	H50-H65	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102

* С-конец CDR-H1 при нумерации с использованием соглашения о нумерации Kabat варьируется от H32 до H34 в зависимости от длины CDR.

"Схема нумерации EU" обычно используется для обозначения остатка в константной области тяжелой цепи антитела (например, как сообщается в Kabat et al., выше). Если не указано иное, схема нумерации EU используется для обозначения остатков в константных областях тяжелой цепи антитела, описанных в настоящем изобретении.

"Фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" включает часть интактного антитела, такую как антигенсвязывающая или переменная область интактного антитела. Фрагменты антител включают, например, фрагменты Fv, фрагменты Fab, фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fab', фрагменты scFv (sFv) и фрагменты scFv-Fc.

Фрагменты "Fv" содержат нековалентно связанный димер одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи.

"Fab"-фрагменты содержат, помимо переменных доменов тяжелой и легкой цепей, константный домен легкой цепи и первый константный домен (C_{H1}) тяжелой цепи. Fab-фрагменты могут быть получены, например, рекомбинантными методами или расщеплением папаином полноразмерного антитела.

Фрагменты "F(ab')₂" содержат два фрагмента Fab', соединенных около шарнирной области дисульфидными связями. F(ab')₂-фрагменты могут быть получены, например, рекомбинантными способами или расщеплением пепсином интактного антитела. Фрагменты F(ab') могут быть диссоциированы, на-

пример, обработкой β -меркаптоэтанолом.

"Однопочечные Fv", "sFv" или "scFv" фрагменты антител содержат домен V_H и домен V_L в одной полипептидной цепи. V_H и V_L обычно связаны пептидным линкером. См. Pluckthun A. (1994). Может быть использован любой подходящий линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой $(GGGG)_n$ (SEQ ID NO: 140). В некоторых вариантах осуществления $n=1, 2, 3, 4, 5$ или 6 . См. *Antibodies from Escherichia coli*, In Rosenberg M. & Moore G.P. (eds.), *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113 (p. 269-315). Springer-Verlag, New York, которая включена в настоящее описание с помощью ссылки в полном объеме.

Фрагменты "scFv-Fc" содержат scFv, присоединенный к Fc-домену. Например, Fc-домен может быть присоединен к C-концу scFv. Fc-домен может следовать за V_H или V_L в зависимости от ориентации переменных доменов в scFv (то есть V_H - V_L или V_L - V_H). Может быть использован любой подходящий Fc-домен, известный в данной области техники или описанный в настоящем изобретении. В некоторых случаях Fc-домен содержит Fc-домен IgG4.

Термин "однодоменное антитело" относится к молекуле, в которой один переменный домен антитела специфично связывается с антигеном без присутствия другого переменного домена. Однодоменные антитела и их фрагменты описаны в Arabi Ghahroudi et al., *FEBS Letters*, 1998, 414:521-526; и Muyldermans et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 2001, 26:230-245, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Однодоменные антитела также известны как sdAb или нанотела.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу из популяции по существу гомогенных антител. Популяция по существу гомогенных антител включает антитела, которые по существу сходны и которые связываются с одним и тем же эпитопом(и) за исключением вариантов, которые обычно могут возникать во время продуцирования моноклонального антитела. Такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. Моноклональное антитело обычно получают способом, который включает селекцию одного антитела из множества антител. Например, процесс селекции может представлять собой селекцию уникального клона из множества клонов, таких как пул гибридных клонов, фаговых клонов, дрожжевых клонов, бактериальных клонов или других рекомбинантных клонов ДНК. Отсеlected антитело может быть дополнительно изменено, например, для улучшения аффинности к мишени ("созревание аффинности"), для гуманизации антитела, для улучшения его продуцирования в культуре клеток и/или для снижения его иммуногенности у пациента.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из определенного источника или вида, тогда как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или вида.

"Гуманизированные" формы антител, не являющихся человеческими, представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из антитела, не являющегося человеческим. Гуманизированное антитело, как правило, представляет собой человеческое антитело (антитело-реципиент), в котором остатки одной или более CDR заменены остатками одной или более CDR антитела, не являющегося человеческим (донорского антитела). Донорское антитело может представлять собой любое подходящее антитело, не являющееся человеческим, такое как антитело мыши, крысы, кролика, цыпленка или примата, не являющегося человеком, обладающее желаемой специфичностью, аффинностью или биологическим эффектом. В некоторых случаях выбранные остатки каркасной области антитела-реципиента заменяются соответствующими остатками каркасной области донорского антитела. Гуманизированные антитела также могут содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в донорском антителе. Такие модификации могут быть сделаны для дальнейшего улучшения функции антител. Для получения дополнительной информации см. Jones et al., *Nature*, 1986, 321:522-525; Riechmann et al., *Nature*, 1988, 332:323-329; и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, 2:593-596, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

"Человеческое антитело" представляет собой антитело с аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, продуцируемого человеком, человеческой клеткой или источником, отличным от человеческого, в котором используется репертуар человеческих антител или последовательности, кодирующие человеческие антитела (например, полученные из человеческих источников или сконструированные de novo). Человеческие антитела, в частности, исключают гуманизированные антитела.

Под "SEC10" подразумевается антитело против NRP-1, ранее проходившее клинические испытания для лечения солидных опухолей, с бевацизумабом и без него. См., например, "A Study of MNRP1685A in Patients with Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors", clinicaltrials.gov, идентификатор NCT00747734.

Под "SEC3" подразумевается пан-антитело против NRP-1, представленное в SEQ ID NO: 144, также описанное, например, в Appleton et al., *EMBO Journal* (2007), 26, 4902-4912.

Под "MAB59941" подразумевается антитело против мышинового нейропилина-1, доступное от R & D Systems, клон № 761704.

"Выделенный АВР" или "выделенная нуклеиновая кислота" представляет собой АВР или нуклеиновую кислоту, которые были отделены и/или извлечены из компонента их естественной среды. Компонен-

ты естественные среды могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые материалы. В некоторых вариантах осуществления выделенный АВР очищают до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, например, с использованием секвенатора с вращающимся стаканом. В некоторых вариантах осуществления выделенный АВР очищают до гомогенности с помощью гель-электрофореза (например, SDS-PAGE) в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с детектированием с помощью кумасси синего или серебряного окрашивания. В некоторых вариантах осуществления выделенный АВР может включать АВР *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественной среды АВР отсутствует. В некоторых аспектах выделенный АВР или выделенная нуклеиновая кислота получают по меньшей мере за одну стадию очистки. В некоторых вариантах осуществления выделенный АВР или выделенную нуклеиновую кислоту очищают по меньшей мере до 80, 85, 90, 95 или 99 мас.%. В некоторых вариантах осуществления выделенный АВР или выделенную нуклеиновую кислоту очищают по меньшей мере до 80, 85, 90, 95 или 99 об.%. В некоторых вариантах осуществления выделенный АВР или выделенная нуклеиновая кислота предоставляются в виде раствора, содержащего по меньшей мере 85, 90, 95, 98, от 99 до 100% АВР или нуклеиновой кислоты по массе. В некоторых вариантах осуществления выделенный АВР или выделенная нуклеиновая кислота предоставляются в виде раствора, содержащего по меньшей мере 85, 90, 95, 98, от 99 до 100% АВР или нуклеиновой кислоты по объему.

"Аффинность" относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, АВР) и его партнером по связыванию (например, антигеном или эпитопом). Если не указано иное, то используемый в настоящем изобретении термин "аффинность" относится к аффинности внутреннего связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, АВР и антигеном или эпитопом). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y может быть представлена константой равновесия диссоциации (K_D). Кинетические компоненты, которые вносят вклад в константу равновесия диссоциации, более подробно описаны ниже. Аффинность может быть измерена общепринятыми методами, известными в данной области, включая описанные в настоящем изобретении, такие как технология поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, BIACORE®) или биослойная интерферометрия (например, FORTEBIO®).

Что касается связывания АВР с молекулой-мишенью, то термины "связывается", "специфичное связывание", "специфично связывается", "специфично для", "селективно связывается" и "селективен для" определенного антигена (например, полипептида-мишени) или эпитопа на конкретном антигене означает связывание, которое заметно отличается от неспецифичного или неселективного взаимодействия (например, с молекулой, не являющейся мишенью). Специфичное связывание может быть измерено, например, путем измерения связывания с молекулой-мишенью и сравнения его со связыванием с молекулой, не являющейся мишенью. Специфичное связывание также можно определить путем конкуренции с контрольной молекулой, которая имитирует эпитоп, распознаваемый на молекуле-мишени. В этом случае выявляется специфичное связывание, если связывание АВР с молекулой-мишенью конкурентно ингибируется контрольной молекулой. В некоторых аспектах аффинность NRP-1 АВР к молекуле, не являющейся мишенью, составляет менее чем примерно 50% аффинности к NRP-1. В некоторых аспектах аффинность NRP-1 АВР к молекуле, не являющейся мишенью, составляет менее чем примерно 40% от аффинности к NRP-1. В некоторых аспектах аффинность NRP-1 АВР к молекуле, не являющейся мишенью, составляет менее чем примерно 30% от аффинности к NRP-1. В некоторых аспектах аффинность NRP-1 АВР к молекуле, не являющейся мишенью, составляет менее чем примерно 20% от аффинности к NRP-1. В некоторых аспектах аффинность NRP-1 АВР к молекуле, не являющейся мишенью, составляет менее чем примерно 10% от аффинности к NRP-1. В некоторых аспектах аффинность NRP-1 АВР к молекуле, не являющейся мишенью, составляет менее чем примерно 1% от аффинности к NRP-1. В некоторых аспектах аффинность NRP-1 АВР к молекуле, не являющейся мишенью, составляет менее чем примерно 0,1% аффинности к NRP-1.

Используемый в настоящем изобретении термин " k_d " (s^{-1}) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия АВР-антиген. Это значение также упоминается как значение k_{off} .

Используемый в настоящем изобретении термин " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия АВР-антиген. Это значение также называется значением k_{on} .

Используемый в настоящем изобретении термин " K_D " (M) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия АВР-антиген. $K_D = k_d/k_a$. В некоторых вариантах осуществления аффинность АВР описывается в терминах K_D для взаимодействия между таким АВР и его антигеном. Для ясности, как известно в данной области техники, меньшее значение K_D указывает на более высокую аффинность взаимодействия, в то время как большее значение K_D указывает на более низкую аффинность взаимодействия.

Используемый в настоящем изобретении термин " K_A " (M^{-1}) относится к константе равновесия ассоциации конкретного взаимодействия АВР-антиген. $K_A = k_a/k_d$.

"Зрелая аффинность" АВР представляет собой АВР с одним или более изменениями (например, в одной или более CDR или FR) относительно родительского АВР (т.е. АВР, из которого получен или

сконструирован измененный АВР), который приводят к улучшению в аффинности АВР к его антигену по сравнению с родительским АВР, который не обладает изменением (изменениями). В некоторых вариантах осуществления АВР со зрелой аффинностью имеет наномолярную или пикомолярную аффинность к антигену-мишени. АВР со зрелой аффинностью могут быть получены с использованием различных способов, известных в данной области. Например, Marks et al. (Bio/Technology, 1992, 10: 779-783, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме) описывает созревание аффинности путем перегруппировки доменов V_H и V_L . Случайный мутагенез остатков CDR и/или каркаса описан, например, в Barbas et al. (Proc. Nat. Acad. Sci., США, 1994, 91:3809-3813); Schier et al., Gene, 1995, 169:147-155; Yelton et al., J. Immunol., 1995, 155:1994-2004; Jackson et al., J. Immunol., 1995, 154:3310-3319; и Hawkins et al., J. Mol. Biol., 1992, 226:889-896, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

"Иммуноконъюгат" представляет собой АВР, конъюгированный с одной или более гетерологичными молекулами, такими как терапевтический или диагностический агент.

"Эффекторные функции" относятся к тем биологическим активностям, которые опосредуются Fc-областью антитела, причем эти активности могут варьироваться в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q для активации комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), связывание с рецептором Fc для активации антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

При использовании в настоящем изобретении в контексте двух или более АВР термин "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с" означает, что два или более АВР конкурируют за связывание с антигеном (например, NRP-1). В одном иллюстративном анализе NRP-1 наносят на поверхность, и он вступает в контакт с первым АВР NRP-1, после чего добавляют второй АВР NRP-1. В другом иллюстративном анализе первый АВР NRP-1 наносят на поверхность, и он контактирует с NRP-1, а затем добавляются второй АВР NRP-1. Если присутствие первого АВР NRP-1 уменьшает связывание второго АВР NRP-1 в любом анализе, тогда АВР конкурируют друг с другом. Термин "конкурирует с" также включает в себя комбинации АВР, в которых один АВР уменьшает связывание другого АВР, но где конкуренция не наблюдается, когда АВР добавляются в обратном порядке. Однако в некоторых вариантах осуществления первый и второй АВР ингибируют связывание друг с другом независимо от порядка их добавления. В некоторых вариантах осуществления один АВР уменьшает связывание другого АВР с его антигеном по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%. Специалист в данной области может выбрать концентрации антител, используемых в конкурентных анализах, на основе аффинности АВР к NRP-1 и валентности АВР. Анализы, описанные в этом определении, являются иллюстративными, и квалифицированный специалист может использовать любой подходящий анализ, чтобы определить, конкурируют ли антитела друг с другом. Подходящие анализы описаны, например, в Cox et al., "Immunoassay Methods", in Assay Guidance Manual [Internet], Updated December 24, 2014 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/; accessed September 29, 2015); Silman et al., Cytometry, 2001, 44:30-37; и Finco et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 2011, 54:351-358, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Термин "эпитоп" означает часть антигена, которая специфично связывается с АВР. Эпитопы часто состоят из доступных для поверхности аминокислотных остатков и/или боковых цепей сахара и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не с последним, может быть потеряно в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, которые непосредственно участвуют в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании. Эпитоп, с которым связывается АВР, может быть определен с использованием известных методов определения эпитопа, таких как, например, тестирование связывания АВР с вариантами NRP-1 с различными точечными мутациями или химерными вариантами NRP-1.

Процент идентичности между полипептидной последовательностью и эталонной последовательностью определяют как процент аминокислотных остатков в полипептидной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной последовательности после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалисту в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, CLUSTAL OMEGA, или MUSCLE. Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

"Консервативная замена" или "консервативная аминокислотная замена" относится к замене аминокислоты на химически или функционально сходную аминокислоту. Таблицы консервативных замен,

обеспечивающие сходные аминокислоты, хорошо известны в данной области. В качестве примера, группы аминокислот, представленные в табл. 2-4, в некоторых вариантах осуществления рассматриваются как консервативные замены друг друга.

Таблица 2

Выбранные группы аминокислот считаются консервативными
заменами друг друга в определенных вариантах осуществления

Кислые остатки	D и E
Основные остатки	K, R и H
Гидрофильные незаряженные остатки	S, T, N и Q
Алифатические незаряженные остатки	G, A, V, L и I
Неполярные Незаряженные остатки	C, M и P
Ароматические остатки	F, Y и W

Таблица 3

Дополнительные выбранные группы аминокислот, которые считаются консервативными заменами друг друга, в определенных вариантах осуществления

Группа 1	A, S и T
Группа 2	D и E
Группа 3	N и Q
Группа 4	R и K
Группа 5	I, L и M
Группа 6	F, Y и W

Таблица 4

Дополнительно выбранные группы аминокислот, которые считаются консервативными заменами друг друга в определенных вариантах осуществления

Группа A	A и G
Группа B	D и E
Группа C	N и Q
Группа D	R, K и H
Группа E	I, L, M, V
Группа F	F, Y и W
Группа G	S и T
Группа H	C и M

Дополнительные консервативные замены можно найти, например, в Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties, 2nd ed. (1993), W.H. Freeman & Co., New York, NY. ABR, генерируемый путем осуществления одной или более консервативных замен аминокислотных остатков в родительском ABR, называется "консервативно модифицированным вариантом".

Термин "аминокислота" относится к двадцати стандартным природным аминокислотам. Природные аминокислоты включают аланин (Ala; A), аргинин (Arg; R), аспарагин (Asn; N), аспарагиновую кислоту (Asp; D), цистеин (Cys; C); глутаминовую кислоту (Glu; E), глутамин (Gln; Q), глицин (Gly; G); гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

Используемый в настоящем изобретении термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Определенные векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упоминаются в настоящем описании как "экспрессирующие векторы".

Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, и к потомству таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформанты" (или "трансформированные клетки") и "трансфектанты" (или "трансфицированные клетки"), каждая из которых включает первичную трансформированную или трансфицированную клетку и полученное от нее потомство. Такое потомство может быть не полностью идентичным по содержанию нуклеиновой кислоты родительской клетке и может со-

держат мутации.

Термин "лечение" (и его вариации, такие как "лечить") относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение заболевания или состояния у пациента, нуждающегося в этом. Лечение может проводиться как для профилактики, так и в качестве терапии клинической патологии. Целевые эффекты лечения включают предотвращение возникновения или рецидива заболевания, ослабление симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение состояния заболевания и ремиссию или улучшение прогноза.

Используемый в настоящем изобретении термин "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" относится к количеству АВР или фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении, которое при введении пациенту эффективно для лечения заболевания или расстройства.

Используемый в настоящем изобретении термин "пациент" означает млекопитающее. Типичные пациенты включают людей, обезьян, собак, кошек, мышей, крыс, коров, лошадей, верблюдов, коз, кроликов и овец. В определенных вариантах осуществления пациентом является человек. В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется заболевание или состояние, которое можно подвергать лечению с помощью АВР, представленного в настоящем изобретении. В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой вирусную инфекцию.

Термин "вкладыш в упаковку" используется для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических или диагностических продуктов (например, наборов), которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких терапевтических или диагностических продуктов.

Используемый в настоящем изобретении термин "цитотоксический агент" относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает гибель или разрушение клетки.

"Химиотерапевтический агент" относится к химическому соединению, полезному для лечения злокачественного новообразования. Химиотерапевтические агенты включают "антигормональные агенты" или "эндокринную терапию", которые действуют, чтобы регулировать, уменьшать, блокировать или ингибировать действие гормонов, которые могут способствовать росту злокачественного новообразования.

Термин "цитостатический агент" относится к соединению или композиции, которые задерживают рост клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления цитостатический агент представляет собой агент, который снижает процент клеток в S-фазе. В некоторых вариантах осуществления цитостатический агент снижает процент клеток в S-фазе по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 60% или по меньшей мере примерно на 80%.

Термин "опухоль" относится ко всем типам неопластического клеточного роста и пролиферации, будь то злокачественный рост или доброкачественный, а также ко всем предопухолевым и опухолевым клеткам и тканям. Термины "злокачественное новообразование", "злокачественный", "клеточное пролиферативное расстройство", "пролиферативное расстройство" и "опухоль" не являются взаимоисключающими, как указано в настоящем изобретении. Термины "клеточное пролиферативное расстройство" и "пролиферативное расстройство" относятся к расстройствам, которые связаны с некоторой степенью аномальной клеточной пролиферации. В некоторых вариантах осуществления клеточное пролиферативное расстройство представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых аспектах опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых аспектах опухоль представляет собой гематологическое злокачественное новообразование.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, которая позволяет биологической активности активного ингредиента, содержащегося в нем, быть эффективной при лечении пациента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для пациента в количествах, обеспеченных фармацевтической композицией.

Термины "модулировать" и "модуляция" относятся к уменьшению или ингибированию или альтернативно активации или увеличению указанной переменной.

Термины "увеличить" и "активировать" относятся к увеличению на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100%, к 2-, 3-, 4-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100-кратному или более увеличению указанной переменной.

Термины "уменьшить" и "ингибировать" относятся к уменьшению на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75%, 80, 85, 90, 95%, к 2-, 3-, 4-, 5-, 10-, 20-, 50-, 100-кратному или более уменьшению указанной переменной.

Термин "быть агонистом" относится к активации передачи сигналов рецептора для индукции биологического ответа, связанного с активацией рецептора. "Агонист" - это сущность, которая связывается с рецептором и выступает его агонистом.

Термин "быть антагонистом" относится к ингибированию передачи сигналов рецептора для ингибирования биологического ответа, связанного с активацией рецептора. "Антагонист" - это сущность, ко-

торая связывается с рецептором и противодействует ему. Антагонист в одном варианте осуществления блокирует 100% связывания лиганда с его рецептором; в других вариантах осуществления антагонист может уменьшить связывание на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или на 100% связывания лиганда с его рецептором.

Используемый в настоящем изобретении термин "молекула семафорина" в связи с агонистами оси Treg NRP-1:семафорина охватывает молекулы трансмембранного семафорина, участвующие во взаимодействии с NRP-1 на Treg (например, Sema3a, Sema4a), различные варианты таких молекул, иммобилизованные на поверхностях и гранулах, а также мультимеры, производные, мутанты, аналоги и фрагменты таких молекул, которые можно использовать для усиления функции или увеличения стабильности Treg. Неограничивающие примеры таких молекул агониста семафорина включают, например, слитые белки семафорина, полученные из IgM, которые собирают мультимерные комплексы, неспособные к фиксации комплемента, которые сшивают NRP-1.

Используемый в настоящем изобретении термин "ось нейропиплин-1 (NRP-1):семафорина регуляторной Т-клетки (Treg)" относится к сигнальному пути, инициированному семафоринном (например, семафоринном, экспрессируемым клеткой, такой как, например, обычная Т-клетка, или рекомбинантным семафоринном), к лигированию NRP-1 и последующей передаче сигналов далее по сигнальному пути.

Термин "эффекторные Т-клетки" включает хелперные (т.е. CD4+) Т-клетки и цитотоксические (т.е. CD8+) Т-клетки. Эффекторные CD4+ Т-клетки способствуют развитию нескольких иммунологических процессов, включая созревание В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти и активацию цитотоксических Т-клеток и макрофагов. Эффекторные CD8+ Т-клетки разрушают инфицированные вирусом клетки и опухолевые клетки. См. Seder and Ahmed, *Nature Immunol.*, 2003, 4:835-842, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме для дополнительной информации об эффекторных Т-клетках.

Термин "регуляторные Т-клетки" включает клетки, которые регулируют иммунологическую толерантность, например, путем подавления эффекторных Т-клеток. В некоторых аспектах регуляторная Т-клетка имеет фенотип CD4+ CD25+ Foxp3+. В некоторых аспектах регуляторная Т-клетка имеет фенотип CD8+ CD25+. См. Nocentini et al., *Br. J. Pharmacol.*, 2012, 165:2089-2099, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме для дополнительной информации о регуляторных Т-клетках, экспрессирующих NRP-1.

Термин "дендритная клетка" относится к профессиональной антиген-презентирующей клетке, способной активировать наивные Т-клетки и стимулировать рост и дифференцировку В-клеток.

2. NRP-1 антигенсвязывающие белки.

2.1. Связывание NRP-1 клетки-мишени.

В настоящем изобретении представлены АВР, которые специфично связываются с NRP-1. В некоторых аспектах NRP-1 представляет собой hNRP-1 (SEQ ID NO: 130). В некоторых аспектах NRP-1 представляет собой cNRP-1 (SEQ ID NO: 132). В некоторых аспектах NRP-1 представляет собой mNRP-1 с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 134. В некоторых аспектах NRP-1 представляет собой rNRP-1 с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, специфично связываются с внеклеточным доменом NRP-1.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, специфично связываются с внеклеточным доменом NRP-1 и внеклеточным доменом PD-1, PD-L1 или PD-L2, т.е. являются биспецифичными антителами.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, представляет собой фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, является альтернативным каркасом.

NRP-1 может быть экспрессирован на поверхности любой подходящей клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления клеткой-мишенью является Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой эффекторную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой регуляторную Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой натуральную клетку-киллер (NK). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой натуральную Т-клетку-киллер (NKT). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой макрофаг. В других вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой дендритную клетку. В одном варианте осуществления дендритная клетка представляет собой плазмцитотидную дендритную клетку.

В некоторых вариантах осуществления NRP-1 связан с другим рецептором на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления NRP-1 является частью корецепторного комплекса. В одном варианте осуществления NRP-1 ассоциирован с плексином. В некоторых вариантах осуществления NRP-1 ассоциирован с рецептором VEGF.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, включают молекулу иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем

изобретении, состоят из молекулы иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, по существу состоят из молекулы иммуноглобулина. В некоторых аспектах молекула иммуноглобулина содержит антитело. В некоторых аспектах молекула иммуноглобулина состоит из антитела. В некоторых аспектах молекула иммуноглобулина по существу состоит из антитела.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, содержат легкую цепь. В некоторых аспектах легкая цепь представляет собой легкую цепь каппа. В некоторых аспектах легкая цепь представляет собой легкую цепь лямбда.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, содержат тяжелую цепь. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgA. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgD. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgE. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgM. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG1. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG2. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG3. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG4. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgA1. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgA2.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, содержат фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, состоят из фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, по существу состоят из фрагмента антитела. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fv. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой Fab-фрагмент. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент F(ab')₂. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab'. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv (sFv). В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv-Fc. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент однодоменного антитела.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, представленный в настоящем изобретении, получен из иллюстративного антитела, представленного в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления фрагменты антител, представленные в настоящем изобретении, не получены из иллюстративного антитела, представленного в настоящем изобретении, и могут, например, быть выделены *de novo* в соответствии со способами, представленными в настоящем изобретении, для получения фрагментов антител.

В некоторых вариантах осуществления представленный фрагмент антитела специфично связывается с hNRP-1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, представленный в настоящем изобретении, специфично связывается с cNRP-1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, представленный в настоящем изобретении, специфично связывается с mNRP-1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, представленный в настоящем изобретении, специфично связывается с hNRP-1 и cNRP-1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, представленный в настоящем изобретении, специфично связывается с hNRP-1 и mNRP-1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, представленный в настоящем изобретении, специфично связывается с cNRP-1 и mNRP-1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, представленный в настоящем изобретении, специфично связывается с hNRP-1, cNRP-1 и mNRP-1.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, представленный в настоящем изобретении, сохраняет способность быть антагонистом NRP-1, что измеряется одним или более анализами или биологическими эффектами, описанными в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, представленный в настоящем изобретении, сохраняет способность предотвращать взаимодействие NRP-1 с одним или более его лигандами, как описано в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, представленный в настоящем изобретении, конкурирует за связывание с NRP-1 с антителом, выбранным из MAB1, MAB2, MAB3, MAB4, MAB5, MAB6, MAB7, MAB8, MAB9, MAB10, MAB11, MAB12, MAB13, MAB14 или MAB15, каждое из которых представлено в приложении А настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, являются специфичными для NRP-1 клеточной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, специфично блокируют связывание NRP-1 с трансмембранным полипептидом семафорина.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, блокируют взаимодействие между полипептидом NRP-1 и полипептидом фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF). В одном варианте осуществления полипептид VEGF представляет собой VEGFA.

В некоторых вариантах осуществления антитело против NRP-1 блокирует связывание SEMA3.

В некоторых вариантах осуществления антитело против NRP-1 блокирует связывание SEMA4.

В некоторых вариантах осуществления антитело блокирует взаимодействие между полипептидом NRP-1 и SEMA3.

В некоторых вариантах осуществления антитело блокирует взаимодействие между полипептидом NRP-1 и VEGF.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, способны ингибировать подавление Трег у человека.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, совместно стимулируют эффекторную Т-клетку в комбинации с презентацией антигена из антиген-презентирующей клетки.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, ингибируют подавление эффекторной Т-клетки регуляторной Т-клеткой.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, уменьшают количество эффекторных Т-клеток в ткани или системно.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, представленный в настоящем изобретении, связывается с тем же эпитопом NRP-1, что и антитело.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, представляют собой моноклональные антитела. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, являются поликлональными антителами.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, включают химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, состоят из химерного антитела. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, по существу состоят из химерного антитела. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, включают гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, состоят из гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, по существу состоят из гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, содержат человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, состоят из человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, по существу состоят из человеческого антитела.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, являются аффинно-зрелыми. В некоторых аспектах аффинно-зрелые АВР представляют собой аффинно-зрелые АВР, полученные из иллюстративного АВР, представленного в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, содержат альтернативный каркас. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, состоят из альтернативного каркаса. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, по существу состоят из альтернативного каркаса. Можно использовать любой подходящий альтернативный каркас. В некоторых аспектах альтернативный каркас выбирают из Adnectin TM, iMab, Anticalin®, EETI-II/AGRP, домена Kunitz, аптамера тиоредоксинового пептида, Affibody®, DARPin, Аффилина, Тетранектина, Финомера и Авимера.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, специфично блокирует связывание NRP-1 с трансмембранным полипептидом семафорина. В некоторых аспектах АВР ингибирует связывание NRP-1 с трансмембранным полипептидом семафорина по меньшей мере примерно на 50%. В некоторых аспектах АВР ингибирует связывание NRP-1 с трансмембранным полипептидом семафорина по меньшей мере примерно на 75%. В некоторых аспектах АВР ингибирует связывание NRP-1 с трансмембранным полипептидом семафорина по меньшей мере примерно на 90%. В некоторых аспектах АВР ингибирует связывание NRP-1 с трансмембранным полипептидом семафорина по меньшей мере примерно на 95%. В некоторых вариантах осуществления полипептид семафорина представляет собой полипептид SEMA3. В других вариантах осуществления полипептид семафорина представляет собой полипептид SEMA4.

В некоторых вариантах осуществления АВР по изобретению представляет собой АВР, который конкурирует с иллюстративным АВР, представленным в настоящем изобретении. В некоторых аспектах АВР, который конкурирует с иллюстративным АВР, представленным в настоящем изобретении, связывается с тем же эпитопом, что и иллюстративный АВР, представленный в настоящем изобретении.

Известно, что когда антитело экспрессируется в клетках, антитело модифицируется после трансляции. Примеры посттрансляционной модификации включают расщепление лизина на С-конце тяжелой цепи карбоксипептидазой; модификацию глутамина или глутаминовой кислоты на N-конце тяжелой цепи и легкой цепи до пироглутаминовой кислоты путем пироглутамилирования; гликозилирование; окисление; дезамидирование; и гликирование, и известно, что такие посттрансляционные модификации происходят в различных антителах (см. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, vol. 97, p. 2426-2447, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления АВР по изобретению представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который подвергся посттрансляционной модификации. Примеры антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента, которые подверглись посттрансляционной модификации, включают антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, которые претерпели пироглутамилирование на N-конце вариабельной области тяжелой цепи, пироглутамилирование на N-конце вариабельной области легкой цепи и/или делецию лизина на C-конце тяжелой цепи. В данной области техники известно, что такая посттрансляционная модификация из-за пироглутамилирования на N-конце и делеции лизина на C-конце не оказывает какого-либо влияния на активность антитела или его фрагмента (Analytical Biochemistry, 2006, vol. 348, p. 24-39, включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

В некоторых вариантах осуществления АБП по изобретению представляет собой антитело против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H3, состоящую из SEQ ID NO: 47, CDR-H2, состоящую из SEQ ID NO: 30 и CDR-H1, состоящую из SEQ ID NO: 14; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L3, состоящую из SEQ ID NO: 81, CDR-L2, состоящую из SEQ ID NO: 71, и CDR-L1, состоящую из SEQ ID NO: 63.

В одном варианте осуществления антитело против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 96, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 104.

В одном варианте осуществления антитело против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 96, в которой аминокислотный остаток E, соответствующий положению 1, модифицирован до пироглутамата, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 104.

В одном варианте осуществления антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 118, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126.

В одном варианте осуществления антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 118, в которой аминокислотный остаток E, соответствующий положению 1, модифицирован до пироглутамата, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126.

В одном варианте осуществления антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, соответствующей положениям аминокислот от 1 до 453 SEQ ID NO: 118, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126.

В одном варианте осуществления антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, соответствующей положениям аминокислот от 1 до 453 последовательности SEQ ID NO: 118, в которой аминокислотный остаток E, соответствующий положению 1, модифицирован до пироглутамата, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126.

2.2. Антагонизм NRP-1.

В некоторых вариантах осуществления АБП, представленные в настоящем изобретении, являются антагонистами NRP-1 при связывании.

В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АБП, представленного в настоящем изобретении, приводит к активации эффекторной Т-клетки. В некоторых аспектах эффекторная Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку. В некоторых аспектах эффекторная Т-клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АБП, представленного в настоящем изобретении, приводит к активации НК-клетки. В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АБП, представленного в настоящем изобретении, приводит к активации клетки НКТ. В некоторых вариантах осуществления НКТ-клетка представляет собой IL-17-секретирующую клетку.

В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АБП, представленного в настоящем изобретении, приводит к снижению ингибирующей активности регуляторных Т-клеток по отношению к эффекторным Т-клеткам.

В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АБП, представленного в настоящем изобретении, приводит к повышенной секреции IL-2, IL-6, GM-CSF, TNF, LT- α и/или IFN- γ клеткой-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АБП, представленного в настоящем изобретении, увеличивает пролиферацию, выживание и/или функцию эффекторных Т-клеток. В некоторых аспектах эффекторная Т-клетка представляет собой CD4⁺ эффекторную Т-клетку. В некоторых аспектах эффекторная Т-клетка представляет собой CD8⁺ эффекторную Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АБП, представленного в настоящем изобретении, аннулирует подавление эффекторной Т-клетки регуляторной Т-клеткой. В некоторых аспектах регуляторная Т-клетка представляет собой CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ регуляторную Т-клетку. В некоторых аспектах регуляторная Т-клетка представляет собой CD8⁺ CD25⁺ регуляторную Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АБП, представленного в настоящем изобретении, приводит к усилению иммунного ответа.

В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АБП, представленного в настоящем изобретении, приводит к предотвращению опухоли. В некоторых вариантах осуществления ан-

тагонизм NRP-1 посредством АВР, представленного в настоящем изобретении, приводит к задержке возникновения опухоли. В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АВР, представленного в настоящем изобретении, приводит к уменьшению размера опухоли. В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АВР, представленного в настоящем изобретении, приводит к элиминации опухоли. В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АВР, представленного в настоящем изобретении, приводит к уменьшению количества метастазов.

В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АВР, представленного в настоящем изобретении, приводит к предотвращению вирусного заболевания. В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АВР, представленного в настоящем изобретении, приводит к задержке начала вирусного заболевания. В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АВР, представленного в настоящем изобретении, приводит к снижению вирусной нагрузки у пациента. В некоторых вариантах осуществления антагонизм NRP-1 посредством АВР, представленного в настоящем изобретении, приводит к элиминации вирусной инфекции.

2.3. Аффинность и кинетика антигенсвязывающих белков по отношению к NRP-1. Эффективность.

В некоторых вариантах осуществления аффинность АВР, представленного в настоящем изобретении, к NRP-1, как выявлено с помощью K_D , составляет менее чем примерно 10^{-5} М, менее чем примерно 10^{-6} М, менее чем примерно 10^{-7} М, менее чем примерно 10^{-8} М, менее чем примерно 10^{-9} М, менее чем примерно 10^{-10} М, менее чем примерно 10^{-11} М или менее чем примерно 10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления аффинность АВР составляет примерно 10^{-7} и 10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления аффинность АВР составляет примерно от 10^{-7} до 10^{-11} М. В некоторых вариантах осуществления аффинность АВР составляет примерно 10^{-7} и 10^{-10} М. В некоторых вариантах осуществления аффинность АВР составляет примерно от 10^{-7} до 10^{-9} М. В некоторых вариантах осуществления аффинность АВР составляет примерно от 10^{-7} до 10^{-8} М. В некоторых вариантах осуществления аффинность АВР составляет примерно от 10^{-8} до 10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления аффинность АВР составляет примерно от 10^{-8} до 10^{-11} М. В некоторых вариантах осуществления аффинность АВР составляет примерно от 10^{-9} до 10^{-11} М. В некоторых вариантах осуществления аффинность АВР составляет примерно от 10^{-10} до 10^{-11} М.

2.3.1. Варианты гликозилирования.

В определенных вариантах осуществления АВР, представленный в данном изобретении, может быть изменен для увеличения, уменьшения или устранения степени, до которой он гликозилирован. Гликозилирование полипептидов обычно является "N-связанным" или "О-связанным".

"N-связанное" гликозилирование относится к присоединению углеводной части к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, где Х представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования.

"О-связанное" гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление или удаление N-связанных сайтов гликозилирования в или из АВР, представленных в настоящем изобретении, может быть выполнено путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создается или удаляется одна или более из вышеописанных трипептидных последовательностей. Добавление или удаление О-связанных сайтов гликозилирования может быть осуществлено путем добавления, делеции или замены одного или более остатков серина или треонина в или к (в зависимости от обстоятельств) последовательности АВР.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, содержит мотив гликозилирования, который отличается от встречающегося в природе АВР. Любой подходящий природный мотив гликозилирования может быть модифицирован в АВР, представленных в настоящем изобретении. Структурные и гликозилирующие свойства иммуноглобулинов известны в данной области и обобщены, например, в Schroeder and Cavacini, J. Allergy Clin. Immunol., 2010, 125:S41-52, которая включена в настоящее изобретение в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, содержит Fc-область IgG1 с модификацией олигосахарида, присоединенного к аспарагину 297 (Asn 297). Встречающиеся в природе антитела IgG1, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный 2-антенарный олигосахарид, который обычно присоединяется посредством N-связи к Asn 297 домена C_{H2} области Fc. См. Wright et al., TIBTECH, 1997, 15:26-32, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Олигосахарид, присоединенный к Asn 297, может включать различные углеводы, такие как манноза, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактоза и сиаловая кислота, а также фукоза, присоединенная к GlcNAc в "стволе" 2-антенарной структуры олигосахаридов.

В некоторых вариантах осуществления олигосахарид, присоединенный к Asn 297, модифицирован для создания АВР, обладающих измененной ADCC. В некоторых вариантах осуществления олигосахарид изменяют для улучшения ADCC. В некоторых вариантах осуществления олигосахарид изменяют для

снижения ADCC.

В некоторых аспектах АВР, представленный в настоящем изобретении, содержит домен IgG1 с пониженным содержанием фукозы в положении Asn 297 по сравнению с природным доменом IgG1. Известно, что такие домены Fc обладают улучшенной ADCC. См. Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277:26733-26740, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых аспектах такие АВР не содержат никакой фукозы в положении Asn 297. Количество фукозы может быть определено с использованием любого подходящего метода, например, как описано в WO 2008/077546, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, содержит разделенный пополам олигосахарид, такой как 2-антеннарный олигосахарид, присоединенный к Fc-области АВР, которая делится пополам GlcNAc. Такие варианты АВР могут иметь пониженное фукозилирование и/или улучшенную функцию ADCC. Примеры таких вариантов АВР описаны, например, в WO 2003/011878; патенте США № 6602684; и в патентной публикации США № 2005/0123546, каждая из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Другие иллюстративные варианты гликозилирования, которые могут быть включены в АВР, представленных в настоящем изобретении, описаны, например, в патентных публикациях США № 2003/0157108, 2004/0093621, 2003/0157108, 2003/0115614, 2002/0164328, 2004/0093621, 2004/0132140, 2004/0110704, 2004/0110282, 2004/01102865; международных патентных публикациях № 2000/61739, 2001/29246, 2003/085119, 2003/084570, 2005/035586, 2005/035778; 2005/053742, 2002/031140; Okazaki et al., *J. Mol. Biol.*, 2004, 336:1239-1249; и Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87:614-622, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, содержит Fc-область по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Такие варианты АВР могут иметь улучшенную функцию CDC. Примеры таких вариантов АВР описаны, например, в WO 1997/30087; WO 1998/58964; и WO 1999/22764, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные АВР, включают клетки Lec13 CHO, которые имеют дефицит фукозилирования белка (см. Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 249:533-545; патентная публикация США № 2003/0157108; WO 2004/056312, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), и нокаутные клеточные линии, такие как клетки CHO, нокаутные по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы или FUT8 (см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87:614-622; Kanda et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94:680-688; и WO 2003/085107, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, представляет собой агликозилированный АВР. Агликозилированный АВР может быть получен любым способом, известным в данной области техники или описанным в настоящем изобретении. В некоторых аспектах агликозилированный АВР получают путем модификации АВР для удаления всех сайтов гликозилирования. В некоторых аспектах сайты гликозилирования удаляются только из области Fc АВР. В некоторых аспектах агликозилированный АВР получают путем экспрессии АВР в организме, который не способен к гликозилированию, например, *E.coli*, или путем экспрессии АВР в бесклеточной реакционной смеси.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, имеет константную область с пониженной эффекторной функцией по сравнению с нативным антителом IgG1. В некоторых вариантах осуществления аффинность константной области Fc-области АВР, представленного в настоящем изобретении, для Fc-рецептора меньше, чем аффинность нативной константной области IgG1 для такого Fc-рецептора.

2.4. Домены NRP-1.

NRP-1 имеет как трансмембранную, так и укороченную форму. Трансмембранная форма имеет следующий вид. После короткого фрагмента секреторного сигнала NRP-1 состоит из четырех разных доменов: двух повторов домена CUB (a1/a2), двух повторов домена FV/VIII (b1/b2), домена MAM (c) и четвертого домена (d), который содержит трансмембранную и относительно короткую цитоплазматическую область, состоящую из 40-43 аминокислот. Первые домены CUB имеют значительную гомологию с фактором комплемента C1s/C1r, костным морфогенетическим белком 1 (BMP1) и толлоидными белками. Второй домен FV/VIII имеет гомологию с коагуляционным фактором FV/VIII, одним из рецепторов тирозинкиназы DDR и дискоидином-1. Третий домен MAM является аббревиатурой от меприна, A5 (прежнее название NRP) и рецептора протеин-тирозин-фосфатазы μ и κ . В одном варианте осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, связывается с доменом a1. В другом варианте осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, связывается с доменом a2. В другом варианте осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, связывается с доменом b1. В другом варианте осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, связывается с доменом b2. В одном варианте осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, связывается с более чем одним доменом.

1.1. Варианты аминокислотной последовательности Fc-области.

В определенных вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, содержит Fc-область с одной или более аминокислотными заменами, вставками или делециями по сравнению с природной Fc-областью. В некоторых аспектах такие замены, вставки или делеции приводят к получению АВР с измененной стабильностью, гликозилизацией или другими характеристиками. В некоторых аспектах такие замены, вставки или делеции приводят к получению агликозилированных АВР.

В некоторых аспектах Fc-область АВР, представленная в настоящем изобретении, модифицирована для получения АВР с измененной аффинностью к Fc-рецептору или АВР, который является более иммунологически инертным. В некоторых вариантах осуществления варианты АВР, представленные в настоящем изобретении, обладают некоторыми, но не всеми, эффекторными функциями. Такие АВР могут быть полезны, например, когда период полужизни АВР важен *in vivo*, но когда определенные эффекторные функции (например, активация комплемента и ADCC) являются ненужными или вредными.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область АВР, представленная в настоящем изобретении, представляет собой Fc-область человеческого IgG4, содержащую одну или более мутаций, стабилизирующих шарнир, S228P и L235E. См. Aalberse et al., *Immunology*, 2002, 105:9-19, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления Fc-область АВР, представленная в настоящем изобретении, представляет собой Fc-область человеческого IgG4, содержащую мутации, стабилизирующие шарнир, S228P. В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG4 содержит одну или более из следующих мутаций: E233P, F234V и L235A. См. Armor et al., *Mol. Immunol.*, 2003, 40:585-593, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления Fc-область IgG4 содержит делецию в положении G236.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область АВР, представленная в настоящем изобретении, представляет собой Fc-область человеческого IgG1, содержащую одну или более мутаций для уменьшения связывания с Fc-рецептором. В некоторых аспектах одна или более мутаций находятся в остатках, выбранных из S228 (например, S228A), L234 (например, L234A), L235 (например, L235A), D265 (например, D265A) и N297 (например, N297A). В некоторых аспектах АВР содержит мутацию PVA236. PVA236 означает, что аминокислотная последовательность ELLG от аминокислотного положения 233 до 236 IgG1 или EFLG IgG4 заменена на PVA. См. патент США № 9150641, включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область АВР, представленная в настоящем изобретении, модифицирована, как описано в Armor et al., *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29:2613-2624; WO 1999/058572; и/или приложение к патенту Великобритании № 98099518, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область АВР, представленная в настоящем изобретении, представляет собой Fc-область человеческого IgG2, содержащую одну или более мутаций A330S и P331S.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область АВР, представленная в настоящем изобретении, имеет аминокислотную замену в одном или более положениях, выбранных из 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329. См. патент США № 6737056, включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Такие Fc-мутанты включают Fc-мутанты с заменами в двух или более положениях аминокислот 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемые Fc-мутанты "DANA" с заменой остатков 265 и 297 аланином. См. патент США № 7332581, включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления АВР содержит аланин в положении аминокислоты 265. В некоторых вариантах осуществления АВР содержит аланин в положении аминокислоты 297.

В определенных вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, содержит Fc-область с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают ADCC, такими как замена в одном или более положениях 298, 333 и 334 Fc-области. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, содержит Fc-область с одной или более аминокислотными заменами в положениях 239, 332 и 330, как описано в Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2006, 103:4005-4010, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, содержит одно или более изменений, которые улучшают или уменьшают связывание C1q и/или CDC. См. пат. США 6194551; WO 99/51642; и Idusogie et al., *J. Immunol.*, 2000, 164:4178-4184, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, содержит одно или более изменений для увеличения периода полужизни. АВР с увеличенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) описаны, например, в Hinton et al., *J. Immunol.*, 2006, 176:346-356; и в пат. США № 7366140; каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Такие варианты Fc включают варианты с заменами в одном или более остатках Fc-области: 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 и 434 IgG.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, содержит один или более вариантов Fc-области, как описано в патенте США № 7371826, 5648260 и 5624821; Dun-

can and Winter, Nature, 1988, 322:738-740; и WO 94/29351, каждые из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

1.2. Пироглутамат.

Как известно в данной области, оба, глутамат (E) и глутамин (Q) на N-концах рекомбинантных белков могут спонтанно циклизироваться с образованием пироглутамата (pE) *in vitro* и *in vivo*. См. Liu et al., J. Biol. Chem., 2011, 286:11211-11217, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие полипептидную последовательность, содержащую остаток pE в N-концевом положении. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие полипептидную последовательность, в которой N-концевой остаток преобразован из Q в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие полипептидную последовательность, в которой N-концевой остаток преобразован из E в pE.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие последовательности V_H , имеющие остаток pE в N-концевом положении. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие последовательность V_H , в которой N-концевой остаток преобразован из Q в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен АBP, содержащий последовательность V_H , выбранную из SEQ ID NO: 85-90, 97-99, где N-концевой остаток Q преобразован в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлена композиция, содержащая АBP, где АBP включает V_H , выбранную из SEQ ID NO: 85-90, 97-99, в которой по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или по меньшей мере примерно 99% N-концевых остатков такой V_H в такой композиции были преобразованы из Q в pE.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие последовательности V_H , имеющие остаток pE в N-концевом положении. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие последовательность V_H , в которой N-концевой остаток преобразован из E в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен АBP, содержащий последовательность V_H , выбранную из SEQ ID NO: 91-96, где N-концевой остаток E был преобразован в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлена композиция, содержащая АBP, где АBP включает V_H , выбранную из SEQ ID NO: 91-96, в котором по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или по меньшей мере примерно 99% N-концевых остатков такой V_H в такой композиции были преобразованы из E в pE.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие последовательности V_L , имеющие остаток pE в N-концевом положении. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие последовательность V_L , в которой N-концевой остаток был преобразован из E в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен АBP, содержащий последовательность V_L , представленную в SEQ ID NO: 120, где N-концевой остаток E был преобразован в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлена композиция, содержащая АBP, где АBP содержит V_L , представленную в SEQ ID NO: 120, в которой по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или по меньшей мере примерно 99% N-концевых остатков такой V_L в такой композиции были преобразованы из E в pE.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие последовательности тяжелой цепи, имеющие остаток pE в N-концевом положении. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие последовательность тяжелой цепи, в которой N-концевой остаток преобразован из Q в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен АBP, содержащий последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 107-112, 119-121, где N-концевой остаток Q был преобразован в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлена композиция, содержащая АBP, где АBP включает тяжелую цепь, выбранную из SEQ ID NO: 107-112, 119-121, в которой по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или по меньшей мере примерно 99% N-концевых остатков такой тяжелой цепи в такой композиции были преобразованы из Q в pE.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие последовательности тяжелой цепи, имеющие остаток pE в N-концевом положении. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены АBP, содержащие последовательность тяжелой цепи, в которой N-концевой остаток преобразован из E в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен АBP, содержащий последовательность тяжелой цепи, выбранную

из SEQ ID NO: 113-118, где N-концевой остаток E был преобразован в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлена композиция, содержащая ABP, где ABP содержит тяжелую цепь, выбранную из SEQ ID NO: 113-118, в которой по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или по меньшей мере примерно 99% N-концевых остатков такой тяжелой цепи в такой композиции были преобразованы из E в pE.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены ABP, содержащие последовательности легкой цепи, имеющие остаток pE в N-концевом положении. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены ABP, содержащие последовательность легкой цепи, в которой N-концевой остаток преобразован из E в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен ABP, содержащий последовательность легкой цепи каппа, выбранную из SEQ ID NO: 124-125, где N-концевой остаток E был преобразован в pE. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлена композиция, содержащая ABP, где ABP содержит легкую цепь каппа, выбранную из SEQ ID NO: 124-125, в которой по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 60% по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или по меньшей мере примерно 99% N-концевых остатков такой легкой цепи в такой композиции были преобразованы из E в pE.

1.3. Варианты антигенсвязывающего белка со встроенным цистеином.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены ABP со встроенным цистеином, также известные как "тио-MAb", в которых один или более остатков ABP замещены остатками цистеина. В конкретных вариантах осуществления замещенные остатки находятся в доступных для растворителя сайтах ABP. При замене таких остатков цистеином реакционноспособные тиольные группы вводятся в доступные для растворителя сайты ABP и могут использоваться для конъюгирования ABP с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственного средства или фрагменты лекарственного средства-линкера, например, для создания иммуноконъюгата.

В некоторых вариантах осуществления любой один или более из следующих остатков могут быть замещены цистеином: V205 легкой цепи; A118 Fc-области тяжелой цепи; и S400 Fc-области тяжелой цепи. ABP со встроенным цистеином могут быть получены, как описано, например, в патенте США № 7521541, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

2. Способы получения антигенсвязывающих белков NRP-1.

2.1. Получение антигена NRP-1.

Антиген NRP-1, используемый для выделения ABP, представленных в настоящем изобретении, может представлять собой интактный NRP-1 или фрагмент NRP-1. Антиген NRP-1 может быть, например, в форме выделенного белка или белка, экспрессируемого на поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления антиген NRP-1 представляет собой не встречающийся в природе вариант NRP-1, такой как белок NRP-1, имеющий аминокислотную последовательность или посттрансляционную модификацию, которая не встречается в природе.

В некоторых вариантах осуществления антиген NRP-1 укорачивают путем удаления, например, внутриклеточных или мембранно-охватывающих последовательностей или сигнальных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антиген NRP-1 слит на своем C-конце с Fc-доменом человеческого IgG1 или полигистидиновой меткой.

Способы получения моноклональных антител.

Моноклональные антитела могут быть получены, например, с использованием гибридного метода, впервые описанного Kohler et al., Nature, 1975, 256:495-497 (полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), и/или методами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567, включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Моноклональные антитела также могут быть получены, например, с использованием фаговых или дрожжевых библиотек. См., например, патенты США № 8258802 и 8691303, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В гибридном способе мышь или другое подходящее животное-хозяин иммунизируют для получения лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком, используемым для иммунизации. Альтернативно лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с использованием подходящего агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, для образования гибридной клетки. См. Goding J.W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice 3rd ed. (1986), Academic Press, San Diego, CA, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Гибридные клетки высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживание не слитых родительских миеломных клеток. Например, если в родительских миеломных клетках отсутствует фермент гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для гибридом обычно включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

Пригодными миеломными клетками являются те, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильное продуцирование антител на высоком уровне выбранными антителопродуцирующими клетками и являются чувствительными к условиям сред, таким как присутствие или отсутствие среды НАТ. Среди них предпочтительными миеломными клеточными линиями являются мышинные миеломные линии, такие как линии, полученные из опухолей мышей MOP-21 и MC-11 (доступные в Центре распределения клеток Salk Institute, Сан-Диего, Калифорния), и SP-2 или X63-Ag8-653 клетки (доступны из Американской коллекции типовых культур, Rockville, MD). Клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека также были описаны для получения человеческих моноклональных антител. См., например, Kozbor, J. Immunol., 1984, 133:3001, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

После идентификации гибридных клеток, которые продуцируют антитела с желаемой специфичностью, аффинностью и/или биологической активностью, отобранные клоны могут быть субклонированы путем процедур лимитирующего разведения и выращены стандартными методами. См. Goding, выше. Подходящие культуральные среды для этой цели включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, гибридные клетки могут быть выращены *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

ДНК, кодирующая моноклональные антитела, может быть легко выделена и секвенирована с использованием традиционных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи моноклональных антител). Таким образом, гибридные клетки могут служить полезным источником ДНК, кодирующей антитела с желаемыми свойствами. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируются в клетки-хозяева, такие как бактерии (например, *E. coli*), дрожжи (например, *Saccharomyces* или *Pichia sp.*), клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют антитела, для продуцирования моноклональных антител.

В другом аспекте предложен способ получения антитела против NRP-1 человека или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина (клеток-хозяев), выбранной из группы, состоящей из (a)-(c) ниже, для экспрессии антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента:

(a) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, и полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент;

(b) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем изобретении, и экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(c) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем изобретении, и клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В другом аспекте предложен способ получения антитела против человеческого NRP-1, включающий культивирование клетки-хозяина (клеток-хозяев), выбранной из группы, состоящей из (a)-(c) ниже, для экспрессии антитела против человеческого NRP-1:

(a) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1, представленного в настоящем изобретении, и полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующих легкую цепь антитела;

(b) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1, представленного в настоящем изобретении, и экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующих легкую цепь антитела; и

(c) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1, представленного в настоящем изобретении, и клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела.

2.3. Способы получения химерных антител.

Иллюстративные способы получения химерных антител описаны, например, в патенте США № 4816567; и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., США, 1984, 81:6851-6855, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело получают с использованием рекомбинантных методик для объединения вариабельной области, не являющейся человеческой (например, вариабельной области, полученной из мыши, крысы, хомяка, кролика или примата, не являющегося человеком, такого как обезьяна) с человеческой константной областью.

2.4. Способы получения гуманизированных антител.

Гуманизированные антитела могут быть получены путем замены большей части или всех структурных частей моноклонального антитела, не являющегося человеческим, соответствующими последовательностями человеческого антитела. Следовательно, генерируется гибридная молекула, в которой только антигенспецифическая вариабельная область, или CDR, состоит из последовательности, не являющейся человеческой. Способы получения гуманизированных антител включают методы, описанные, например, в Winter and Milstein, Nature, 1991, 349:293-299; Rader et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1998, 95:8910-8915; Steinberger et al., J. Biol. Chem., 2000, 275:36073-36078; Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., США, 1989, 86:10029-10033; и в патентах США № 5585089, 5693761, 5693762 и 6180370, каждые из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

2.5. Способы получения человеческих антител.

Человеческие антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области, например, с использованием трансгенных животных (например, гуманизированных мышей). См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci., США, 1993, 90:2551; Jakobovits et al., Nature, 1993, 362:255-258; Bruggermann et al., Year in Immuno., 1993, 7:33; и патенты США № 5591669, 5589369 и 5545807; каждые из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Человеческие антитела также могут быть получены из библиотек фагового дисплея (см., например, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 1991, 227:381-388; Marks et al., J. Mol. Biol., 1991, 222:581-597; и патент США № 5565332 и 5573905; каждые из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Человеческие антитела могут также генерироваться активированными *in vitro* В-клетками (см., например, патенты США № 5567610 и 5229275, каждые из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Человеческие антитела также могут быть получены из дрожжевых библиотек (см., например, патент США № 8691730, включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

2.6. Способы получения фрагментов антител

Фрагменты антител, представленные в настоящем изобретении, могут быть получены любым подходящим способом, включая иллюстративные способы, описанные в настоящем изобретении, или известные в данной области. Подходящие методы включают рекомбинантные методы и протеолитическое расщепление цельных антител. Иллюстративные способы получения фрагментов антител описаны, например, в Hudson et al., Nat. Med., 2003, 9:129-134, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Способы получения антител scFv описаны, например, в Pluckthun, в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315 (1994); WO 93/16185; и в патенте США № 5571894 и 5587458; каждые из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

2.7. Способы получения альтернативных каркасов.

Альтернативные каркасы, представленные в настоящем изобретении, могут быть получены любым подходящим способом, включая иллюстративные способы, описанные в настоящем изобретении, или известные в данной области техники. Например, способы получения Adnectins™ описаны в Emanuel et al., MAbs, 2011, 3:38-48, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Способы приготовления iMab описаны в патентной публикации США № 2003/0215914, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Способы получения Anticalins® описаны в Vogt and Skerra, Chem. Biochem., 2004, 5:191-199, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Способы получения доменов Kunitz описаны в Wagner et al., Biochem. & Biophys. Res. Comm., 1992, 186:118-1145, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Способы получения тиоредоксиновых пептидных аптамеров представлены в Geyer and Brent, Meth. Enzymol., 2000, 328:171-208, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Способы получения аффител представлены в Fernandez, Curr. Opinion in Biotech., 2004, 15:364-373, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Способы получения DARPin представлены в Zahnd et al., J. Mol. Biol., 2007, 369:1015-1028, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Способы получения аффилинов представлены в Ebersbach et al., J. Mol. Biol., 2007, 372:172-185, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Способы получения тетранектинов представлены в Graversen et al., J. Biol. Chem., 2000, 275:37390-37396, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Способы получения Авимер предоставлены в Silverman et al., *Nature Biotech.*, 2005, 23:1556-1561, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Способы получения Финомер представлены в Silacci et al., *J. Biol. Chem.*, 2014, 289:14392-14398, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Дополнительная информация об альтернативных каркасах представлена в Binz et al., *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23:1257-1268; и Skerra, *Current Opin. in Biotech.*, 2007, 18:295-304, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

2.8. Способы получения вариантов.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, является вариантом родительского АВР со зрелой аффинностью, который может быть сгенерирован, например, с использованием методов созревания аффинности на основе фагового дисплея. Вкратце один или более остатков CDR могут быть мутированы, и варианты АВР или их части могут быть представлены на фаге и подвергнуты скринингу на аффинность. Такие изменения могут быть сделаны в "горячих точках" CDR или остатках, кодируемых кодонами, которые подвергаются мутации с высокой частотой во время процесса соматического созревания (см. Chowdhury, *Methods Mol. Biol.*, 2008, 207:179-196, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), и/или в остатках, которые связываются с антигеном.

Любой подходящий метод может быть использован для введения вариабельности в полинуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую АВР, включая ПЦР пониженной точности, перегруппировку цепей и олигонуклеотид-направленный мутагенез, такой как тринуклеотид-направленный мутагенез (TRIM). В некоторых аспектах несколько остатков CDR (например, 4-6 остатков за один раз) рандомизированы. Остатки CDR, участвующие в связывании антигена, могут быть конкретно идентифицированы, например, с использованием сканирующего аланином мутагенеза или моделирования. В частности, CDR-H3 и CDR-L3 часто являются мишенями для мутации.

Введение разнообразия в вариабельные области и/или CDR можно использовать для создания вторичной библиотеки. Затем вторичную библиотеку подвергают скринингу для идентификации вариантов АВР с улучшенной аффинностью. Созревание аффинности путем конструирования и повторного выбора из вторичных библиотек описано, например, в Hoogenboom et al., в *Methods in Molecular Biology*, 178:1-37, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

2.9. Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные способы.

Также предоставлены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие АВР NRP-1, векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, содержащие векторы и нуклеиновые кислоты, а также рекомбинантные способы получения АВР.

В другом аспекте предложен полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении. В другом аспекте предложен полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении.

В другом аспекте предложен полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1, представленного в настоящем изобретении. В другом аспекте предложен полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела против человеческого NRP-1, представленного в настоящем изобретении.

Для рекомбинантного продуцирования АВР нуклеиновую кислоту (кислоты), кодирующую его, можно выделить и вставить в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (т.е. амплификации ДНК) или экспрессии. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота может быть получена путем гомологичной рекомбинации, например, как описано в патенте США № 5204244, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В другом аспекте предложен экспрессирующий вектор, содержащий

(а) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, представленных в настоящем изобретении; и/или

(б) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В другом аспекте предложен экспрессирующий вектор, содержащий

(а) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1, представленного в настоящем изобретении; и/или

(б) полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела против человеческого NRP-1.

В данной области известно много разных векторов. Компоненты вектора обычно включают в себя одно или более из следующего: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрип-

ции, например, как описано в патенте США № 5534615, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Иллюстративные примеры подходящих клеток-хозяев приведены ниже. Эти клетки-хозяева не предназначены для ограничения, и любая подходящая клетка-хозяин может быть использована для продуцирования АВР, представленных в настоящем изобретении.

В другом аспекте предложена клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, выбранная из группы, состоящей из (a)-(d):

(a) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем изобретении, и полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующих переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(b) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем изобретении, и экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующих переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(c) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую переменную область тяжелой цепи антитела против человеческого NRP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем изобретении; и

(d) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую переменную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящем изобретении.

В другом аспекте предоставлена клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, выбранная из группы, состоящей из (a)-(d):

(a) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1, представленное в настоящем изобретении, и полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела;

(b) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1, представленного в настоящем изобретении, и экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующих легкую цепь антитела;

(c) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела против человеческого NRP-1, представленного в настоящем изобретении; и

(d) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую легкую цепь антитела против человеческого NRP-1, представленного в настоящем изобретении.

Подходящие клетки-хозяева включают любые прокариотические (например, бактериальные), низшие эукариотические (например, дрожжи) или высшие эукариотические (например, млекопитающих) клетки. Подходящие прокариоты включают зубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как Escherichia (E.coli), Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella (S. typhimurium), Serratia (S. marcescans) Shigella, Bacilli (B. subtilis и B. licheniformis), Pseudomonas (P. aeruginosa) и Streptomyces. Одним из приемлемых хозяев для клонирования E.coli является E.coli 294, хотя другие штаммы, такие как E.coli B, E.coli X1776 и E.coli W3110, также являются подходящими.

В дополнение к прокариотам эукариотические микробы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, также являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии для векторов, кодирующих NRP-1 АВР. Saccharomyces cerevisiae, или обычные пекарские дрожжи, представляют собой широкоиспользуемый низший эукариотический микроорганизм-хозяин. Однако имеется ряд других родов, видов и штаммов, таких как Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces (K. lactis, K. fragilis, K. bulgaricus K. wickerhamii, K. waltii, K. drosophilae, K. thermotolerans и K. marxianus), Yarrowia, Pichia pastoris, Candida (C. albicans), Trichoderma reesei, Neurospora crassa, Schwanniomycetes (S. occidentalis) и нитевидные грибы, такие как, например, Penicillium, Tolypocladium и Aspergillus (A. nidul. и A. niger).

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования АВР NRP-1, раскрытые в настоящем изобретении, могут культивироваться в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как, например, F10 Хэма, Минимальная основная среда (МЕМ), RPMI-1640, и модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, может использоваться любая из сред, описанных в Ham et al., Meth. Enz., 1979, 58:44; Barnes et al., Anal. Biochem., 1980, 102:255; и патен-

тах США № 4767704, 4657866, 4927672, 4560655 и 5122469; или WO 90/03430 и WO 87/00195. Каждая из вышеуказанных ссылок включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Любая из этих сред может при необходимости дополняться гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками, микроэлементами (определенными как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области.

Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются такими, которые ранее использовались для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для специалиста в данной области техники.

При использовании рекомбинантных методов АВР может быть продуцирован внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или может непосредственно секретироваться в среду. Если АВР продуцируется внутриклеточно, на первой стадии твердые частицы, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, удаляются, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. Например, Carter et al. (Bio/Technology, 1992, 10:163-167, включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме) описывает процедуру выделения АВР, которые секретируются в периплазматическое пространство *E.coli*. Вкратце клеточную пасту размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение примерно 30 мин. Клеточный дебрис можно удалить центрифугированием.

В некоторых вариантах осуществления АВР продуцируется в бесклеточной системе. В некоторых аспектах бесклеточная система представляет собой систему транскрипции и трансляции *in vitro*, как описано в Yin et al., MAbs, 2012, 4:217-225, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах бесклеточная система использует бесклеточный экстракт из эукариотической клетки или из прокариотической клетки. В некоторых аспектах прокариотической клеткой является *E.coli*. Бесклеточная экспрессия АВР может быть полезной, например, когда АВР накапливается в клетке в виде нерастворимого агрегата или когда имеет место низкий выход в результате периплазматической экспрессии.

Когда АВР секретируется в среду, супернатанты из таких систем экспрессии обычно сначала концентрируют, используя коммерчески доступный фильтр для концентрации белка, например, блок ультрафильтрации Amicon® или Millipore® Pellcon®. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен в любую из вышеупомянутых стадий для ингибирования протеолиза, и могут быть включены антибиотики для предотвращения роста внешних загрязняющих веществ.

Композиция АВР, полученная из клеток, может быть очищена с использованием, например, хроматографии на гидроксилapatите, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является особенно приемлемым методом очистки. Пригодность протеина А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc-домена иммуноглобулина, который присутствует в АВР. Протеин А может быть использован для очистки АВР, которые содержат тяжелые цепи $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., J. Immunol.Meth., 1983, 62:1-13, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Протеин G пригоден для всех мышинных изоформ и для человеческого $\gamma 3$ (Guss et al., EMBO J., 1986, 5:1567-1575, включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, чаще всего является агарозной, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или полистиролдивинилбензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем это может быть достигнуто с агарозой. Когда АВР содержит домен CH3, смола Baker-Bond ABX® пригодна для очистки.

Другие методы очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ВЭЖХ, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарин-сефарозе®, хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония, также доступны и могут быть применены специалистом в данной области.

После любой стадии (стадий) предварительной очистки смесь, содержащую представляющий интерес АВР и загрязняющие вещества, может быть подвергнута хроматографии гидрофобного взаимодействия с низким pH с использованием элюирующего буфера при pH от примерно 2,5 до примерно 4,5, обычно выполняемой при низких концентрациях соли (например, от примерно 0 М до примерно 0,25 М соли).

3. Анализы.

Разнообразные анализы, известные в данной области, могут быть использованы для идентификации и характеристики АВР NRP-1, представленных в настоящем изобретении.

3.1. Анализы связывания, конкуренции и картирования эпитопов.

Специфическая антигенсвязывающая активность АВР, представленная в настоящем изобретении,

может быть оценена любым подходящим способом, включая использование SPR, BLI, RIA, KinExA, проточной цитометрии и MSD-SET. Кроме того, антигенсвязывающая активность может быть оценена с помощью анализов ИФА и Вестерн-блоттинга.

Анализы для измерения конкуренции между двумя АВР или между АВР и другой молекулой (например, одним или более лигандами NRP-1) описаны в другом месте настоящего изобретения и, например, в Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, ch.14, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Анализы для картирования эпитопов, с которыми связываются АВР, представленные в настоящем изобретении, описаны, например, в Morris "Epitope Mapping Protocols", в *Methods in Molecular Biology* vol. 66, 1996, Humana Press, Totowa, NJ, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления эпитоп определяют конкуренцией пептидов. В некоторых вариантах осуществления эпитоп определяют с помощью масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления эпитоп определяют с помощью кристаллографии.

3.2. Анализ антагонизма NRP-1.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, подвергаются скринингу для идентификации или характеристики АВР с антагонистической активностью в отношении NRP-1. Любой подходящий анализ может быть использован для идентификации или характеристики таких АВР. В некоторых аспектах анализ измеряет количество цитокина, секретируемого эффекторной Т-клеткой после контакта эффекторной Т-клетки с АВР, представленным в настоящем изобретении. В некоторых аспектах цитокин выбран из IL-2, IL-6, LT- α , TNF, GM-CSF, IFN γ и их комбинации. В некоторых аспектах цитокин выбран из sCD40L, VEGF, TGF- α , RANTES, PDGF-AB/BB, PDGF-AA, MIP-1 β , MIP-1 α , MDC (CCL22), MCP-3, MCP-1, IP-10, IL-17A, IL-2R α , IL-15, IL-13, IL-12 (p70), IL-12 (p40), IL-10, IL-9, IL-8, IL-7, IL-5, IL-4, IL-3, IL-2, IL-2R α , IL-1RA, IL-1 β , IL-1 α , IFN γ , IFN α 2, GRO, GM-CSF, G-CSF, фракталкина, Flt-3 лиганда, FGF-2, эотаксина, EGF и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления эффекторные клетки совместно стимулируют агонистом CD3, чтобы стимулировать секрецию цитокинов эффекторной клеткой. В некоторых аспектах агонист CD3 предоставляется на субмаксимальном уровне.

В некоторых аспектах такие анализы могут измерять пролиферацию эффекторной Т-клетки после контакта эффекторной Т-клетки с АВР, представленным в настоящем изобретении. В некоторых аспектах пролиферацию эффекторных Т-клеток измеряют путем разбавления красителя (например, диацетата сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина; CFSE), поглощения тритированного тимидина, люминесцентного анализа жизнеспособности клеток или других анализов, известных в данной области.

В некоторых аспектах такие анализы могут измерять дифференцировку, продуцирование цитокинов, жизнеспособность (например, выживание), пролиферацию или супрессивную активность регуляторной Т-клетки после контакта регуляторной Т-клетки с АВР, представленным в настоящем изобретении.

В некоторых аспектах такие анализы могут измерять цитотоксическую активность НК-клетки после контакта НК-клетки с АВР, представленным в настоящем изобретении. В некоторых аспектах цитотоксическую активность НК-клеток измеряют с использованием анализа цитотоксичности, который количественно определяет НК-опосредованное уничтожение клеток-мишеней (например, клеточной линии K562). См. Jang et al., *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2012, 42:42-49, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых аспектах такие анализы могут измерять количество гранзима В. В некоторых аспектах такие анализы могут измерять количество перфорина.

3.3. Анализ эффекторных функций.

Эффекторная функция после обработки АВР, представленным в настоящем изобретении, может быть оценена с использованием различных анализов *in vitro* и *in vivo*, известных в данной области, в том числе описанных в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, 9:457-492; патентах США № 5500362, 5821337; Hellstrom et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci., USA*, 1986, 83:7059-7063; Hellstrom et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci., USA*, 1985, 82:1499-1502; Bruggemann et al., *J. Exp. Med.*, 1987, 166:1351-1361; Clynes et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci., USA*, 1998, 95:652-656; WO 2006/029879; WO 2005/100402; Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 1996, 202:163-171; Cragg et al., *Blood*, 2003, 101:1045-1052; Cragg et al., *Blood*, 2004, 103:2738-2743; и Petkova et al., *Int'l. Immunol.*, 2006, 18:1759-1769, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

4. Фармацевтические композиции.

АВР, представленные в настоящем изобретении, могут быть приготовлены в любой подходящей фармацевтической композиции и введены любым подходящим путем введения. Подходящие пути введения включают, но не ограничиваются ими, внутриартериальный, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, назальный, парентеральный, легочный и подкожный пути введения.

В другом аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против NRP-1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества.

В другом аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая множество видов антигенов против человеческого NRP-1 или их антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем изобретении. Например, фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который не подвергается посттрансляционной модификации, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полученные в результате посттрансляционной модификации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере два вида антител против человеческого NRP-1, выбранных из (1)-(4):

(1) антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 118, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126;

(2) антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 118, в которой аминокислотный остаток E, соответствующий положению 1, модифицирован до пироглутамата, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126;

(3) антитела против человеческого NRP-1, содержащего тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, соответствующей положениям аминокислот от 1 до 453 SEQ ID NO: 118, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126; и

(4) антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, соответствующей положениям аминокислот от 1 до 453 последовательности SEQ ID NO: 118, в которой аминокислотный остаток E, соответствующий положению 1, модифицирован до пироглутамата, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 118, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126, антитело против человеческого NRP-1, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, соответствующей положениям аминокислот от 1 до 453 SEQ ID NO: 118, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Фармацевтическая композиция может содержать одно или более фармацевтических вспомогательных веществ. Может быть использовано любое подходящее фармацевтическое вспомогательное вещество, и специалист в данной области способен выбрать подходящие фармацевтические вспомогательные вещества.

Соответственно фармацевтические вспомогательные вещества, представленные ниже, предназначены для иллюстрации, а не ограничения. Дополнительные фармацевтические вспомогательные вещества включают, например, те, которые описаны в Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rowe et al. (eds.), 6th ed. (2009), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит противовспенивающий агент. Может быть использован любой подходящий противовспенивающий агент. В некоторых аспектах противовспенивающий агент выбран из спирта, простого эфира, масла, воска, силикона, поверхностно-активного вещества и их комбинаций. В некоторых аспектах противовспенивающий агент выбран из минерального масла, растительного масла, этилен-бис-стеарамида, парафинового воска, сложноэфирного воска, воска жирного спирта, жирного спирта с длинной цепью, мыла жирной кислоты, эфира жирной кислоты, кремний гликоля, фторсиликона, сополимера полиэтиленгликоль-полипропиленгликоль, полидиметилсилоксан-диоксид кремния, эфира, октилового спирта, каприлового спирта, триолеата сорбитана, этилового спирта, 2-этилгексанола, диметикона, олеилового спирта, симетикона, и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит соразтворитель. Иллюстративные примеры соразтворителей включают этанол, поли(этилен)гликоль, бутиленгликоль, диметилацетамид, глицерин, пропиленгликоль и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит буфер. Иллюстративные примеры буферов включают ацетат, борат, карбонат, лактат, малат, фосфат, цитрат, гидроксид, диэтаноламин, моноэтаноламин, глицин, метионин, гуаровую камедь, глутамат натрия и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит носитель или наполнитель. Иллюстративные примеры носителей или наполнителей включают лактозу, мальтодекстрин, маннит, сорбит, хитозан, стеариновую кислоту, ксантановую камедь, гуаровую камедь и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество.

Иллюстративные примеры поверхностно-активных веществ включают d-альфа-токоферол, бензалконий хлорид, бензетоний хлорид, цетримид, цетилпиридиний хлорид, докузат натрия, глицерилбегенат, глицерилмоноолеат, лауриновую кислоту, гидроксистеарат макрогола 15, миристиловый спирт, фосфолипиды, полиоксиэтиленалкиловые эфиры, эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, полиоксиэтиленстеараты, полиоксилглицериды, лаурилсульфат натрия, сложные эфиры сорбитана, полиэтилен(гликоль)сукцинат витамина E и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит агент против сле-

живания. Иллюстративные примеры агентов против слеживания включают фосфат кальция (трехосновный), гидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, оксид магния и их комбинации.

Другие вспомогательные вещества, которые можно использовать с фармацевтическими композициями, включают, например, альбумин, антиоксиданты, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты, биорассасывающиеся полимеры, хелатирующие агенты, агенты с контролируемым высвобождением, разбавители, диспергирующие агенты, усилители растворения, эмульгирующие агенты, желирующие агенты, основы мази, усилители проникновения, консерванты, солюбилизующие агенты, растворители, стабилизирующие агенты, сахара и их комбинации. Конкретные примеры каждого из этих агентов описаны, например, в Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rowe et al. (eds.) 6th ed. (2009), The Pharmaceutical Press, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит растворитель. В некоторых аспектах растворитель представляет собой солевой раствор, такой как стерильный изотонический солевой раствор или раствор декстрозы. В некоторых аспектах растворителем является вода для инъекций.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции находятся в форме частиц, таких как микрочастица или наночастица. Микрочастицы и наночастицы могут быть сформированы из любого подходящего материала, такого как полимер или липид. В некоторых аспектах микрочастицы или наночастицы представляют собой мицеллы, липосомы или полимерсомы.

Кроме того, в настоящем изобретении представлены безводные фармацевтические композиции и лекарственные формы, содержащие АВР, поскольку вода может способствовать деградации некоторых АВР.

Безводные фармацевтические композиции и лекарственные формы, представленные в настоящем изобретении, могут быть получены с использованием безводных или содержащих низкую влажность ингредиентов и низкой влажности или условий низкой влажности. Фармацевтические композиции и лекарственные формы, которые содержат лактозу и по меньшей мере один активный ингредиент, который содержит первичный или вторичный амин, могут быть безводными, если ожидается значительный контакт с влагой и/или влажностью во время производства, упаковки и/или хранения.

Безводную фармацевтическую композицию следует готовить и хранить таким образом, чтобы сохранить ее безводную природу. Соответственно безводные композиции могут быть упакованы с использованием материалов, о которых известно, что они предотвращают воздействие воды, так что они могут быть включены в подходящие рецептурные наборы. Примеры подходящей упаковки включают, но не ограничиваются ими, герметически запаивающую фольгу, пластмассы, контейнеры с единичной дозой (например, флаконы), блистерные упаковки и контурные упаковки ленточного типа.

4.1. Парентеральные лекарственные формы.

В определенных вариантах осуществления АВР, представленные в настоящем изобретении, включают в состав в виде парентеральных лекарственных форм. Парентеральные лекарственные формы могут вводиться пациентам различными путями, включая, но не ограничиваясь этим, подкожный, внутривенный (включая инфузии и болюсные инъекции), внутримышечный и внутриартериальный. Поскольку их введение обычно обходит естественную защиту пациента от загрязнений, парентеральные лекарственные формы обычно стерильны или могут быть стерилизованы перед введением пациенту. Примеры парентеральных лекарственных форм включают, но не ограничиваются ими, растворы, готовые для инъекции, сухие (например, лиофилизированные) продукты, готовые для растворения или суспендирования в фармацевтически приемлемом носителе для инъекции, суспензии, готовые для инъекции, и эмульсии.

Подходящие носители, которые можно использовать для обеспечения парентеральных лекарственных форм, хорошо известны специалистам в данной области. Примеры включают, но не ограничиваются ими, воду для инъекций USP; водные носители, такие как, но не ограничиваясь этим, инъекция хлорида натрия, инъекция Рингера, инъекция декстрозы, инъекция декстрозы и хлорида натрия и инъекция Рингера с лактатом; смешивающиеся с водой носители, такие как, но не ограничиваясь этим, этиловый спирт, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль; и неводные носители, такие как, но не ограничиваясь этим, кукурузное масло, хлопковое масло, арахисовое масло, кунжутное масло, этилолеат, изопропилмиристат и бензилбензоат.

Вспомогательные вещества, которые увеличивают растворимость одного или более раскрытых в настоящем изобретении АВР, также могут быть включены в парентеральные лекарственные формы.

В некоторых вариантах осуществления парентеральная лекарственная форма является лиофилизированной. Иллюстративные лиофилизированные составы описаны, например, в патентах США № 6267958 и 6171586; и WO 2006/044908, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

5. Дозировка и стандартные лекарственные формы.

В области терапии человека врач определяет дозировку, которую он считает наиболее подходящей, в соответствии с профилактической или лечебной терапией и в соответствии с возрастом, массой, состоянием и другими факторами, характерными для пациента, подлежащего лечению.

В определенных вариантах осуществления композиция, представленная в настоящем изобретении, представляет собой фармацевтическую композицию или стандартную лекарственную форму. Фармацев-

тические композиции и стандартные лекарственные формы, представленные в настоящем изобретении, содержат профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более профилактических или терапевтических АВР.

Количество АВР или композиции, которая будет эффективной для предотвращения или лечения расстройства или одного или более его симптомов, будет зависеть от характера и тяжести заболевания или состояния, а также от пути введения АВР. Частота и дозировка также будут варьироваться в зависимости от факторов, специфичных для каждого пациента, в зависимости от назначенной конкретной терапии (например, терапевтических или профилактических агентов), тяжести расстройства, заболевания или состояния, пути введения, а также возраста, тела, массы, ответа и прошлой истории болезни пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на моделях животных.

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные дозы композиции включают количества АВР в миллиграммах или микрограммах на килограмм массы пациента или образца (например, от примерно 10 микрограмм на килограмм до примерно 50 миллиграммов на килограмм, от примерно 100 микрограмм на килограмм до примерно 25 миллиграммов на килограмм или от примерно 100 микрограммов на килограмм до примерно 10 миллиграммов на килограмм). В определенном варианте осуществления доза АВР, представленного в настоящем изобретении, в расчете на массу АВР, вводимая для предотвращения, лечения, терапии или ослабления расстройства, или одного или более его симптомов у пациента, составляет 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 40 мг/кг или более от массы тела пациента. В некоторых случаях может быть необходимо использовать дозы АВР, выходящие за пределы, раскрытые в настоящем изобретении, что будет очевидно для специалистов в данной области. Кроме того, следует отметить, что клиницист или лечащий врач будет знать, как и когда прервать, скорректировать или прекратить терапию в зависимости от ответа пациента.

Различные терапевтически эффективные количества могут быть применимы для различных заболеваний и состояний, что известно специалистам в данной области. Аналогичным образом, количества, достаточные для предотвращения, терапии, лечения или ослабления таких расстройств, но недостаточные для того, чтобы вызывать нежелательные явления или достаточные для уменьшения нежелательных явлений, связанных с АВР, представленных в настоящем изобретении, также охватываются количествами доз и схемами частоты доз, представленными в настоящем изобретении. Кроме того, когда пациенту вводят несколько доз композиции, представленной в настоящем изобретении, не все дозы должны быть одинаковыми. Например, дозировка, вводимая пациенту, может быть увеличена для улучшения профилактического или терапевтического эффекта композиции или может быть уменьшена для уменьшения одного или более нежелательных явлений, которые испытывает конкретный пациент.

В определенных вариантах осуществления лечение или предотвращение можно начинать с одной или более нагрузочных доз АВР или композиции, представленной в настоящем изобретении, с последующей одной или более поддерживающими дозами.

В определенных вариантах осуществления доза АВР или композиции, представленных в настоящем изобретении, может быть введена для достижения равновесной концентрации АВР в крови или сыворотке пациента. Равновесная концентрация может быть определена путем измерения в соответствии с методиками, доступными специалистам, или может быть основана на физических характеристиках пациента, таких как рост, масса и возраст.

В некоторых вариантах осуществления введение одной и той же композиции может повторяться, и введения могут быть отделены друг от друга по меньшей мере на 1 день, 2 дня, 3 дня, 5 дней, 10 дней, 15 дней, 30 дней, 45 дней, 2 месяца, 75 дней, 3 месяца или на 6 месяцев. В других вариантах осуществления введение одной и той же композиции может повторяться, и композиция может вводиться один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели. В определенных вариантах осуществления первая доза, вводимая пациенту, может представлять собой "нагрузочную дозу". Нагрузочная доза может быть более высокой, чем последующие дозы.

Как обсуждается более подробно в другом месте в этом изобретении, АВР, представленный в настоящем изобретении, необязательно можно вводить с одним или более дополнительными агентами, полезными для предотвращения или лечения заболевания или расстройства. Эффективное количество таких дополнительных агентов может зависеть от количества АВР, присутствующего в составе, типа расстройства или лечения и других факторов, известных в данной области техники или описанных в настоящем изобретении.

6. Терапевтические применения.

Для терапевтических применений АВР по изобретению вводят млекопитающему, обычно человеку, в фармацевтически приемлемой лекарственной форме, такой как известные в данной области и обсуждаемые выше. Например, АВР по изобретению можно вводить человеку внутривенно в виде болуса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутримышечно, внутривенно, интрацеребрально, подкожно, внутрь сустава, внутрь синовиальной жидкости, интракостально или внутрь опухоли. АВР также целесообразно вводить перитуморально, внутрь пораженной ткани или периферически по отношению к пораженной ткани, чтобы оказывать как локальные, так и сис-

темные терапевтические эффекты. Внутривнутрибрюшинный путь может быть особенно полезен, например, при лечении опухолей яичников.

ABP, представленные в настоящем изобретении, могут быть полезны для лечения любого заболевания или состояния, включающего NRP-1. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, для которого может быть полезно лечение анти-NRP-1 ABP. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой нарушение пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой злокачественное новообразование.

В некоторых вариантах осуществления ABP, представленные в настоящем изобретении, предназначены для использования в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления ABP, представленные в настоящем изобретении, предназначены для использования при изготовлении или приготовлении лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство предназначено для лечения заболевания или состояния, для которых может быть полезен анти-NRP-1 ABP. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой пролиферативное расстройство клеток. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой вирусную инфекцию.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения заболевания или состояния у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества ABP, представленного в настоящем изобретении. В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых аспектах заболевание или состояние представляет собой вирусную инфекцию.

Любое подходящее злокачественное новообразование можно лечить с помощью ABP, представленных в настоящем изобретении. Иллюстративные подходящие виды злокачественного новообразования включают, например, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), аденокарцинома, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, базальноклеточный рак, опухоль головного мозга, рак желчного протока, рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, бронхиальную опухоль, карциному неизвестного первичного происхождения, опухоль сердца, рак шейки матки, хордому, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, рак протоковой кишки, эмбриональную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, эстезиобластому, фиброзную гистиоцитому, саркому Юинга, рак глаза, герминогенную опухоль, рак желчного пузыря, рак желудка, желудочно-кишечный рак, опухоль желудочно-кишечного тракта, гестационную трофобластическую болезнь, глиому, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, гистиоцитоз, лимфому Ходжкина, рак гипофарингеального канала, внутриочную меланому, инсулиному, саркому Капоши, рак почки, гистиоцитоз клеток Лангерганса, рак гортани, рак губ и полости рта, рак печени, лобулярную карциному *in situ*, рак легкого, макроглобулинемию, злокачественную фиброзную гистиоцитому, меланому, клеточную карциному Меркеля, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным происхождением, NUT-карциному срединного тракта, рак ротовой полости, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому, грибовидный микоз, миелодиспластический синдром, миелодиспластическое/миелолипролиферативное новообразование, рак носовой полости и парциальной пазухи носа, рак носоглотки, нейробластома, немелкоклеточный рак легкого, рак ротоглотки, остеосаркома, рак яичника, рак щитовидной железы, папилломатоз, параганглиома, рак парашитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитому, опухоль гипофиза, плевропульмональную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечноклеточный рак, рак почки и мочеточника, ретинобластому, рабдоидную опухоль, рак слюнной железы, синдром Сезари, рак кожи, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, опухоль спинного мозга, рак желудка, Т-клеточную лимфому, тератоидную опухоль, рак яичка, рак горла, тимома и рак тимуса, рак щитовидной железы, рак уретры, рак матки, рак влагалища, рак вульвы и опухоль Вильмса.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ антагонизма NRP-1 в клетке-мишени пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества ABP, представленного в настоящем изобретении. В некоторых аспектах антагонизм NRP-1 посредством ABP, представленного в настоящем изобретении, приводит к повышенной секреции IL-2, LT- α , IL-6, TNF, GM-CSF, IFN γ или их комбинаций клеткой-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ увеличения пролиферации, выживания, и/или функции эффекторной Т-клетки у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества ABP, представленного в настоящем изобретении. В некоторых аспектах эффекторная Т-клетка представляет собой CD4+ эффекторную Т-клетку. В некоторых аспектах эффекторная Т-клетка представляет собой CD8+ эффекторную Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ отмены по-

давления эффекторных Т-клеток регуляторными Т-клетками у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении. В некоторых аспектах регуляторная Т-клетка представляет собой CD4+ CD25+ Foxp3+ регуляторную Т-клетку. В некоторых аспектах регуляторная Т-клетка представляет собой CD8+ CD25+ регуляторную Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ повышения активности натуральной клетки-киллера (НК), натуральной Т-клетки-киллера Т (НКТ), макрофагов или дендритных клеток (например, плазмацитоидных дендритных клеток) у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения пациента, имеющего злокачественное новообразование, без сопутствующего снижения уровня тромбоцитов. В некоторых аспектах способ не приводит к значительному количеству тромбоцитопении у пациента.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ усиления иммунного ответа у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ, задерживающий возникновение опухоли у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ, предотвращающий возникновение опухоли у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ отсрочки возникновения злокачественного новообразования у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ предотвращения возникновения злокачественного новообразования у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ уменьшения размера опухоли у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ уменьшения количества метастазов у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ снижения титра вируса у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ продления периода общей выживаемости, среднего времени выживаемости или выживаемости без прогрессирования заболевания у пациента, нуждающегося в этом, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения пациента, который стал устойчивым к стандартному терапевтическому лечению, путем введения пациенту эффективного количества АВР, представленного в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления стандартное терапевтическое средство, к которому пациент стал устойчивым, представляет собой ингибитор PD-1. В других вариантах осуществления стандартное терапевтическое средство, к которому пациент стал устойчивым, представляет собой ингибитор PD-L1. В других вариантах осуществления стандартное терапевтическое средство, к которому пациент стал устойчивым, представляет собой ингибитор CTLA-4.

7. Комбинированные терапии.

В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, вводят по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. Любой подходящий дополнительный терапевтический агент может быть введен с АВР, представленным в настоящем изобретении. В некоторых аспектах дополнительный терапевтический агент выбран из облучения, цитотоксического агента, химиотерапевтического агента, цитостатического агента, антигормонального агента, ингибитора EGFR, иммуностимулирующего агента, антиангиогенного агента и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент включает иммуностимулирующий агент.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой агент, который блокирует передачу сигналов ингибирующего рецептора иммунной клетки или ее лиганда. В некоторых аспектах ингибирующий рецептор или лиганд выбран из PVRIG, VISTA, CCR4, CD27, CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, Tim3, TIGIT, нейритина, BTLA, KIR и их комбинаций. В некоторых аспектах агент выбран из антитела против PD-1 (например, пембролизумаба или ниволумаба) и антитела против PD-L1 (например, атезолизумаба), антитела против CTLA-4 (например, ипилимумаба), и их комбинации. В не-

которых аспектах агент представляет собой пембролизумаб. В некоторых аспектах агентом является ниволумаб. В некоторых аспектах агент представляет собой атезолизумаб.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1. В некоторых аспектах дополнительный терапевтический агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, выбран из антитела, пептидомиметика и низкомолекулярного соединения. В некоторых аспектах дополнительный терапевтический агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, выбран из пембролизумаба, ниволумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, BMS-936559, сульфамонетоксина 1 и сульфаметизола 2. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, представляет собой любое терапевтическое средство, известное в данной области, которое обладает такой активностью, например, как описано в Weinmann et al., Chem. Med. Chem., 2016, 14:1576 (DOI: 10.1002/cmdc.201500566), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, включен в состав той же фармацевтической композиции, что и АВР, представленный в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, включают в состав другой фармацевтической композиции, отличной от представленного в настоящем изобретении АВР. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, вводят до введения АВР, представленного в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, вводят после введения АВР, представленного в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления агент, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1, вводят одновременно с АВР, представленным в настоящем изобретении, но агент и АВР вводят в отдельных фармацевтических композициях.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой агент, который при введении отдельно и в рекомендуемой дозе приводит к определенному количеству тромбоцитопении у пациента. В некоторых аспектах такой агент можно вводить в комбинации с АВР, представленным в настоящем изобретении, в уменьшенной дозировке. Такая комбинированная терапия может быть безопасно введена, не приводя к существенному ухудшению состояния тромбоцитов или тромбоцитопении.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой агонист костимулирующего рецептора иммунной клетки. В некоторых аспектах костимуляторный рецептор выбран из OX40, ICOS, CD28, CD37, GITR, CD40 и 4-1BB и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой антитело.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой цитокин. В некоторых аспектах цитокин выбран из IL-2, IL-5, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой онколитический вирус. В некоторых аспектах онколитический вирус выбран из вируса простого герпеса, вируса везикулярного стоматита, аденовируса, вируса болезни Ньюкасла, вируса коровьей оспы и вируса мараба.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой Т-клетку с химерным рецептором антигена (CAR-Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой би- или полиспецифичное антитело, направленное на Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий агент представляет собой антитело против TGF- β . В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующее средство представляет собой ловушку TGF- β .

В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой вакцину против опухолевого антигена. Любой подходящий антиген может быть мишенью для вакцины при условии, что он присутствует в опухоли, которую подвергают лечению способами, представленными в настоящем изобретении. В некоторых аспектах опухолевый антиген представляет собой опухолевый антиген, который сверхэкспрессируется по сравнению с уровнями его экспрессии в нормальной ткани. В некоторых аспектах опухолевый антиген выбран из антигена рака яичка, антигена дифференцировки, NY-ESO-1, MAGE-A1, MART и их комбинаций.

Дополнительные примеры дополнительных терапевтических агентов включают таксан (например, паклитаксел или доцетаксел); платиновый агент (например, карбоплатин, оксалиплатин и/или цисплатин); ингибитор топоизомеразы (например, иринотекан, топотекан, этопосид и/или митоксантрон); фолиновую кислоту (например, лейковорин); или нуклеозидный метаболический ингибитор (например, фторурацил, капецитабин и/или гемцитабин).

В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой фолиновую кислоту, 5-фторурацил и/или оксалиплатин. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой 5-фторурацил и иринотекан. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой таксан и платиновый агент. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет со-

бой паклитаксел и карбоплатин. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой пеметрексат. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой целевое терапевтическое средство, такое как EGFR, RAF или MEK-направленный агент.

Дополнительный терапевтический агент можно вводить любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, и дополнительный терапевтический агент включены в одну и ту же фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления АВР, представленный в настоящем изобретении, и дополнительный терапевтический агент включены в различные фармацевтические композиции.

В вариантах осуществления, где АВР, представленный в настоящем изобретении, и дополнительный терапевтический агент включены в различные фармацевтические композиции, введение АВР может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента. В некоторых аспектах введение АВР, представленного в настоящем изобретении, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение примерно одного месяца относительно друг друга. В некоторых аспектах введение АВР, представленного в настоящем изобретении, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение приблизительно одной недели относительно друг друга. В некоторых аспектах введение АВР, представленного в настоящем изобретении, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение приблизительно одного дня относительно друг друга. В некоторых аспектах введение АВР, представленного в настоящем изобретении, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение примерно 12 ч относительно друг друга. В некоторых аспектах введение АВР, представленного в настоящем изобретении, и дополнительного терапевтического агента происходит в течение примерно 1 ч относительно друг друга.

8. Наборы.

Также предложены наборы, содержащие АВР, представленные в настоящем изобретении. Наборы могут использоваться для лечения, предотвращения и/или диагностики заболевания или расстройства, как описано в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит контейнер и этикетку или вкладыш в упаковке или на контейнере. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пакеты для внутривенного введения. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или при объединении с другой композицией эффективна для лечения, предотвращения и/или диагностики заболевания или расстройства. Контейнер может иметь стерильный порт доступа. Например, если контейнер представляет собой пакет для внутривенного раствора или флакон, он может иметь отверстие, которое может быть проколото иглой. По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой АВР, представленный в настоящем изобретении. Этикетка или вкладыш в упаковке указывает, что композиция используется для лечения выбранного состояния.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит

(a) первый контейнер с первой композицией, содержащейся в нем, где первая композиция содержит АВР, представленный в настоящем изобретении; и

(b) второй контейнер со второй композицией, содержащейся в нем, где вторая композиция содержит дополнительный терапевтический агент.

Набор в этом варианте осуществления изобретения может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, указывающий, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния.

Альтернативно или дополнительно набор может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых аспектах вспомогательное вещество является буфером. Набор может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая фильтры, иглы и шприцы.

Примеры

Ниже приведены примеры способов и композиций по изобретению. Понятно, что различные другие варианты осуществления могут применяться на практике, учитывая общее описание, приведенное в настоящем изобретении.

Пример 1. Селекция антител.

Материалы и методы.

Антигены биотинилировали с использованием набора EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation от Pierce. Козий F(ab')₂ против человеческого каппа-FITC (LC-FITC), ExtrAvidin-PE (EA-PE) и стрептавидин-AF633 (SA-633) были получены от Southern Biotech, Sigma и Molecular Probes, соответственно. Микрогранулы со стрептавидином и колонки для разделения MACS LC были приобретены у Miltenyi Biotec. Козье антитело против человеческого IgG-PE (Human-PE) было получено от Southern Biotech.

Обнаружение с использованием наивных библиотек.

Восемь наивных человеческих синтетических дрожжевых библиотек, каждая из которых имела ~10⁹ разнообразия, размножали, как описано ранее (см., например, Y. Xu et al., Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and

analytical tool. PEDS 26.10, 663-70 (2013); WO 2009036379; WO 2010105256; и WO 2012009568.) Для первых двух раундов селекции осуществляли методику сортировки магнитных гранул с использованием системы Miltenyi MACS, как описано ранее (см., например, Siegel et al., "High efficiency recovery and epitope-specific sorting of an scFv yeast display library", *J. Immunol. Methods*, 286(1-2), 141-153 (2004)). Вкратце дрожжевые клетки ($\sim 10^{10}$ клеток/на библиотеку) инкубировали с 5 мл 100 нМ биотинилированного антигена в течение 30 мин при 30°C в промывочном буфере (фосфатно-буферный солевой раствор (PBS)/0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA)). После промывания один раз 40 мл ледяным промывочным буфером клеточный осадок ресуспендировали в 20 мл промывочного буфера и добавляли к дрожжам стрептавидиновые микрогранулы (500 мкл) и инкубировали в течение 15 мин при 4°C. Затем дрожжи осаждали, ресуспендировали в 20 мл промывочного буфера и загружали в колонку Miltenyi LS. После загрузки 20 мл колонку промывали 3 раза 3 мл промывочного буфера. Колонку затем удаляли из магнитного поля и дрожжи элюировали 5 мл питательной среды и затем наращивали в течение ночи. Следующие раунды селекции осуществляли с использованием проточной цитометрии. Приблизительно 2×10^7 дрожжей осаждали, трижды промывали промывочным буфером и инкубировали при 30°C либо с уменьшающимися концентрациями биотинилированного антигена (от 100 до 1 нМ) в условиях равновесия, 100 нМ биотинилированных антигенов разных видов с получением видовой перекрестной реактивности, или с реагентом истощения поли-специфичности (PSR) для удаления неспецифических антител из селекции. Для истощения PSR библиотеки инкубировали с разведенным 1:10 биотинилированным реагентом PSR, как описано ранее (см., например, Y. Xu et al., Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool. PEDS 26.10, 663-70 (2013).) Дрожжи затем дважды промывали промывочным буфером и окрашивали LC-FITC (в разведении 1:100) и либо SA-633 (в разведении 1:500) или EAPE (в разведении 1:50) вторичными реагентами в течение 15 мин при 4°C. После промывки дважды промывочным буфером осадок клеток ресуспендировали в 0,3 мл промывочного буфера и переносили в пробирки с крышками с фильтром. Сортировку проводили с использованием сортера FACS ARIA (BD Biosciences) и определяли границы сортировки для селекции антител с желаемыми характеристиками. Раунды селекции повторяли до тех пор, пока не была получена популяция со всеми желаемыми характеристиками. После последнего раунда сортировки дрожжи высевали и отбирали отдельные колонии для характеристики.

Оптимизация антител.

Оптимизацию антител проводили по протоколу диверсификации легкой цепи, а затем путем введения различий в переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, как описано ниже. Комбинация некоторых из этих подходов была использована для каждого антитела.

Протокол диверсификации партии легких цепей: плазмиды тяжелых цепей из результатов наивной селекции экстрагировали из дрожжей посредством метода "smash and grab", наращивали и затем очищали из *E. coli* и трансформировали в библиотеку легких цепей с разнообразием 5×10^6 . Селекцию осуществляли с одним раундом MACS и четырьмя раундами FACS, используя те же условия, что и при обнаружении с использованием наивных библиотек.

Селекция CDRH1 и CDRH2. CDRH3 одиночного антитела рекомбинировали в предварительно созданную библиотеку с вариантами CDRH1 и CDRH2 с разнообразием 1×10^8 , и селекцию проводили с одним раундом MACS и четырьмя раундами FACS, как описано в разделе "обнаружение с использованием наивных библиотек". Для каждого раунда FACS скринировали библиотеки на предмет связывания PSR видовую перекрестную реактивность и давление аффинности, и проводили сортировку, чтобы получить популяцию с желаемыми характеристиками.

Селекция мутантов VH. Переменная область тяжелой цепи (VH) была мутагенизирована с помощью ПЦР пониженной точности. Затем была создана библиотека путем трансформации этого мутагенизированного V_H и экспрессирующего вектора тяжелой цепи в дрожжи, уже содержащие плазмиду легкой цепи родителя. Селекцию осуществляли аналогично предыдущим циклам с использованием сортировки FACS для двух раундов. Для каждого раунда FACS скринировали библиотеки на предмет связывания PSR, видовую перекрестную реактивность и давление аффинности, и проводили сортировку, чтобы получить популяцию с желаемыми характеристиками.

Продуцирование и очистка антител.

Клоны дрожжей выращивали до насыщения и затем индуцировали в течение 48 ч при 30°C при встряхивании. После индукции дрожжевые клетки осаждали, и супернатанты собирали для очистки. IgG очищали с использованием колонки с Протеином А и элюировали уксусной кислотой, pH 2. Фрагменты Fab получали путем расщепления папаином и очищали с помощью KappaSelect® (GE Healthcare LifeSciences).

Измерения ForteBio KD.

Измерения аффинности ForteBio проводили на Octet RED384, как правило, как описано ранее (см., например, Estep et al., High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. *Mabs* 5(2), 270-278 (2013)). Вкратце измерения аффинности ForteBio выполняли, загружая IgG онлайн на сенсоры АНҚ. Сенсоры уравнивали в автономном режиме в буфере для анализа в

течение 30 мин и затем контролировали в режиме онлайн в течение 60 с для установления исходного уровня. Сенсоры с загруженными IgG подвергали воздействию 100 нМ антигена в течение 3 мин, а затем переносили в аналитический буфер в течение 3 мин для измерения скорости диссоциации. Для оценки моновалентной аффинности вместо IgG использовали Fab. Для этой оценки небютинилизированный слитый антиген Fc загружали в режиме онлайн на сенсоры АНҚ. Сенсоры уравнивали в автономном режиме в буфере для анализа в течение 30 мин и затем контролировали в режиме онлайн в течение 60 с для установления исходного уровня. Сенсоры с загруженным антигеном подвергали воздействию 200 нМ Fab в течение 3 мин, а затем их переносили в аналитический буфер в течение 3 мин для измерения скорости диссоциации. Все кинетические данные анализировали с использованием модели связывания 1:1.

ForteBio связывание эпитопов/блокирование лигандов.

Связывание эпитопов/блокирование лигандов проводили с использованием стандартного анализа перекрестного блокирования в сэндвич-формате. Контрольный IgG против мишени загружали на сенсоры АНҚ, и незанятые Fc-связывающие сайты на сенсоре блокировали нерелевантным человеческим антителом IgG1. Затем сенсоры подвергали воздействию 100 нМ антигена-мишени с последующим добавлением второго антитела против мишени или лиганда. Дополнительное связывание вторым антителом или лигандом после ассоциации антигена указывает на незанятый эпитоп (не конкурент), в то время как отсутствие связывания указывает на блокирование эпитопа (конкурент или блокирование лиганда).

Эксклюзионная хроматография.

Колонку TSKgel® SuperSW mAb HTP (22855) использовали для быстрого SEC-анализа mAb, продуцируемых млекопитающими, при 0,4 мл/мин с продолжительностью цикла 6 мин/цикл. В качестве подвижной фазы использовали 200 мМ фосфата натрия и 250 мМ хлорида натрия.

Динамическая сканирующая флуориметрия.

10 мкл 20× Sypro Orange добавляли к 20 мкл 0,2-1 мг/мл раствора mAb или Fab. Прибор RT-PCR (BioRad CFX96 RT PCR) использовали для повышения температуры планшета для образца от 40 до 95°C с шагом 0,5°C, с уравниванием в течение 2 мин при каждой температуре. Отрицание первой производной для необработанных данных используется для извлечения Tm.

Пример 2. Характеристика антител.

Измерения ForteBio KD: Количественное связывание антител с рекомбинантным мономерным NRP-1 человека, мыши или яванской макаки измеряли с использованием биослойной интерферометрии (BLI) с использованием ForteBio®. Измерения аффинности выбранных антител выполняли, как правило, как описано в Ester et al., *Mabs*, 2013, 5:270-278, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Измерения аффинности ForteBio выполняли, загружая IgG (человеческий IgG1 N297A) в режиме онлайн на сенсоры АНҚ. Сенсоры уравнивали в автономном режиме в буфере для анализа в течение 30 мин и затем контролировали в режиме онлайн в течение 60 с для установления исходного уровня. Сенсоры с загруженными IgG подвергали воздействию одной концентрации антигена (100 нМ) в течение 3 мин. После этого их переносили в аналитический буфер на 3 мин для измерения скорости диссоциации. Кинетические данные анализировали с использованием модели связывания 1:1. Сводка измерений K_D для антител, связывающихся при одной концентрации NRP-1 человека, яванской макаки и мыши, показана в табл. 5 ниже.

Дополнительные измерения K_D были выполнены с восемью антителами (человеческий IgG4 S228P) с использованием кинетики мультиконцентрации. Аффинность связывания для человеческого NRP-1-His, NRP-1-His яванской макаки и мышинного NRP-1-His измеряли с использованием прибора Octet QKe (ForteBio). Стратегию захвата антител на сенсорах с последующей ассоциацией/диссоциацией мономерных белков NRP-1 использовали, чтобы избежать эффектов avidности в анализе. Анализ BLI проводили при 30°C использованием 1X буфера кинетики (ForteBio) в качестве аналитического буфера. Биосенсоры захвата антитела против человеческого IgG Fc (АНС) (ForteBio) сначала предварительно замачивали в аналитическом буфере в течение более чем 5 мин. Тестируемое антитело (5 мкг/мл) было захвачено на сенсор на 250 с. Затем сенсоры погружали в аналитический буфер на 60 с для установления исходных данных перед измерением связывания с каждым белком NRP-1. Затем сенсоры погружали в различные концентрации человеческого NRP-1-His (93,3-0,7 нМ, 2-кратные разведения в аналитическом буфере), NRP-1-His яванской макаки (93,3-1,5 нМ, 2-кратные разведения в аналитическом буфере) или мышинный NRP-1-His (93,3-1,5 нМ, 2-кратные разведения в аналитическом буфере) в течение 250 с для измерения ассоциации. Диссоциацию NRP-1 затем измеряли погружением сенсоров в аналитический буфер в течение 600 с. Перемешивание на всех стадиях составляло 1000 об/мин. Кинетические параметры получали с помощью программного обеспечения для анализа данных Octet версии 8.2.0.7 с использованием эталонного вычитания ("связывание" антитела с буфером), межстадийной коррекции на основе диссоциации, модели связывания 1 к 1 и глобального подбора (R_{max} не связан с сенсором). Значения K_D приведены в табл. 6.

Измерения MSD-SET KD. Измерения аффинности равновесия в растворе отселектированных антител, связывающихся с человеческим NRP-1, выполняли в целом, как описано ранее. См. Ester et al., выше, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Вкратце равновесное

титрование в растворе (SET) проводили в PBS+0,1% BSA, не содержащем IgG (PBSF), с антигеном, который оставался постоянным при 10-100 пМ и инкубировали с 3-5-кратными серийными разведениями Fab или mAb, начиная с 10 пМ-10 нМ. Антитела (20 нМ в PBS) наносили на стандартные планшеты для связывания MSD-ECL в течение ночи при 4°C или при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем планшеты блокировали с помощью BSA в течение 30 мин при встряхивании при 700 об/мин, после чего трижды промывали промывочным буфером (PBSF+0,05% Tween® 20). Образцы SET наносили и инкубировали на планшетах в течение 150 с при встряхивании при 700 об/мин с последующей одной промывкой. Антиген, захваченный на планшете, детектировали со стрептавидином, меченным сульфо-меткой, в концентрации 250 нг/мл в PBSF путем инкубации на планшете в течение 3 мин. Планшеты трижды промывали промывочным буфером и затем считывали на приборе MSD Sector Imager 2400, используя 1× считывающий буфер T с поверхностно-активным веществом. Процент свободного антигена наносили на график как функцию титрованного антитела в Prism и приводили в соответствие квадратному уравнению для извлечения K_D . Для повышения производительности в ходе экспериментов MSD-SET, включая подготовку образцов SET, использовались манипуляционные роботы для работы с жидкостью.

Таблица 5

Аффинность связывания антител - кинетика единичной концентрации

MAb	ForteBio IgG KD Человеческий NRP-1 His (M) Одновалентный	ForteBio IgG KD NRP-1 His яванской макаки (M) Одновалентный	ForteBio IgG KD Мышиный NRP-1 His (M) Одновалентный	MSD Fab KD Человеческий NRP-1 His (M) Одновалентный
1	1.87E-09	2.16E-09	2.12E-09	3.20E-10
2	1.86E-09	2.43E-09	1.94E-09	2.30E-10
3	1.08E-09	1.19E-09	9.90E-10	6.00E-11
4	8.51E-10	9.25E-10	7.46E-10	4.60E-11
5	3.23E-09	4.09E-09	5.06E-09	2.80E-10
6	4.72E-09	5.54E-09	6.98E-09	4.50E-10
7	1.12E-08	1.09E-08	1.47E-08	Н.О.
8	6.13E-10	6.42E-10	5.52E-10	9.60E-11
9	6.45E-10	6.43E-10	5.66E-10	1.90E-11
10	8.68E-10	8.66E-10	7.46E-10	6.40E-11
11	4.85E-10	4.80E-10	4.46E-10	2.10E-11
12	4.81E-10	4.69E-10	4.40E-10	2.60E-11
13	1.41E-09	1.58E-09	7.42E-09	5.40E-10
14	1.12E-09	1.10E-09	5.00E-09	2.80E-10
15	8.51E-10	9.20E-09	5.41E-08	1.80E-10

Аффинность связывания антител - кинетика множественной концентрации

MAb	ForteBio IgG KD Человеческий NRP- 1 His (M) Одновалентный	ForteBio IgG KD Яванской макаки NRP-1 His (M) Одновалентный	ForteBio IgG KD Мышиный NRP-1 His (M) Одновалентный
MAb2 I111T* IgG4 S228P	2.8E-09	5.5E-09	4.6E-09
MAb2 IgG4 S228P	2.4E-09	4.5E-09	5.1E-09
MAb3 IgG4 S228P	3.7E-09	7.3E-09	4.4E-09
MAb4 IgG4 S228P	3.1E-09	4.5E-09	2.3E-09
MAb5 IgG4 S228P	8.4E-09	1.2E-08	6.6E-09
MAb12 IgG4 S228P	1.2E-10	1.9E-10	1.6E-10
MAb13 IgG4 S228P	9.6E-10	9.4E-10	3.7E-09
MAb14 IgG4 S228P	8.7E-10	7.4E-10	2.7E-09

Пример 3. Противоопухолевая эффективность девяти MAb против NRP-1 в отдельности и в комбинации с антителом PD-1 или PD-L1.

Девять оптимизированных антител оценивали на противоопухолевую эффективность с использованием иммунокомпетентных мышей. Анализ проводили с панелью мышиных версий MAb 2, 3, 4, 5, 7, 12, 13, 14 и 15, а также с контролем IgG и SEC10 (SEQ ID NO 141-142) в качестве компаратора. Антитела тестировали как химерные мышиные антитела IgG2a, содержащие мутацию N2 97A, которая устраняет эффекторные функции ADCC и CDC. Противоопухолевую эффективность измеряли с использованием модели сингенной опухоли ободочной кишки мыши CT26, выращенной на самках мышей BALB/c. В день 1 имплантировали подкожно 3×10^5 клеток CT26 мыши. Мышей рандомизировали по массе тела, и антитела вводили внутривенно в указанной дозе в тот же день, что и имплантацию опухолевых клеток. Антитела против NRP-1 вводили в виде монотерапии в дозе 500 мкг/на дозу или в комбинации с ингибитором контрольной точки иммунитета против PD-1, который использовали в дозе 200 мкг/на дозу. На фиг. 1A показан эффект монотерапии антител в модели CT26, а на фиг. 1B показан эффект комбинации антител против NRP-1 с антителом против PD-1. Черные стрелки вдоль горизонтальной оси указывают дни обработки антителами. Средний объем опухоли от 10 мышей на группу показан для каждой группы обработки.

На фиг. 1C показано подмножество данных из фиг. 1A и 1B, сравнивающих mMAb12 индивидуально и в комбинации с контрольным антителом против PD-1 в модели сингенной опухоли толстой кишки мыши CT26. mMAb12 при 500 мкг/на животное ингибирует рост опухоли на 61,6% TGI (ингибирование роста опухоли) по сравнению с мышами, обработанными контрольным антителом. Этот эффект был статистически значимым по критерию Стьюдента ($p < 0,05$). Антитело контрольной точки против PD-1, введенное в дозе 200 мкг/на животное, было менее эффективным, чем mMAb12 (37,8% TGI, $p < 0,05$). Однако комбинация mMAb12 с антителом PD-1 приводила к аддитивной противоопухолевой эффективности (79,0% TGI, $p < 0,001$) по сравнению с монотерапией. Эффект комбинации был статистически значимым по сравнению с PD-1 и mMAb12 ($p < 0,05$ в обоих случаях). У обработанных мышей, которые все прибавили в весе в течение курса лечения, не было выявлено неблагоприятной токсичности, за исключением одной не связанной с лечением гибели мыши в группе mMAb12.

Те же девять антител оценивали во второй модели опухоли, сингенной модели MC38 толстой кишки мыши. 5×10^5 мышиных MC38-клеток подкожно имплантировали самкам мышей C57B1/6. Мыши были рандомизированы на группы обработки, когда опухоли достигали среднего объема опухоли от 60 до 90 мм³ с последующим началом обработки в 1-й день. Антитела против NRP-1 вводили в виде монотерапии в дозе 500 мкг/на дозу или в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки против PD-L1, который использовали в дозе 250 мкг/на дозу. Антитело против PD-L1 работает по тому же пути иммунной контрольной точки, что и антитело против PD-1. На фиг. 2A показан эффект монотерапии антител в модели MC38, а на фиг. 2B показан эффект комбинации антител против NRP-1 с антителом против PD-L1. Черные стрелки вдоль горизонтальной оси указывают дни обработки. Средний объем опухоли от 10 мышей на группу показан для каждой группы обработки.

Противоопухолевая эффективность mMAb12 в модели сингенной опухоли толстой кишки мыши MC38 показана на фиг. 2C. mMAb12 при 500 мкг/на животное ингибирует рост опухоли на 77,3% TGI ($p < 0,05$) по сравнению с мышами, обработанными контрольным антителом. Модель MC38 очень чувствительна к блокаде антител PD-1. Следовательно, антитело против PD-L1 в дозе 250 мкг/на животное, которое работает на том же пути иммунной контрольной точки, что и антитело PD-1, было использовано

для демонстрации потенциальных преимуществ комбинации. Как и ожидалось, монотерапия PD-L1 блокировала рост опухоли при 77,5% TGI ($p < 0,05$). Однако комбинация mMAB12 с антителом PD-L1 не продемонстрировала дополнительных противоопухолевых преимуществ (76,2% TGI). Как и в случае модели CT26, у обработанных мышей не наблюдалось неблагоприятной токсичности, все они прибавили в весе в ходе лечения. Четыре антитела (MAB 2, 5, 12 и 13) были отобраны на основании их эффективности в исследованиях CT26 и MC38 и повторно протестированы на модели MC38 в тех же условиях (отдельно и в комбинации с антителом против PD-L1). Результаты повторного исследования MC38 подтвердили вышеуказанные результаты в отношении эффективности и переносимости.

Пример 4. Оценка блокады лигандов NRP-1.

Количественные исследования блокирования лигандов, измерения способности антител блокировать связывание рекомбинантного человеческого SEMA3A и человеческого VEGFA с рекомбинантным человеческим NRP-1, измеряли с помощью блокирующего ИФА. Для измерения способности антитела блокировать взаимодействие SEMA3A/NRP-1, на аналитический планшет наносили покрытие в виде человеческого SEMA3A при 2,5 мкг/мл в PBS, в течение ночи при 4°C. Биотинилированный человеческий NRP-1 (500 нг/мл в 1% BSA/PBS) инкубировали с тестируемым антителом (30-0,002 мкг/мл, 4-кратное разведение в 1% BSA/PBS) перед добавлением в аналитический планшет, а затем HRP-конъюгированный стрептавидин (1:200 в 1% BSA/PBS) использовали для детектирования NRP-1, связанного с SEMA3A. Вкратце для измерения способности антитела блокировать взаимодействие VEGFA/NRP-1 на аналитический планшет наносили покрытие в виде человеческого NRP-1 при 2,5 мкг/мл в PBS, в течение ночи при 4°C. Тестируемое антитело (30-0,002 мкг/мл, 4-кратное разведение в 1% BSA/PBS) инкубировали с VEGFA (125 нг/мл) перед добавлением в аналитический планшет биотинилированного антитела против VEGFA (0,2 мкг/мл в 1% BSA/PBS), и затем конъюгированный с HRP стрептавидин (1:200 в 1% BSA/PBS) использовали для детектирования VEGFA, связанного с NRP-1. Значения IC₅₀ для 15 тестируемых антител в формате IgG1, блокирующих связывание SEMA3A/VEGFA, показаны в табл. 7.

Таблица 7

Значения IC₅₀ для анализа блокирования с использованием антител формата IgG1

MAB	IC ₅₀ (нМ) блокирования SEMA3A/NRP-1	IC ₅₀ (нМ) блокирования VEGFA/NRP-1
1	2,9	Нет блокирования
2	3,1	Нет блокирования
3	0,6	Нет блокирования
4	3,9	Нет блокирования
5	5,9	Нет блокирования
6	1,8	7,4
7	1,7	6,9
8	2	7,3
9	1,8	6,5
10	1,5	6,7
11	0,8	5,9
12	0,8	6
13	3,4	Нет блокирования
14	3,1	Нет блокирования
15	Нет блокирования	Нет блокирования

Восемь MAB были преобразованы в формат IgG4 S228P, и анализ повторяли. Сводка средних значений приведена в табл. 8.

Таблица 8

Средние значения для анализов блокирования с использованием антител формата IgG4

MAB	IC50 (нМ) блокирования SEMA3A/NRP-1	n	IC50 (нМ) блокирования VEGFA/NRP-1	n
MAB2 I1111T* IgG4 S228P	2,8	2	Нет блокирования	1
MAB2 IgG4 S228P	2,6	2	Нет блокирования	2
MAB3 IgG4 S228P	2	2	Нет блокирования	2
MAB4 IgG4 S228P	2,3	2	Нет блокирования	2
MAB5 IgG4 S228P	2,9	2	Нет блокирования	2
MAB12 IgG4 S228P	1,2	2	3,2	2
MAB13 IgG4 S228P	0,9	2	2,9	2
MAB14 IgG4 S228P	0,6	2	2,5	2

* Гуманизирующая сайт-направленная мутация.

Пример 5. Эпитоп-специфическая сортировка MAB12 против SEC10.

Эпитоп-специфическую сортировку для MAB12 и SEC10 измеряли с использованием интерферометрии BioLayer (BLI) с использованием прибора Octet® QKe (ForteBio®). MAB12 или SEC10 в концентрации 5 мкг/мл иммобилизовали на АНС-сенсорах с антителами против Fc в течение 300 с. Сенсоры затем погружали в буфер кинетики для определения исходного уровня. Затем сенсоры погружали в человеческий IgG при 200 мкг/мл в течение 400 с для насыщения всех сайтов связывания Fc IgG на сенсорах. После определения исходного уровня сенсоры подвергали воздействию 100 нМ человеческого NRP-1-HIS в течение 300 с, чтобы обеспечить связывание антигена. Наконец, сенсоры переносили в лунки, содержащие 20 мкг/мл либо MAB12, либо SEC10, на 300 с для анализа связывания антител. Если тестируемое антитело демонстрировало четкое связывание на последней стадии, оно считалось неконкурентным (другая эпитопная группа), а если тестируемое антитело не показывало четкого связывания, его считали конкурентом (та же эпитопная группа).

Результаты показаны на фиг. 3. Захват MAB12 и последующее связывание NRP-1 не препятствует SEC10 также связывать NRP-1 (верхняя панель). Точно так же захват SEC10 и затем связывание NRP-1 не препятствует тому, чтобы MAB12 также связывал NRP-1 (нижняя панель). Самосортировка (например, захват MAB12, связывание NRP-1, тестируемое связывание MAB12) служил положительным контролем для сортировки. Эти данные показывают, что MAB12 и SEC10 могут одновременно связывать NRP-1 и поэтому должны связываться с разными эпитопами.

Пример 6. Связывание антител против NRP-1 с доменами NRP-1.

Чтобы понять приблизительный домен связывания для антител, связывающихся с человеческим NRP-1, способность антител связываться с фрагментами NRP-1, которые содержали разные домены внеклеточной области NRP-1, измеряли с помощью BLI с использованием прибора Octet® QKe (ForteBio®). Рекомбинантные слитые белки человеческого NRP-1 и Fc (NRP-1-Fc) состояли из доменов a1, a1a2, a1a2b1, a2b1b2 или a1a2b1b2, и различия в связывании антител с каждым белком привели к определению того, с каким доменом прежде всего связывается антитело. Анализ BLI проводили при 29 или 30°C, используя 1× буфер кинетики (ForteBio) в качестве аналитического буфера. Вкратце антитела (5 мкг/мл) захватывали на биосенсорах с антителом против человеческого IgG Fc (АНС) в течение 250 с. Затем сенсоры погружали в аналитический буфер (100 с) для достижения исходного уровня перед измерением связывания с каждым белком NRP-1. Затем проводили стадию гашения с использованием человеческого Fc IgG (150, 250 или 500 нМ в зависимости от эксперимента) в течение 250 с. Затем сенсоры погружали в каждый белок NRP-1 при 500 нМ в течение 300 с с последующей диссоциацией каждого белка NRP-1 в аналитическом буфере в течение 900 или 1000 с. Перемешивание проводили при 900 или 1000 об/мин для всех стадий в зависимости от эксперимента.

Табл. 9 показывает результаты анализов, описанных выше. Домен связывания для каждого антитела показан в крайнем правом столбце.

Специфичность связывания доменов NRP1

Антитело	a1	a1a2	a1a2b1	a2b1b2	a1a2b1b2	Связывающий Домен
MAV1	-	+	+	+	+	a2
MAV2	-	+	+	+	+	a2
MAV3	+	+	+	+	+	a1
MAV4	+	+	+	+	+	a1
MAV5	-	+	+	+	+	a2
MAV6	-	+	+	+	+	a2
MAV7	-	-	-	+	+	b2
MAV8	-	-	+	+	+	b1
MAV9	-	-	+	+	+	b1
MAV10	-	-	+	+	+	b1
MAV11	-	-	+	+	+	b1
MAV12	-	-	+	+	+	b1
MAV13	-	-	+	+	+	b1
MAV14	-	-	+	+	+	b1
MAV15	+	+	+	-	+	a1
SEC10*	-	-/+	+	+	+	b1 со слабым a2
SEC3**	+	+	+	-	+	a1
MAV59941***	-	-	-	+	+	b2

* SEQ ID NO: 141-142.

** Описано в Appleton, et. al., EMBO Journal (2007), 26, 4902-4912.

*** Описано в Delgoffe G.M., Woo S-R, Turnis M.E., Gravano D.M., Guy C., Overacre A.E. et al., Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis, Nature, 501(7466):252-6. Доступно от R & D Systems.

Пример 7. Мутационный анализ для определения эпитопа.

Чтобы идентифицировать эпитоп для связывания MAV12 с доменом b1 человеческого NRP1, в человеческом домене NRP1 b1 были сделаны точечные мутации. Использовались либо аланиновые замены, либо специфические остатки NRP2 (MAV12 не связывает NRP2). Белки экспрессировали в клетках HEK293, секретировали в виде растворимого белка, очищали на смоле Ni-NTA и охарактеризовывали на SDS-PAGE. Связывание оценивали с помощью биослойной интерферометрии (BLI) с использованием платформы Octet. MAV12 захватывали на сенсорах с антителами против человеческого Fc, промывали и подвергали воздействию либо мономерного человеческого домена NRP1 b1 дикого типа, либо мономерного мутанта NRP1 b1. Остатки, которые считаются частью связывающего эпитопа, демонстрируют пониженное связывание (например, K_D более чем в 5 раз слабее, чем при связывании с человеческим NRP1 b1 дикого типа) или отсутствие связывания. Одноточечные мутанты R317A, D320A, T349A, K352G, Y353A, Y354A и T413A приводили к снижению связывания, тогда как K351N и E412H не приводили к связыванию.

Пример 8. Определение структуры MAV12 в комплексе с NRP1.

Связывающий эпитоп также был идентифицирован с помощью кристаллографических исследований. FAV MAV12 образовывал комплекс с человеческим NRP1 b1, который очищали с помощью эксклюзионной хроматографии и концентрировали до 10 мг/мл. Кристаллы выращивали из 42% ПЭГ200, NEPES pH 7.

Рентгенологические данные собраны в Аргоннской национальной лаборатории (GM/CA CAT 23ID-D) и обработаны с использованием CCP4 и Phenix. Остатки NRP1 b1 на контактном расстоянии 3,8 Å от тяжелой и легкой цепей считаются частью связывающего эпитопа и включают Y297, T316, D320, E348, T349, K350, K351, K352, Y353, Y354, E412, T413, G414 и I415.

Пример 9. Анализ аминокислотных модификаций MAV12.

Анализ аминокислотных модификаций очищенного MAV12 показал, что делеция лизина на C-конце тяжелой цепи имела место в большинстве очищенных антител и что пироглутамилирование глутаминовой кислоты на N-конце легкой цепи происходило в некоторых из очищенных антител.

Включение с помощью ссылки

Все раскрытия всех патентных и непатентных публикаций, цитируемых в данном изобретении, включены в качестве ссылки в полном объеме для всех целей.

Другие варианты осуществления

Изобретение, изложенное выше, может охватывать множество различных изобретений с независимой применимостью. Хотя каждое из этих изобретений было раскрыто в его предпочтительной форме (формах), его конкретные варианты осуществления, раскрытые и проиллюстрированные в настоящем изобретении, не должны рассматриваться в ограничительном смысле, поскольку возможны многочисленные варианты. Предмет изобретения включает в себя все новые и неочевидные комбинации и подкомбинации различных элементов, признаков, функций и/или свойств, раскрытых в настоящем изобретении. Следующие пункты формулы изобретения особо указывают на определенные комбинации и подкомбинации, которые рассматриваются как новые и неочевидные. Изобретения, воплощенные в других комбинациях и подкомбинациях признаков, функций, элементов и/или свойств, могут быть заявлены в настоящей заявке, в приложениях, требующих приоритета из настоящей заявки, или в связанных приложениях. Такие пункты формулы изобретения, независимо от того, направлены ли они на другое изобретение или на одно и то же изобретение и являются ли они более широкими, узкими, равными или отличными по объему по сравнению с исходной формулой изобретения, также рассматриваются как включенные в объект изобретения настоящего изобретения.

Приложение А.

Таблица ссылок на последовательности

SEQ ID NO	Молекул a	Область	Последовательность
1	MAB1	VH FR1	QVQLVQSGAGVKKPGASVKVSCASG
2	MAB2	VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG
3	MAB3	VH FR1	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG
2	MAB4	VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG
2	MAB5	VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG
4	MAB6	VH FR1	QVQLVQSGAKVKKPGASVKVSCASG
5	MAB7	VH FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
6	MAB8	VH FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG
6	MAB9	VH FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG
6	MAB10	VH FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG
6	MAB11	VH FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG
6	MAB12	VH FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG
7	MAB13	VH FR1	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYG
7	MAB14	VH FR1	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYG
7	MAB15	VH FR1	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYG
8	MAB1	VH CDR1	YTFRSYYML
8	MAB2	VH CDR1	YTFRSYYML

045991

9	MAB3	VH CDR1	YTFSRYMH
9	MAB4	VH CDR1	YTFSRYMH
10	MAB5	VH CDR1	YTFTSYMH
10	MAB6	VH CDR1	YTFTSYMH
11	MAB7	VH CDR1	FTFSSYME
12	MAB8	VH CDR1	FTFASYAMV
13	MAB9	VH CDR1	FTFKSYAMV
14	MAB10	VH CDR1	FTFSSVAMV
14	MAB11	VH CDR1	FTFSSVAMV
14	MAB12	VH CDR1	FTFSSVAMV
15	MAB13	VH CDR1	GSFRGYWE
15	MAB14	VH CDR1	GSFRGYWE
16	MAB15	VH CDR1	GSFVKYYWS
17	MAB1	VH FR2	WVRQAPGQGLEWMG
17	MAB2	VH FR2	WVRQAPGQGLEWMG
17	MAB3	VH FR2	WVRQAPGQGLEWMG
17	MAB4	VH FR2	WVRQAPGQGLEWMG
17	MAB5	VH FR2	WVRQAPGQGLEWMG
18	MAB6	VH FR2	WVRQVPGQGLEWMG
19	MAB7	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVA
20	MAB8	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVS
20	MAB9	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVS
20	MAB10	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVS
20	MAB11	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVS
20	MAB12	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVS
21	MAB13	VH FR2	WIRQPPGKLEWIG
22	MAB14	VH FR2	WSRQPPGKLEWIG
21	MAB15	VH FR2	WIRQPPGKLEWIG
23	MAB1	VH CDR2	IIDPSDGSTSYAQKFQG
23	MAB2	VH CDR2	IIDPSDGSTSYAQKFQG
24	MAB3	VH CDR2	IINPLGGSTLYAQKFQG
24	MAB4	VH CDR2	IINPLGGSTLYAQKFQG
25	MAB5	VH CDR2	IINPQGGDTSYAQKFQG
25	MAB6	VH CDR2	IINPQGGDTSYAQKFQG
26	MAB7	VH CDR2	RIKRDGSEKYYVDSVKG
27	MAB8	VH CDR2	IISGSGGSTYYADSVKG
28	MAB9	VH CDR2	IISGSGGATYYADSVKG
29	MAB10	VH CDR2	AISGSGGATYYADSVKG
30	MAB11	VH CDR2	AISGSGGATYYADSVKG
30	MAB12	VH CDR2	AISGSGGATYYADSVKG
31	MAB13	VH CDR2	EISHSGSTNYPNPSLKS

045991

31	MAB14	VH CDR2	EISHSGSTNYNPSLKS
32	MAB15	VH CDR2	DIWHSGMTNYNPSLKS
33	MAB1	VH FR3	RVTMTRDTPSTSTVYMESSLRSEDVAVYYC
34	MAB2	VH FR3	RVTMTRDASTSTVYMESSLRSEDVAVYYC
35	MAB3	VH FR3	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYC
35	MAB4	VH FR3	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYC
35	MAB5	VH FR3	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYC
35	MAB6	VH FR3	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYC
36	MAB7	VH FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDVAVYYC
37	MAB8	VH FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDVAVYYC
37	MAB9	VH FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDVAVYYC
37	MAB10	VH FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDVAVYYC
38	MAB11	VH FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDVAVYYC
37	MAB12	VH FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDVAVYYC
39	MAB13	VH FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC
40	MAB14	VH FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC
39	MAB15	VH FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC
41	MAB1	VH CDR3	ARGARRITGYGMDV
41	MAB2	VH CDR3	ARGARRITGYGMDV
42	MAB3	VH CDR3	ARDLGYYGSGMHA
43	MAB4	VH CDR3	ARDLGYYGSGMHV
44	MAB5	VH CDR3	ARDRGMYASGFPG
45	MAB6	VH CDR3	ARDRGMYASGFNP
46	MAB7	VH CDR3	ARDQGYKTPDFDL
47	MAB8	VH CDR3	AKDPGYDSSRYYSNYGMDV
47	MAB9	VH CDR3	AKDPGYDSSRYYSNYGMDV
47	MAB10	VH CDR3	AKDPGYDSSRYYSNYGMDV
47	MAB11	VH CDR3	AKDPGYDSSRYYSNYGMDV
47	MAB12	VH CDR3	AKDPGYDSSRYYSNYGMDV
48	MAB13	VH CDR3	ARARPYREPYGMDV
48	MAB14	VH CDR3	ARARPYREPYGMDV
49	MAB15	VH CDR3	ARGPGYDSSGYRRFDP
50	MAB1	VH FR4	WGQGTTVTVSS
51	MAB2	VH FR4	WGQGTTVIVSS
52	MAB3	VH FR4	WGQGLVTVSS
52	MAB4	VH FR4	WGQGLVTVSS
52	MAB5	VH FR4	WGQGLVTVSS
52	MAB6	VH FR4	WGQGLVTVSS
53	MAB7	VH FR4	WGRGLVTVSS
50	MAB8	VH FR4	WGQGTTVTVSS
50	MAB9	VH FR4	WGQGTTVTVSS

045991

50	MAB10	VH FR4	WGQGTTVTVSS
50	MAB11	VH FR4	WGQGTTVTVSS
50	MAB12	VH FR4	WGQGTTVTVSS
50	MAB13	VH FR4	WGQGTTVTVSS
50	MAB14	VH FR4	WGQGTTVTVSS
52	MAB15	VH FR4	WGQGTTLVTVSS
54	MAB1	VL FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC
54	MAB2	VL FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC
54	MAB3	VL FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC
54	MAB4	VL FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC
55	MAB5	VL FR1	EIVMTQSPGTLSSLSPGERATLSC
55	MAB6	VL FR1	EIVMTQSPGTLSSLSPGERATLSC
56	MAB7	VL FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
56	MAB8	VL FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
56	MAB9	VL FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
56	MAB10	VL FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
56	MAB11	VL FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
56	MAB12	VL FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
57	MAB13	VL FR1	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIC
57	MAB14	VL FR1	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIC
58	MAB15	VL FR1	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIC
59	MAB1	VL CDR1	RASQGISSWLA
59	MAB2	VL CDR1	RASQGISSWLA
60	MAB3	VL CDR1	RASQGISRWLA
60	MAB4	VL CDR1	RASQGISRWLA
61	MAB5	VL CDR1	RASQSVSSSYLA
61	MAB6	VL CDR1	RASQSVSSSYLA
62	MAB7	VL CDR1	QASQDITNYLN
63	MAB8	VL CDR1	RASQSISSYLN
63	MAB9	VL CDR1	RASQSISSYLN
63	MAB10	VL CDR1	RASQSISSYLN
63	MAB11	VL CDR1	RASQSISSYLN
63	MAB12	VL CDR1	RASQSISSYLN
64	MAB13	VL CDR1	RASQDISSWLA
64	MAB14	VL CDR1	RASQDISSWLA
65	MAB15	VL CDR1	RASQSISSWLA
66	MAB1	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
66	MAB2	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
66	MAB3	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
66	MAB4	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
67	MAB5	VL FR2	WYQQKPGQAPRLIY

045991

67	MAB6	VL FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
66	MAB7	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
66	MAB8	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
66	MAB9	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
66	MAB10	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
66	MAB11	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
66	MAB12	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
66	MAB13	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
66	MAB14	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
66	MAB15	VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
67	MAB1	VL CDR2	AASNLSQ
67	MAB2	VL CDR2	AASNLSQ
68	MAB3	VL CDR2	AASSLSQ
68	MAB4	VL CDR2	AASSLSQ
69	MAB5	VL CDR2	GASNRAT
69	MAB6	VL CDR2	GASNRAT
70	MAB7	VL CDR2	DASNLET
71	MAB8	VL CDR2	GASSLSQ
71	MAB9	VL CDR2	GASSLSQ
71	MAB10	VL CDR2	GASSLSQ
71	MAB11	VL CDR2	GASSLSQ
71	MAB12	VL CDR2	GASSLSQ
68	MAB13	VL CDR2	AASSLSQ
68	MAB14	VL CDR2	AASSLSQ
72	MAB15	VL CDR2	KASSLES
73	MAB1	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
73	MAB2	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
73	MAB3	VL FR3	GVPSRFSGSGSCTDFTLTISLQPEDFATYYC
73	MAB4	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
74	MAB5	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
74	MAB6	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
75	MAB7	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYC
73	MAB8	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
73	MAB9	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
73	MAB10	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
73	MAB11	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
73	MAB12	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
73	MAB13	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
73	MAB14	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
76	MAB15	VL FR3	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC
77	MAB1	VL CDR3	QQASVFPFT

77	MAB2	VL CDR3	QQASVFPFT
78	MAB3	VL CDR3	QQANLLPFT
78	MAB4	VL CDR3	QQANLLPFT
79	MAB5	VL CDR3	QQLSSFPIIT
79	MAB6	VL CDR3	QQLSSFPIIT
80	MAB7	VL CDR3	QQSDVLPIT
81	MAB8	VL CDR3	QQTYSLYT
81	MAB9	VL CDR3	QQTYSLYT
81	MAB10	VL CDR3	QQTYSLYT
81	MAB11	VL CDR3	QQTYSLYT
81	MAB12	VL CDR3	QQTYSLYT
82	MAB13	VL CDR3	QQELAFPRT
82	MAB14	VL CDR3	QQELAFPRT
83	MAB15	VL CDR3	QQLNSYPPT
84	MAB1	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB2	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB3	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB4	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB5	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB6	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB7	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB8	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB9	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB10	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB11	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB12	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB13	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB14	VL FR4	FGGGTKVEIK
84	MAB15	VL FR4	FGGGTKVEIK
85	MAB1	VH полнораз мерная	QVQLVQSGAGVKKPGASVKVSCKASGYTFRSYYMLWVRQAPGGLEWMGI IDPSDGSTSYAQKFQGRVTMTRDTPSTVYMELSSLRSEDТАVYYCARGA RRITGYGMDVWGQGTТVTVSS
86	MAB2	VH полнораз мерная	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFRSYYMLWVRQAPGGLEWMGI IDPSDGSTSYAQKFQGRVTMTRDASTSTVYMELSSLRSEDТАVYYCARGA RRITGYGMDVWGQGTТVIVSS
87	MAB3	VH полнораз мерная	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSRYMHVVRQAPGGLEWMGI INPLGGSTLYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDТАVYYCARDL GYYGSGMHAWGQGTЛTVSS
88	MAB4	VH полнораз мерная	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSRYMHVVRQAPGGLEWMGI INPLGGSTLYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDТАVYYCARDL GYYGSGMHVWGQGTЛTVSS

89	MAB5	VH полнораз мерная	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTSYMHWVRQAPGGGLEWMGI INPQGGDTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDТАVYYCARDR GMYASGFPGWGQGLTVTVSS
90	MAB6	VH Полнораз мерная	QVQLVQSGAKVKKPGASVKVSCKASGYTFSTSYMHWVRQVPGGLEWMGI INPQGGDTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDТАVYYCARDR GMYASGFNPWGQGLTVTVSS
91	MAB7	VH Полнораз мерная	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLEWVAR IKRDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDТАVYYCARDQ GYKTPTDFDLWGRGTLTVTVSS
92	MAB8	VH Полнораз мерная	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFASYAMVWVRQAPGKGLEWVSI ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDТАVYYCAKDP GYDSSRYYSNYGMDVWGQGLTVTVSS
93	MAB9	VH Полнораз мерная	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSYAMVWVRQAPGKGLEWVSI ISGSGGATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDТАVYYCAKDP GYDSSRYYSNYGMDVWGQGLTVTVSS
94	MAB10	VH Полнораз мерная	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSVAMVWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDТАVYYCAKDP GYDSSRYYSNYGMDVWGQGLTVTVSS
95	MAB11	VH Полнораз мерная	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSVAMVWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGATYYADSVVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDТАVYYCAKDP GYDSSRYYSNYGMDVWGQGLTVTVSS
96	MAB12	VH Полнораз мерная	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSVAMVWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGATYYADSVVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDТАVYYCAKDP GYDSSRYYSNYGMDVWGQGLTVTVSS
97	MAB13	VH Полнораз мерная	QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCAVYGGFRGYYWEWIRQPPGKGLEWIGE ISHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADТАVYYCARAR YREPYGMDVWGQGLTVTVSS
98	MAB14	VH Полнораз мерная	QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCAVYGGFRGYYWEWSRQPPGKGLEWIGE ISHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADТАVYYCARAR YREPYGMDVWGQGLTVTVSS
99	MAB15	VH Полнораз мерная	QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCAVYGGFVKYYWSWIRQPPGKGLEWIGD IWHSGMTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADТАVYYCARGPG YDSSGYRRFDPWGQGLTVTVSS
100	MAB1	VL Полнораз мерная	DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISWLAWYQQKPKAPKLLIYA ASNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQASVFPFTFGG GTKVEIK
100	MAB2	VL Полнораз мерная	DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISWLAWYQQKPKAPKLLIYA ASNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQASVFPFTFGG GTKVEIK
101	MAB3	VL Полнораз мерная	DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQANLLPFTFGG GTKVEIK

101	MAB4	VL Полнораз мерная	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQANLLPFTFGG GTKVEIK
102	MAB5	VL Полнораз мерная	EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASNRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQLSSFPITFG GGTKVEIK
102	MAB6	VL Полнораз мерная	EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASNRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQLSSFPITFG GGTKVEIK
103	MAB7	VL Полнораз мерная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYD ASNLETGVPSRFSGSGSDFTFTISSLQPEDFATYYCQQSDVLPITFGG GTKVEIK
104	MAB8	VL Полнораз мерная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYSLYTFGGG TKVEIK
104	MAB9	VL Полнораз мерная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYSLYTFGGG TKVEIK
104	MAB10	VL Полнораз мерная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYSLYTFGGG TKVEIK
104	MAB11	VL Полнораз мерная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYSLYTFGGG TKVEIK
104	MAB12	VL Полнораз мерная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYSLYTFGGG TKVEIK
105	MAB13	VL Полнораз мерная	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQELAFPRTFGG GTKVEIK
105	MAB14	VL Полнораз мерная	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQELAFPRTFGG GTKVEIK
106	MAB15	VL Полнораз мерная	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYK ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQLNYPPTFGG GTKVEIK
107	MAB1	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	QVQLVQSGAGVKKPGASVKVCKASGYTFRSYMLWVRQAPGGLEWMI IDPSDGSSTSYAQKFGQGRVTMTRDTPSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGA RRITGYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTEPVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST

			YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLGK
108	MAB2	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFRSYYMLWVRQAPGQGLEWMGI IDPSDGSSTSYAQKFQGRVTMTRDASTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGA RRITGYGMDVWGQGTTLVIVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTK TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLGK
109	MAB3	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFRSRYMHVWRQAPGQGLEWMGI INPLGGSTLYAQKFQGRVTMTRDSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDL GYYGSGMHAWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLGK
110	MAB4	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFRSRYMHVWRQAPGQGLEWMGI INPLGGSTLYAQKFQGRVTMTRDSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDL GYYGSGMHVWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLGK
111	MAB5	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGI INPQGGDTSYAQKFQGRVTMTRDSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDR GMYIASGFPGWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTK TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLGK
112	MAB6	HC Полнораз мерная	QVQLVQSGAKVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMHVWRQVPGQGLEWMGI INPQGGDTSYAQKFQGRVTMTRDSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDR GMYIASGFNPWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV

		IgG4 S228P	KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVKDRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
113	MAB7	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVVRQAPGKGLEWVAR IKRDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKSLYLMNSLRAEDTAVYYCARDQ GYKTPDFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVKDRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
114	MAB8	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFASYAMVWVRQAPGKGLEWVSI ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDP GYDSSRYYSNYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP S SSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVKDRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK
115	MAB9	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFKSYAMVWVRQAPGKGLEWVSI ISGSGGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDP GYDSSRYYSNYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP S SSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVKDRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK
116	MAB10	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSVAMVWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDP GYDSSRYYSNYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP S SSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVKDRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQP

			REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
117	MAB11	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSVAMVWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGATYYADSVGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAKDP GYDSSRYYSNYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
118	MAB12	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSVAMVWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGATYYADSVGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAKDP GYDSSRYYSNYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
119	MAB13	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFGRYYWEWIRQPPGKGLEWIGE ISHS GSTNYPNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARARP YREPYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK
120	MAB14	HC Полнораз мерная IgG4 S228P	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFGRYYWEWSRQPPGKGLEWIGE ISHS GSTNYPNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSPVTAADTAVYYCARARP YREPYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK
121	MAB15	HC	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFVKYYWSWIRQPPGKGLEWIGD

		Полнораз мерная IgG4 S228P	IWHSGMTNPNPSLKSVRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGPG YDSSGYSRRFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LSDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
122	MAB1	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISWLAHYQQKPKAPKLLIYA ASNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQASVFPFTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
122	MAB2	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISWLAHYQQKPKAPKLLIYA ASNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQASVFPFTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
123	MAB3	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISRWLAHYQQKPKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQANLLPFTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
123	MAB4	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISRWLAHYQQKPKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQANLLPFTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
124	MAB5	LC Полнораз	EIVMTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQVSSSYLAHYQQKPGQAPRLLIY GASNRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQLSFPITFG

		мерная, человече ская каппа констант ная	GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
124	MAB6	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	EIVMTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQLSFPITFG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
125	MAB7	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYD ASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQSDVLPITFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
126	MAB8	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSSYLNWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSLYTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
126	MAB9	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSSYLNWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSLYTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
126	MAB10	LC Полнораз мерная, человече	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSSYLNWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSLYTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL

		ская каппа констант ная	SSPVTKSFNRGEC
126	MAB11	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYSLYTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
126	MAB12	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYSLYTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
127	MAB13	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	DIQLTQSPSSVSASVGDRVTTITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQELAFPRTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
127	MAB14	LC Полнораз мерная, человече ская каппа констант ная	DIQLTQSPSSVSASVGDRVTTITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQELAFPRTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
128	MAB15	LC Полнораз мерная	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYK ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQLNYPPTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
129	hNRP-1	GenBank	ATGGAGAGGGGGCTGCCGCTCCTCTGCGCCGTGCTCGCCCTCGTCCTCGC

		No. доступа NM_00387 3.5 (соответ ствует NP_00386 4.4).	CCCGGCCGGCGCTTTTCGCAACGATAAATGTGGCGATACTATAAAAAATTG AAAGCCCCGGGTACCTTACATCTCCTGGTTATCCTCATTCTTATCACCCA AGTGAAAAATGCGAATGGCTGATTGAGGCTCCGGACCCATACCAGAGAAT TATGATCAACTTCAACCCTCACTTCGATTTGGAGGACAGAGACTGCAAGT ATGACTACGTGGAAGTCTTCGATGGAGAAAATGAAAATGGACATTTTAGG GGAAAGTTCTGTGGAAAGATAGCCCCCTCCTCCTGTTGTCTTCAGGGCC ATTTCTTTTTATCAAATTTGTCTCTGACTACGAAACACATGGTGCAGGAT TTTCCATACGTTATGAAATTTTCAAGAGAGGTCTGAATGTTCCCAGAAC TACACAACACCTAGTGGAGTGATAAAGTCCCCGGATTCCCTGAAAAATA TCCCAACAGCCTTGAATGCACTTATATTTGTCTTTGCGCCAAAGATGTCAG AGATTATCCTGGAATTTGAAAGCTTTGACCTGGAGCCTGACTCAAATCCT CCAGGGGGGATGTTCTGTGCTACGACCGGCTAGAAATCTGGGATGGATT CCCTGATGTTGGCCCTCACATTGGGCGTTACTGTGGACAGAAAACACCAG GTCGAATCCGATCCTCATCGGGCATTCTCTCCATGGTTTTTTACACCGAC AGCGCGATAGCAAAAGAAGTTTTCTCAGCAAACACTACAGTGTCTTGACAGAG CAGTGTCTCAGAAGATTTCAAATGTATGGAAGCTCTGGGCATGGAATCAG GAGAAATTCATTCTGACCAGATCACAGCTTCTTCCCAGTATAGCACCAAC TGGTCTGCAGAGCGCTCCCGCCTGAACTACCCTGAGAATGGGTGGACTCC CGGAGAGGATTCCCTACCGAGAGTGGATACAGGTAGACTTGGGCCTTCTGC GCTTTGTACGGCTGTCCGGACACAGGGCGCCATTTCAAAGAAACCAAG AAGAAATATTATGTCAAGACTTACAAGATCGACGTTAGCTCCAACGGGGA AGACTGGATCACCATAAAAAGAAGGAAACAAACCTGTTCTCTTTACAGGGAA ACACCAACCCACAGATGTTGTGGTTGCAGTATCCCCAAACCACTGATA ACTCGATTTGTCCGAATCAAGCCTGCAACTGGGAAACTGGCATATCTAT GAGATTTGAAGTATACGGTTGCAAGATAACAGATTATCCTTGCTCTGGAA TGTGGGTATGGTGTCTGGACTTATTTCTGACTCCCAGATCACATCATCC AACCAAGGGGACAGAACTGGATGCCTGAAAACATCCGCTGGTAACCAG TCGCTCTGGCTGGGCACTTCCACCCGCACCTCATTCCCTACATCAATGAGT GGCTCCAAATAGACCTGGGGGAGGAGAAGATCGTGAGGGGCATCATCATT CAGGGTGGGAAGCACCGAGAGAACAAGGTGTTGATGAGGAAGTTCAAGAT CGGGTACAGCAACAACGGCTCGGACTGGAAGATGATCATGGATGACAGCA AACGCAAGGCGAAGTCTTTTGAGGGCAACAACAACATATGATACACCTGAG CTGCGGACTTTTCCAGCTCTCTCCACGCGATTCTCAGGATCTACCCCGA GAGAGCCACTCATGGCGGACTGGGGCTCAGAATGGAGCTGCTGGGCTGTG AAGTGAAGCCCCCTACAGCTGGACCGACCACTCCCAACGGGAACCTGGTG GATGAATGTGATGACGACCAGGCCAACTGCCACAGTGAACAGGTGATGA CTTCCAGCTCACAGGTGGCACCCTGTGCTGGCCACAGAAAAGCCACGG TCATAGACAGCACCATACAATCAGAGTTTCCAACATATGGTTTTAACTGT GAATTTGGCTGGGGCTCTCACAAGACCTTCTGCCACTGGGAACATGACAA TCACGTGCAGCTCAAGTGGAGTGTGTTGACCAGCAAGACGGGACCCATTC AGGATCACACAGGAGATGGCAACTTCATCTATTCCCAAGCTGACGAAAAT CAGAAGGGCAAAGTGGCTCGCCTGGTGGGCTGTGGTTTTATTCCCAGAA
--	--	--	---

			<p>CTCTGCCACTGCATGACCTTCTGGTATCACATGTCTGGGTCCCACGTCG GCACACTCAGGGTCAAACCTGCGCTACCAGAAGCCAGAGGAGTACGATCAG CTGGTCTGGATGGCCATTGGACACCAAGGTGACCACTGGAAGGAAGGGCG TGTCTTGCTCCACAAGTCTCTGAACTTTATCAGGTGATTTTCGAGGGCG AAATCGGAAAAGGAAACCTTGGTGGGATTGCTGTGGATGACATTAGTATT AATAACCACATTTACAAGAAGATTGTGCAAACACAGCAGACCTGGATAA AAAGAACCAGAAATTTAAATTTGATGAAACAGGGAGCAGCCAGGATACG AAGGTGAAGGAGAAGGTGACAAGAACATCTCCAGGAAGCCAGGCAATGTG TTGAAGACCTTAGACCCCATCCTCATCACCATCATAGCCATGAGTGCCCT GGGGTCCCTCCTGGGGCTGTCTGTGGGGTCGTGCTGTACTGTGCCTGTT GGCATAATGGGATGTGAGAAAGAACTTGTCTGCCCTGGAGAACTATAAC TTTGAACCTTGTGGATGGTGTGAAGTTGAAAAAGACAACTGAATACACA GAGTACTTATTCGGAGGCATGA</p>
130	hNRP-1 Protein	Genbank NP_00386 4.4.	<p>MERGLP L L C A V L A L V L A P A G A F R N D K C G D T I K I E S P G Y L T S P G Y P H S Y H P S E K C E W L I Q A P D P Y Q R I M I N F N P H F D L E D R D C K Y D Y V E V F D G E N E N G H F R G K F C G K I A P P P V V S S G P F L F I K F V S D Y E T H G A G F S I R Y E I F K R G P E C S Q N Y T T P S G V I K S P G F P E K Y P N S L E C T Y I V F A P K M S E I I L E F E S F D L E P D S N P P G G M F C R Y D R L E I W D G F P D V G P H I G R Y C G Q K T P G R I R S S S G I L S M V F Y T D S A I A K E G F S A N Y S V L Q S S V S E D F K C M E A L G M E S G E I H S D Q I T A S S Q Y S T N W S A E R S R L N Y P E N G W T P G E D S Y R E W I Q V D L G L L R F V T A V G T Q G A I S K E T K K K Y Y V K Y K I D V S S N G E D W I T I K E G N K P V L F Q G N T N P T D V V V A V F P K P L I T R F V R I K P A T W E T G I S M R F E V Y G C K I T D Y P C S G M L G M V S G L I S D S Q I T S S N Q G D R N W M P E N I R L V T S R S G W A L P P A P H S Y I N E W L Q I D L G E E K I V R G I I I Q G G K H R E N K V F M R K F K I G Y S N N G S D W K M I M D D S K R K A K S F E G N N N Y D T P E L R T F P A L S T R F I R I Y P E R A T H G G L G L R M E L L G C E V E A P T A G P T T P N G N L V D E C D D D Q A N C H S G T G D D F Q L T G G T T V L A T E K P T V I D S T I Q S E F P T Y G F N C E F G W G S H K T F C H W E H D N H V Q L K W S V L T S K T G P I Q D H T G D G N F I Y S Q A D E N Q K G K V A R L V S P V V Y S Q N S A H C M T F W Y H M S G S H V G T L R V K L R Y Q K P E E Y D Q L V W M A I G H Q G D H W K E G R V L L H K S L K L Y Q V I F E G E I G K G N L G G I A V D D I S I N N H I S Q E D C A K P A D L D K K N P E I K I D E T G S T P G Y E G E G E G D K N I S R K P G N V L K T L D P I L I T I I A M S A L G V L L G A V C G V V L Y C A C W H N G M S E R N L S A L E N Y N F E L V D G V K L K K D K L N T Q S T Y S E A</p>
131	cNRP-1	DHK: Genbank Acc No. XM_00556 4935.2	<p>ATGGAGAAGGGGTTGCCGCTCCTCTGCGCCGCGCTCGCCCTCGCCCTCGC CCC GCC GCG GCT T T T C G C A A C G A T A A A T G T G G C G A T A C T A T A A A A A T T G A A A G C C C C G G G T A C C T T A C A T C T C C T G G T T A T C C T C A T T C T T A T C A C C C A A G T G A A A A A T G T G A A T G G C T G A T T C A G G C T C C G G A C C C A T A C C A G A G A A T T A T G A T C A A C T T C A A C C C T C A C T T C G A T T T G G A G G A C A G A G A T T G C A A G T A T G A C T A C G T G G A A G T C T T C G A T G G A G A A A A T G A A A T G G A C G T T T A T G G G G A A A G T T C T G T G G A A A G A T A G C C C C T C C T C C T G T T G T G T C T T C A G G G C A A T T T C T T T T T A T C A A A T T T G T C T C T G A C T A C G A A A C A C A C G G T G C A G G A T T T T C C A T A C G T T A T G A A A T T T T C A A G A G A G G T C C T G A A T G T T C C C A G A A C T A C A C A A C C T A G T G G A G T G A T A A A G T C C C C C G G A T T C C C T G A A A A A T A</p>

		<p>TCCCAACAGCCTTGAATGCACTTATATTGTCTTTGCACCAAAGATGTCAG AGATTATCCTGGAATTTGAAAGCTTTGACCTGGAGCCTGACTCAAATCCT CCAGGGGGGATGTTCTGTGCTACGACCGGCTGGAAATCTGGGATGGATT CCCTGACGTTGGCCCTCACATTGGGCGTTACTGTGGACAGAAAACACCAG GTCGAATCCGATCCTCATCGGGCATTCTCTCCATGGTTTTTTACACCGAC AGCGCAATAGCAAAAAGAAGTTTTCTCAGCAAACCTACAGTGTCTTGCAGAG CAGTGTCTCAGAAGATTTCAAATGTATGGAAGCTGTGGGCATGGAATCAG GAGAAATTCATTCTGACCAGATCACAGCTTCTTCCCAGTACAGCACCAAC TGGTCTGCAGAGCGCTCCCGCCTGAACTATCCTGAGAATGGGTGGACTCC CGGAGAAGATTCTTACCAGAGTGGATACAGGTGGACTTGGGCCTTCTAC GCTTCGTTACGGCTGTCGGGACACAGGGCGCCATTTCAAAGAAACCAAG AAGAAATATTATGTCAAGACTTACAAAATTGACATTAGCTCCAACGGGGA AGACTGGATCACCATAAAAAGAAGAAACAAACCTGTTCTCTTTTCAGGGAA ACACCAACCCACAGACGTTGTGGTTGCAGTATCCCCAAGCCACTGATA ACTCGATTTGTCCGAATCAAGCCTGCAACTTGGGAACTGGCATATCTCT GAGATTTGAAGTATATGGTTGCAAGATAACAGATTATCCTTGCTCCGGAA TGTTGGGTATGGTGTCTGGACTTATTTCTGACTCCCAGATCACATCATCC AACCAAGGGGACAGAACTGGATGCCTGAAAACATCCGCCTGGTAACCAG TCGCTCCGGCTGGGCACTGCCACCCGCACCTCATTCTACGTCAATGAGT GGCTCAAATAGACCTGGGGGAGGAGAAGATCGTGAGGGGCATCATCATT CAGGGTGGGAAGCACCGAGAGAACAAGGTATTCATGAGGAAGTTCAAGAT CGGTTACAGCAACAACGGCTCCGACTGGAAGATGATCATGGACGACAGCA AACGCAAGGCAAAGTCTTTTGAGGGCAACAACAACCTATGACACACCTGAG CTGCGGACTTTTCCAGCTCTCTCCACGCGATTATCAGGATCTACCCGA GAGAGCCACTCATGGCGGACTGGGGCTCCGAATGGAGCTGCTGGGCTGTG AAGTGAAGCCCCCTACAGCTGGACCGACCACTCCCAACGGGAACCCGGTG GATGAATGTGATGACGACCAGGCCAACTGCCACAGTGGAACAGGTGATGA CTTCCAGCTCACAGGTGGCACCCTGTGCTGGCCACAGAAAAGCCACGG TCATAGACAGCACCATAACAATCAGAGTTTCTACATATGGTTTTAACTGT GAATTTGGCTGGGGCTCTCACAAGACCTTCTGCCACTGGGAACATGACAA TCACGTGCAGCTCAAGTGGAGTGTGTTGACCAGCAAGACGGGACCCATTC AGGATCACACAGGAGATGGCAACTTCATCTATTCCCAAGCTGATGAAAAT CAGAAGGGCAAAGTGCTCGCCTGGTGGCCCTGTGGTTTTATTCCCAGAA CTCTGCCACTGCATGACCTTCTGGTATCACATGTCTGGGTCCCACGTCC GCACACTCAGGGTCAAACCTGCGCTACCAGAAGCCAGAGGAGTACGATCAG CTGGTCTGGATGGCCATTGGACACCAAGGTGACCACTGGAAGGAAGGGCG TGTCTTGCTTCAAGTCTCTGAACTTTATCAGGTGATTTTCGAGGGCG AAATCGGAAAAGGAAACCTTGGTGGGATTGCTGTGGATGACATTAGTATC AATAACCACATTTCAAGAAGATTGTGCAAACCCAGCAGACCTGGATAA AAAGAACCAGAAATTAATAATTGATGAAACAGGGAGCACACCAGGATATG AAGGTGAAGGAGAAGGTGACAAGAACATCTCCAGGAAACCAGGCAATGTG TTGAAGACCTTAGACCCCATCCTCATCACCATCATAGCCATGAGCGCCCT</p>
--	--	--

			GGGGTCTCTCTGGGGCTGTGTGCGGGGTCGTGCTGTACTGTGCCTGTT GGCATAATGGGATGTCAGAAAGAACTTGTCTGCCCTGGAGAACTATAAC TTTGAACCTTGTGGACGGTGTGAAGTTGAAAAAGACAACTGAATACACA GAGTACTTATTCCGAGGCATGA
132	cNRP-1	Белок: UniProtK B - G7PEQ1	MEKGLPLLCAALALALAPAGAFRNDKCGDTIKIESPGYLTSPGYPHSYHP SEKCEWLIQAPDPYQRIMINFNPHFDLEDRDCKYDYVEVFDGENENGRW GKFCGKIAPPPVVSSGQFLFIKFVSDYETHGAGFSIRYEIIFKRGPECSQN YTPSPGVIKSPGFPEKYPNSLECTYIVFAPKMSEIILEFESFDLEPDSNP PGGMFCRYDRLEIWDGFPDVGPHIGRYCQKTPGRIRSSSGILSMVFYTD SAIAKEGFSANYSVLQSSVSEDFKCMEAVGMESGEIHSQITASSQYSTN WSAERSRLNYPENGWTPGEDSYREWIQVDLGLLRFVTVAVGTQGAISKETK KKYYVKTYKIDISSNGEDWITIKENKPVLFQGNTPDVTVVAVFPKPLI TRFVRIKPATWETGISLRFEVYGCKITDYPCSGMLGMVSLISDSQITSS NQGDRNWMPENIRLVTSRSGWALPPAPHSYVNEWLQIDLGEEKIVRGI QGGKHRENKVFMRKFKIGYSNNGSDWKIMDDSKRKAKSFEGNNNYDTP LRTFPALSTRFIRIYPERATHGGLGLRMELGCEVEAPTAGPTTPNGNPV DECDDDQANCHSGTGDDFQLTGGTTLATEKPTVIDSTIQSEFPYGFNC EFGWGSHTFCHWEHDNHVQLKWSVLTSTKGP IQDHTGDGNFIYSQADEN QKGVARLVSPVVSQNSAHCMTFWYHMSGSHVGLRVLKRYQKPEEYDQ LVWMAIGHQGDHWKEGRVLLHKSLLKLYQVIFEGEIGKGNLGGIAVDDISI NNHISQEDCAKPADLDKKNPEIKIDETGSTPGYEGEGERGDKNISRKPGNV LKTLDPILITIIAMSALGVLLGAVCGVVLYCACWHNGMSERNLSALENYN FELVDGVKLLKDKLNTQSTYSEA
133	mNRP-1	GenBank Acc. No. NM008737	ATGGAGAGGGGGCTGCCGTTGCTGTGCGCCACGCTCGCCCTTGCCTCGC CCTGGCGGGCGCTTTCCGCAGCGACAAATGTGGCGGGACCATAAAATCG AAAACCCAGGGTACCTCACATCTCCCGGTTACCCTCATTCTTACCATCCA AGTGAGAAGTGTGAATGGCTAATCCAAGCTCCGGAACCTACCAGAGAAT CATGATCAACTTCAACCCACATTTGATTTGGAGGACAGAGACTGCAAGT ATGACTACGTGGAAGTAATCGATGGGAGAATGAAGCGGCCCGCTGTGG GGGAAGTCTGTGGGAAGATTGCACCTTCTCCTGTGGTGTCTTTCAGGGCC CTTCTCTTCAATTTGTCTCTGACTATGAGACACATGGGGCAGGGT TTTCCATCCGCTATGAAATCTTCAAGAGAGGGCCGAATGTCTCAGAAC TATACAGCACCTACTGGAGTGATAAAGTCCCTGGGTCCCTGAAAATA CCCCAACAGCTTGGAGTGCACCTACATCATCTTTCACCAAAGATGTCTG AGATAATCCTGGAGTTTGAAAGTTTTGACCTGGAGCAAGACTCGAATCCT CCCGGAGGAATGTTCTGTCTGCTATGACCGGCTGGAGATCTGGGATGGATT CCCTGAAGTTGGCCCTCACATTGGGCGTTATTGTGGGCAGAAAACCTCTG GCCGGATCCGCTCCTCTCAGGCGTTCTATCCATGGTCTTTTACACTGAC AGCGCAATAGCAAAGAAGGTTTCTCAGCCAACACTACAGTGTGCTACAGAG CAGCATCTCTGAAGATTTAAGTGTATGGAGGCTCTGGGCATGGAATCTG GAGAGATCCATTCTGATCAGATCACTGCATCTTACAGTATGGTACCAAC TGGTCTGTAGAGCGCTCCCGCCTGAACTACCCTGAAATGGGTGGACTCC

			<p>AGGAGAAGACTCCTACAAGGAGTGGATCCAGGTGGACTTGGGCCTCCTGC GATTCGTTACTGCTGTAGGGACACAGGGTGCCATTTCCAAGGAAACCAAG AAGAAATATTATGTCAAGACTTACAGAGTAGACATCAGCTCCAACGGAGA GGACTGGATCTCCCTGAAAGAGGGAAATAAAGCCATTATCTTTCAGGGAA ACACCAACCCACAGATGTTGTCTTAGGAGTTTTCTCCAAACCACTGATA ACTCGATTTGTCCGAATCAAACCTGTATCCTGGGAAACTGGTATATCTAT GAGATTTGAAGTTTATGGCTGCAAGATAACAGATTATCCTTGCTCTGGAA TGTTGGGCATGGTGTCTGGACTTATTTTCAGACTCCCAGATTACAGCATCC AATCAAGCCGACAGGAATTGGATGCCAGAAAACATCCGTCTGGTGACCAG TCGTACCGGCTGGGCACTGCCACCCTCACCCACCCATACACCAATGAAT GGCTCCAAGTGGACCTGGGAGATGAGAAGATAGTAAGAGGTGTCATCATT CAGGGTGGGAAGCACCAGAAAACAAGGTGTTTCATGAGGAAGTTCAAGAT CGCCTATAGTAACAATGGCTCTGACTGGAAAATATCATGGATGACAGCA AGCGCAAGGCTAAGTCGTTTGAAGGCAACAACAATATGACACACCTGAG CTTCGGACGTTTTACCTCTCTCCACAAGGTTTCATCAGGATCTACCCTGA GAGAGCCACACACAGTGGGCTTGGGCTGAGGATGGAGCTACTGGGCTGTG AAGTGAAGCACCTACAGCTGGACCAACCACACCCAATGGGAACCCAGTG GATGAGTGTGACGACGACCAGGCCAACTGCCACAGTGGCACAGGTGATGA CTTCCAGCTCACAGGAGGCACCACTGTCCTGGCCACAGAGAAGCCAACCA TTATAGACAGCACCATCCAATCAGAGTTCCTGACATACGGTTTTAACTGC GAGTTTGGCTGGGGCTCTCACAAGACATTTCTGCCACTGGGAGCATGACAG CCATGCACAGCTCAGGTGGAGTGTGCTGACCAGCAAGACAGGGCCGATTC AGGACCATACAGGAGATGGCAACTTCATCTATTCCCAAGCTGATGAAAT CAGAAAGGCAAAGTAGCCCGCTGGTGAGCCCTGTGGTCTATTCCAGAG CTCTGCCCCTGTATGACCTTCTGGTATCACATGTCCGGCTCTCATGTGG GTACACTGAGGGTCAAACCTACGCTACCAGAAGCCAGAGGAATATGATCAA CTGGTCTGGATGGTGGTTGGGCACCAAGGAGACCCTGGAAAGAAGGACG TGTCTTGTGCACAAATCTCTGAAACTATATCAGGTTATTTTTGAAGGTG AAATCGGAAAAGGAAACCTTGGTGGAAATTGCTGTGGATGATATCAGTATT ACAACCATATTTCTCAGGAAGACTGTGAAAACCAACAGACCTAGATAA AAAGAACACAGAAATTAATAATTGATGAAACAGGGAGCACTCCAGGATATG AAGGAGAAGGGGAAGGTGACAAGAACATCTCCAGGAAGCCAGGCAATGTG CTTAAGACCCTGGATCCCATCCTGATCACCATCATAGCCATGAGTGCCCT GGGAGTACTCCTGGGTGCAGTCTGTGGAGTTGTGCTGTACTGTGCCTGTT GGCACAATGGGATGTGAGAAAGGAACCTATCTGCCCTGGAGAACTATAAC TTTGAACCTGTGGATGGTGTAAAGTTGAAAAAAGATAAACTGAACCCACA GAGTAATTACTCAGAGGCGTGA</p>
134	mNRP-1	UniProtK B - P97333	<p>MERGLPLLCLALALALAGAFRSDKCGGTIKIENPGYLTSPGYPHSYHP SEKCEWLIQAPEPYQRIMINFNPHFDLEDRDKYDYVEVIDGENEGGRLW GKFCGKIAPSPVVS SGPFLFIKFVSDYETHGAGFSIRYELFKRGEPSQN YTAPTGVIKSPGFPEKYPNSLECTYII FAPKMSEIILEFESFDLEQDSNP PGGMFCRYDRLEIWDGFPEVGP HIGRYCGQKTPGRIRSSSGVLSMVFYTD</p>

			<p>SIAKEGFSANYSVLQSSISEDFKMEALGMESGEIHSQDITASSQYGTN WSVERSRLNYPENGWTFGEDSYKEWIQVDLGLLRFVTAVGTQGAISKETK KKYYVKTYRVDISSNGEDWISLKEGNKAIIFQGNTNPTDVVLGVFSKPLI TRFVRIKPVSWETGISMRFEVYGCKITDYPCSGMLGMVSGLISDSQITAS NQADRNWMPENIRLVTSRGTWALPPSPHPYTNEWLQVDLGDEKIVRGVII QGGKHRENKVFMRKFKIAYSNNGSDWKTIMDDSKRKAKSFEGNNDYDTP LRTFSPSTRFIRIYPERATHSGLGLRMELLGCEVEAPTAGPTTPNGNPV DECDDQANCHSGTGDDFQLTGGTTVLATEKPTIIDSTIQSEFPTYGFNC EFGWGSHTFCHWEHDSHAQLRWSVLTSTKGPIDHTGDGNFIYSQADEN QKGVARLVSPVVYSQSSAHCMTFWYHMSGSHVGTLRVKLRYQKPEEYDQ LVWVVGHQGDHWKEGRVLLHKSLLKLYQVIFEGEIGKGNLGGIAVDDISI NNHISQEDCAKPTDLKKNTEIKIDETGSTPGYEGEGEKDNISRKPGNV LKTLDPILITIIAMSALGVLLGAVCGVVLYCACWHNGMSERNLSALENYN FELVDGVKLLKDKLNPQSNYSEA</p>
135	rNRP-1	UniProtK B - Q9QWJ9	<p>MERGLPLLATLALALALAGAFRSDKCGGTIKIENPGYLTPGYPHSYHP SEKCEWLIQAPEPYQRIMINFNPHFDLEDRCKYDYVEIDGENEGRLW GKFCGKIAPSPVSSGPFLLFIKFVSDYETHGAGFSIRYEIFKRGPECSQN YTAPTGVIKSPGFPEKYPNSLECTYIIFAPKMSEIILEFESFDLEQDSNP PGGVFCRYDRLEIWDGFPEVGPPIGRYCGQKTPGRIRSSSGLSMVFYTD SIAKEGFSANYSVLQSSISEDFKMEALGMESGEIHSQDITASSQYGTN WSVERSRLNYPENGWTFGEDSYREWIQVDLGLLRFVTAVGTQGAISKETK KKYYVKTYRVDISSNGEDWITLKEGNKAIIFQGNTNPTDVVFGVFPKPLI TRFVRIKPVSWETGISMRFEVYGCKITDYPCSGMLGMVSGLISDSQITAS NQGDRNWPENIRLVTSRGTWALPPSPHPYINLQVDLGDEKIVRGVII QGGKHRENKVFMRKFKIAYSNNGSDWKMIMDDSKRKAKSFEGNNDYDTP LRAFTPLSTRFIRIYPERATHSGLGLRMELLGCEVEVPTAGPTTPNGNPV DECDDQANCHSGTGDDFQLTGGTTVLATEKPTIIDSTIQSEFPTYGFNC EFGWGSHTFCHWEHDSHAQLRWRVLTSTKGPIDHTGDGNFIYSQADEN QKGVARLVSPVVYSQSSAHCMTFWYHMSGSHVGTLRVKLHYQKPEEYDQ LVWVVGHQGDHWKEGRVLLHKSLLKLYQVIFEGEIGKGNLGGIAVDDISI NNHIPQEDCAKPTDLKKNTEIKIDETGSTPGYEEGKDKNISRKPGNV KTLDPILITIIAMSALGVLLGAVCGVVLYCACWHNGMSERNLSALENYN ELVDGVKLLKDKLNPQSNYSEA</p>
136	MAB 8-12	VHCDR2 Консенсу с	<p>$X_1ISGSGGX_2TYYADSVX_3G$, где X_1 представляет собой I или A, X_2 представляет собой S или A, и X_3 представляет собой K или E</p>
137	MAB 8-12	VHCDR1 Консенсу с	<p>$FTFX_1SX_2AMV$, где X_1 представляет собой A, K, или S, X_2 представляет собой Y или V</p>
138	MAB 3-4	VHCDR3 Консенсу с	<p>$ARDLGYGSGMHX$, где X представляет собой A или V</p>

139	MAV 5-6	VHCDR3 Консенсу с	ARDRGMYAYASGFXP, где X представляет собой G или N
140		Линкер Консенсу с	(GGGS) _n , где n представляет собой целое число
141	Антител о против NRP, SEC10	IgG1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSQ ISPAGGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARGE LPYYRMSKVMVDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
142	Антител о против NRP, SEC10	Легкая цепь каппа	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQYFSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSRASGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYLGSPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
143	Человеч еский NRP-1	UniProt O14786. имеет минорный SNP, V179	MERGLPLLCAVLALVLAAPAGAFRNDKCGDTIKIESPGYLTSPGYPHSYHP SEKCEWLIQAPDPYQRIMINFNPHFDLEDRDCKYDYVEVFDGENENGFHR GKFCGKIAPPPVSSGPFLLFIKFVSDYETHGAGFSIRYEIFKRGPECSQN YTPSPGVIKSPGFPEKYPNSLECTYIVFVPMSEIILEFESFDLEPDSNP PGGMFCRYDRLEIWDGFPDVGPHIGRYCGQKTPGRIRSSSGILSMVFYTD SAIAKEGFSANYSVLQSSVSEDFKMEALGMESGEIHSQITASSQYSTN WSAERSRLNYPENGWTPGEDSYREWIQVDLGLLRFTAVGTQGAISKETK KKYYVKTYKIDVSSNGEDWITIKENKPVLFQGNTPDVVAVFPKPLI TRFVRIKPATWETGISMRFEVYGCKITDYPCSGMLGMVSGLISDSQITSS NQGDRNWMPENIRLVTSRSGWALPPAPHSYINEWLQIDLGEEKIVRGI I I QGGKHRENKVFMRKFKIGYSNNGSDWKMIMDDSKRKAKEFEGNNNYDTP LRTFPALSTRFIRIYPERATHGGLGLRMELLGCEVEAPTAGPTTPNGNLV DECDDQANCHSGTGDDFQLTGGTTVLATEKPTVIDSTIQSEFPTYGFNC EFGWGSHTFCHWEHDNHVQLKWSVLTSTKGPIDHTGDGNFIYSQADEN QKGVARLVSPVVSQNSAHCMTFWYHMSGSHVGTLRVKLRYQKPEEYDQ LVWMAIGHQGDHWKEGRVLLHKSLLKLYQVIFEGEIGKGNLGGIAVDDISI NNHISQEDCAKPADLDKKNPEIKIDETGSTPGYEGEGEGDKNISRKPGNV LKTLDPILITIIAMSALGVLLGAVCGVVLVYCACWHNGMSERNLSALENYN FELVDGVKLLKDKLNTQSTYSEA
144	SEC3 легкая		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQAWAYLPTFGQ

	цепь		GTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
145	SEC3 тяжелая цепь		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYGIHWVRQAPGKGLEWVAYIYPDSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDFRNRRLRWYVMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNYTQKLSLSLSPGK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный поливалентный антигенсвязывающий белок (ABP), который специфически связывается с человеческим NRP-1 (hNRP-1; SEQ ID NO: 130) и блокирует связывание NRP-1 с полипептидом семафорина и полипептидом фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF), где ABP содержит следующие шесть последовательностей CDR:

- CDR-H3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47;
- CDR-H2, имеющую последовательность X_1 ISGSGGX₂TYYADSVX₃G, где X_1 представляет собой I или A, X_2 представляет собой S или A и X_3 представляет собой K или E, как представлено в SEQ ID NO: 136;
- CDR-H1, имеющую последовательность FTFX₁SX₂AMV, где X_1 представляет собой A, K или S и X_2 представляет собой Y или V, как представлено в SEQ ID NO: 137;
- CDR-L3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 81;
- CDR-L2, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71; и
- CDR-L1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63.

2. ABP по п.1, отличающийся тем, что ABP содержит

- CDR-H3 SEQ ID NO: 47, CDR-H2 SEQ ID NO: 27, CDR-H1 SEQ ID NO: 12, CDR-L3 SEQ ID NO: 81, CDR-L2 SEQ ID NO: 71 и CDR-L1 SEQ ID NO: 63;
- CDR-H3 SEQ ID NO: 47, CDR-H2 SEQ ID NO: 28, CDR-H1 SEQ ID NO: 13, CDR-L3 SEQ ID NO: 81, CDR-L2 SEQ ID NO: 71 и CDR-L1 SEQ ID NO: 63;
- CDR-H3 SEQ ID NO: 47, CDR-H2 SEQ ID NO: 29, CDR-H1 SEQ ID NO: 14, CDR-L3 SEQ ID NO: 81, CDR-L2 SEQ ID NO: 71 и CDR-L1 SEQ ID NO: 63; или
- CDR-H3 SEQ ID NO: 47, CDR-H2 SEQ ID NO: 30, CDR-H1 SEQ ID NO: 14, CDR-L3 SEQ ID NO: 81, CDR-L2 SEQ ID NO: 71 и CDR-L1 SEQ ID NO: 63.

3. ABP по п.2, отличающийся тем, что

- ABP по п.2(a) содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 92 и последовательность V_L SEQ ID NO: 104;
- ABP по п.2(b) содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 93 и последовательность V_L SEQ ID NO: 104;
- ABP по п.2(c) содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 94 и последовательность V_L SEQ ID NO: 104;
- ABP по п.2(d) содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 95 и последовательность V_L SEQ ID NO: 104; или
- ABP по п.2(d) содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 96 и последовательность V_L SEQ ID NO: 104.

4. ABP по п.3, отличающийся тем, что

- ABP по п.2(a) содержит (i) тяжелую цепь SEQ ID NO: 114 и легкую цепь SEQ ID NO: 126;
- ABP по п.2(b) содержит (i) тяжелую цепь SEQ ID NO: 115 и легкую цепь SEQ ID NO: 126;
- ABP по п.2(c) содержит (i) тяжелую цепь SEQ ID NO: 116 и легкую цепь SEQ ID NO: 126;
- ABP по п.2(d) содержит (i) тяжелую цепь SEQ ID NO: 117 и легкую цепь SEQ ID NO: 126; или
- ABP по п.2(d) содержит (i) тяжелую цепь SEQ ID NO: 118 и легкую цепь SEQ ID NO: 126.

5. ABP по п.1, отличающийся тем, что CDR-H3, CDR-H2, CDR-H1, CDR-L3, CDR-L2 и CDR-L1 каждая идентифицируется согласно схеме нумерации, выбранной из схемы нумерации Kabat, схемы нуме-

рации Chothia или схемы нумерации IMGT.

6. АВР по п.1 или 5, отличающийся тем, что CDR-H1 идентифицируется, как определено схемами нумерации Chothia и Kabat, включая границы обеих схем нумерации.

7. АВР по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что АВР не конкурирует или не конкурирует перекрестно за связывание NRP-1 с антителом, имеющий пару VH/VL, содержащую аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85/100, 86/100, 87/101, 88/101, 89/102, 90/102, 91/103, 92/104, 93/104, 94/104, 95/104, 96/104, 97/105, 98/105 и 99/106.

8. АВР по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что NRP-1 выбран из hNRP-1 (SEQ ID NO: 130), cNRP-1 (SEQ ID NO: 132), mNRP-1 (SEQ ID NO: 134), rNRP-1 (SEQ ID NO: 135) и их комбинации.

9. АВР по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что АВР содержит антитело.

10. АВР по п.9, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

11. АВР по п.9 или 10, отличающийся тем, что антитело выбрано из человеческого антитела, гуманизированного антитела или химерного антитела.

12. АВР по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что АВР является поливалентным.

13. АВР по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что АВР содержит фрагмент антитела.

14. АВР по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что АВР содержит альтернативный каркас.

15. АВР по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что АВР содержит константную область иммуноглобулина.

16. АВР по п.15, отличающийся тем, что АВР содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgA, IgD, IgE, IgG и IgM.

17. АВР по п.16, отличающийся тем, что АВР содержит константную область тяжелой цепи IgG, выбранную из группы, состоящей из IgG4, IgG1, IgG2 и IgG3.

18. АВР по п.17, отличающийся тем, что IgG представляет собой IgG4.

19. АВР по п.17, отличающийся тем, что IgG представляет собой IgG1.

20. АВР по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что АВР уменьшает связывание семафорина 3А с NRP-1 по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80% или по меньшей мере примерно на 90%.

21. АВР по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что АВР уменьшает связывание VEGF с NRP-1 по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80% или по меньшей мере примерно на 90%.

22. АВР по п.20, отличающийся тем, что АВР уменьшает связывание семафорина 3А с NRP-1 по меньшей мере примерно на 50%.

23. АВР по любому из пп.1-22, отличающийся тем, что NRP-1 экспрессируется на поверхности клетки-мишени.

24. АВР по любому из пп.1-23, отличающийся тем, что АВР содержит полипептидную последовательность, имеющую остаток пироглутамата (pE) на своем N-конце.

25. АВР по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что АВР содержит последовательность V_N , в которой N-концевой остаток Q замещен pE.

26. АВР по любому из пп.1-25, отличающийся тем, что АВР содержит последовательность V_L , в которой N-концевой остаток E замещен pE.

27. АВР по любому из пп.1-26, отличающийся тем, что АВР содержит последовательность тяжелой цепи, в которой N-концевой остаток Q замещен pE.

28. АВР по любому из пп.1-27, отличающийся тем, что АВР содержит последовательность легкой цепи, в которой N-концевой остаток E замещен pE.

29. Набор для предотвращения или лечения злокачественного новообразования, отличающийся тем, что набор содержит АВР по любому из пп.1-28 и инструкции по применению АВР.

30. Набор по п.29, отличающийся тем, что АВР является лиофилизированным.

31. Набор по п.30, дополнительно содержащий жидкость для восстановления лиофилизированного АВР.

32. Выделенный полинуклеотид, кодирующий АВР по п.1.

33. Экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.32.

34. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.32 или экспрессирующий вектор по п.33.

35. Клетка-хозяин по п.34, отличающаяся тем, что клетка-хозяин выбрана из бактериальной клетки, грибной клетки и клетки млекопитающего.

36. Клетка-хозяин по п.34, отличающаяся тем, что клетка-хозяин выбрана из клетки E.coli, клетки Saccharomyces cerevisiae и клетки CHO.

37. Способ получения АВР по любому из пп.1-28, включающий экспрессию АВР в клетке-хозяине по п.34 и выделение экспрессированного АВР.

38. Фармацевтическая композиция, содержащая АВР по любому из пп.1-28 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

39. Фармацевтическая композиция по п.38, отличающаяся тем, что АВР присутствует в композиции в количестве, эффективном для локального ингибирования взаимодействия NRP-1: семафорин в опухоли.

40. Фармацевтическая композиция по п.38, отличающаяся тем, что антитело против NRP-1 присутствует в композиции в количестве, эффективном для ингибирования взаимодействия между NRP-1 и трансмембранным полипептидом семафорина при введении пациенту-человеку.

41. Фармацевтическая композиция по п.38, отличающаяся тем, что антитело против NRP-1 специфично блокирует связывание NRP-1 с трансмембранным полипептидом семафорина.

42. Фармацевтическая композиция по п.40, отличающаяся тем, что антитело против NRP-1 способно ингибировать подавление Treg у пациента-человека.

43. Фармацевтическая композиция по п.40, отличающаяся тем, что антитело против NRP-1 способно снижать выживаемость и/или стабильность Treg у пациента-человека.

44. Фармацевтическая композиция по п.38, отличающаяся тем, что антитело против NRP-1 присутствует в композиции в количестве, эффективном для локального ингибирования взаимодействия NRP-1:семафорин-4 в опухоли.

45. Фармацевтическая композиция по п.38, отличающаяся тем, что антитело против NRP-1 присутствует в композиции в количестве, эффективном для локального ингибирования взаимодействия NRP-1: семафорин-3 в опухоли.

46. Фармацевтическая композиция по п.38, отличающаяся тем, что антитело против NRP-1 присутствует в композиции в количестве, эффективном для предотвращения развития нежелательного аутоиммунного и/или воспалительного проявления.

47. Фармацевтическая композиция по п.40, отличающаяся тем, что пациент-человек имеет злокачественное новообразование.

48. Фармацевтическая композиция по п.38, отличающаяся тем, что количество АВР в фармацевтической композиции является достаточным для

- (a) уменьшения подавления эффекторных Т-клеток регуляторными Т-клетками;
- (b) активации эффекторных Т-клеток;
- (c) уменьшения количества регуляторных Т-клеток в ткани или в системном кровотоке;
- (d) индукции или усиления пролиферации эффекторных Т-клеток;
- (e) ингибирования скорости роста опухоли;
- (f) вызова регрессии опухоли; или
- (g) их комбинации у пациента.

49. Способ ингибирования функции или снижения стабильности регуляторных Т-клеток (Treg) у нуждающегося в этом пациента, где способ включает введение эффективного количества АВР по любому из пп.1-28 или фармацевтической композиции по любому из пп.38-48.

50. Способ повышения функции эффекторных Т-клеток (T_{eff}) или воздействия на T_{eff} in vivo АВР по любому из пп.1-28, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп.38-48.

51. Способ по п.49 или 50, отличающийся тем, что пациент имеет злокачественное новообразование.

52. Способ по любому из пп.49-51, отличающийся тем, что способ индуцирует или усиливает иммунный ответ на опухолеспецифический антиген.

53. Способ по любому из пп.49-52, отличающийся тем, что АВР способен

- (a) уменьшать выживание и/или стабильность Treg у пациента;
- (b) связываться с внеклеточным доменом полипептида NRP-1; или
- (c) на их комбинацию.

54. Способ по любому из пп.49-53, дополнительно включающий введение пациенту одного или более дополнительных терапевтических агентов.

55. Способ по п.54, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент выбран из цитотоксического агента, химиотерапевтического агента, цитостатического агента, антигормонального агента, ингибитора VEGF, иммуностимулирующего агента, антиангиогенного агента и их комбинации.

56. Способ по п.54, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой иммуностимулирующий агент.

57. Способ по п.56, отличающийся тем, что дополнительным терапевтическим агентом является химерный антигенный Т-клеточный рецептор.

58. Способ по п.56, отличающийся тем, что иммуностимулирующий агент содержит агент, который блокирует передачу сигналов ингибирующего рецептора, экспрессируемого иммунной клеткой или ее лигандом.

59. Способ по п.58, отличающийся тем, что ингибирующий рецептор, экспрессируемый иммунной клеткой или ее лигандом, выбран из PVRIg, VISTA, CCR4, CD27, CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, Tim3, TIGIT, нейритина, BTLA, KIR и их комбинации.

60. Способ по п.56, отличающийся тем, что иммуностимулирующий агент содержит агонист стиму-

лирующего рецептора, экспрессируемого иммунной клеткой.

61. Способ по п.60, отличающийся тем, что стимулирующий рецептор, экспрессируемый иммунной клеткой, выбран из OX40, ICOS, GITR, CD28, CD37, CD40, 4-1BB и их комбинаций.

62. Способ по п.56, отличающийся тем, что иммуностимулирующий агент содержит цитокин.

63. Способ по п.56, отличающийся тем, что иммуностимулирующий агент содержит вакцину против опухолеспецифического антигена.

64. Способ модулирования иммунного ответа у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества АВР по любому из пп.1-28 или фармацевтической композиции по любому из пп.38-48.

65. Способ по любому из пп.49-64, дополнительно включающий введение пациенту одного или более дополнительных терапевтических агентов.

66. Способ по п.65, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой

(i) агонист стимулирующего рецептора иммунной клетки; или

(ii) антагонист ингибирующего рецептора иммунной клетки, где рецептор иммунной клетки выбран из OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), CD28, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, GITR, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, CD83 лиганда и их комбинации.

67. Способ по п.65, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой онколитический вирус, выбранный из вируса простого герпеса, вируса везикулярного стоматита, аденовируса, вируса болезни Ньюкасла, вируса коровьей оспы, вируса мараба и их комбинаций.

68. Способ по любому из пп.65-67, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент включен в состав той же фармацевтической композиции, что и АВР.

69. Способ по любому из пп.65-67, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент включен в состав фармацевтической композиции, отличной от АВР.

70. Способ по любому из пп.65-67 или 69, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент вводят перед введением АВР.

71. Способ по любому из пп.65-67 или 69, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент вводят после введения АВР.

72. Способ по любому из пп.65-71, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент вводят одновременно с АВР.

73. Способ по любому из пп.49-72, отличающийся тем, что способ по существу не вызывает тромбоцитопении у пациента.

74. АВР по любому из пп.1-28, отличающийся тем, что АВР специфично связывается с человеческим NRP-1 с K_D менее чем 20 нМ, менее чем 10 нМ, менее чем 5 нМ, менее чем 2 нМ, менее чем 1 нМ, менее чем 0,5 нМ или менее чем 0,2 нМ.

75. АВР по любому из пп.1-28 или 74, отличающийся тем, что АВР специфично связывается с NRP-1 человека, мыши и яванской макаки.

76. АВР по любому из пп.1-28 или 74, 75, отличающийся тем, что АВР связывается с эпитопом на NRP-1, отличным от эпитопа на NRP-1, с которым связывается SEC10, где SEC10 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO: 141, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO: 142.

77. АВР по любому из пп.1-28 или 74-76, отличающийся тем, что АВР связывается с доменом b1 NRP-1.

78. АВР по любому из пп.1-28 или 74, 75, отличающийся тем, что АВР специфично связывается с NRP1 (SEQ ID NO: 130), включая один или более остатков NRP1, выбранных из группы, состоящей из Y297, T316, D320, E348, T349, K350, K351, K352, Y353, Y354, E412, T413, G414 и I415.

79. АВР по п.1, отличающийся тем, что АВР представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где

(1) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 96, и переменную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 104; или

(2) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 96, где аминокислотный остаток в положении 1 модифицирован до пироглутамата; и переменную область легкую цепи, состоящую из SEQ ID NO: 104.

80. АВР по п.2, отличающийся тем, что АВР представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где

(1) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 118, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126;

(2) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 118, где аминокислотный остаток в положении 1 модифицирован до пироглутамата, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 126;

(3) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, соответствующей положениям аминокислот от 1 до 453 SEQ ID NO: 118,

для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента:

(а) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(b) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий последовательность оснований, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(с) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

88. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.80, где способ включает культивирование клетки-хозяина (клеток-хозяев), выбранной из группы, состоящей из (а)-(с) ниже, для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента:

(а) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(b) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(с) клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность оснований, кодирующую тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и клетка-хозяин, трансформированная экспрессирующим вектором, содержащим полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

89. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.79 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

90. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.80 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

91. Фармацевтическая композиция по любому из пп.89 или 90, которая представляет собой фармацевтическую композицию для лечения злокачественного новообразования.

92. Фармацевтическая композиция по п.89, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит цитотоксический агент, химиотерапевтический агент, цитостатический агент, антигормональный агент, ингибитор VEGF, иммуностимулирующий агент, антиангиогенный агент и их комбинацию.

93. Способ предотвращения или лечения злокачественного новообразования, где способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.80 нуждающемуся в этом пациенту, где злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из рака головного мозга, предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, кожи и рака легкого.

94. Способ по п.93, дополнительно включающий введение пациенту одного или более дополнительных терапевтических агентов.

95. Способ по п.94, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из цитотоксического агента, химиотерапевтического агента, цитостатического агента, антигормонального агента, ингибитора VEGF, иммуностимулирующего агента, антиангиогенного агента и их комбинации.

96. АВР по п.1, отличающийся тем, что АВР содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H3, состоящую из SEQ ID NO: 47, CDR-H2, состоящую из SEQ ID NO: 30, и CDR-H1, состоящую из SEQ ID NO: 14; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L3, состоящую из SEQ ID NO: 81, CDR-L2, состоящую из SEQ ID NO: 71, и CDR-L1, состоящую из SEQ ID NO: 63.

97. АВР по п.1, отличающийся тем, что АВР характеризуется одним или более из следующего:

(а) конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание NRP-1 с антителом, имеющим пару VH/VL, содержащую аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85/100, 86/100, 87/101, 88/101, 89/102, 90/102, 91/103, 92/104, 93/104, 94/104, 95/104, 96/104,

97/105, 98/105 и 99/106;

- (b) специфичен для клеточной поверхности NRP-1;
- (c) специфично блокирует связывание NRP-1 с трансмембранным полипептидом семафорина;
- (d) блокирует взаимодействие между полипептидом NRP-1 и полипептидом фактора роста эндотелиальных клеток сосудов (VEGF);
- (e) способен ингибировать подавление регуляторной Т-клетки (Treg) у пациента-человека;
- (f) ко-стимулирует эффекторную Т-клетку в комбинации с презентацией антигена из антиген-презентирующей клетки;
- (g) ингибирует подавление эффекторной Т-клетки регуляторной Т-клеткой;
- (h) уменьшает количество эффекторных Т-клеток в ткани или в системном кровотоке;
- (i) не связывается с тромбоцитами;
- (j) не вызывает тромбоцитопению при введении пациенту;
- (k) блокирует связывание семафорина 3А (SEMA3А) с NRP-1;
- (l) не связывается с NRP-1-отрицательными клетками;
- (m) специфически связывается с NRP1, включая один или более остатков NRP1, выбранных из группы, состоящей из Y297, T316, D320, E348, T349, K350, K351, K352, Y353, Y354, E412, T413, G414 и I415; или
- (n) способен на любую комбинацию (a)-(m).

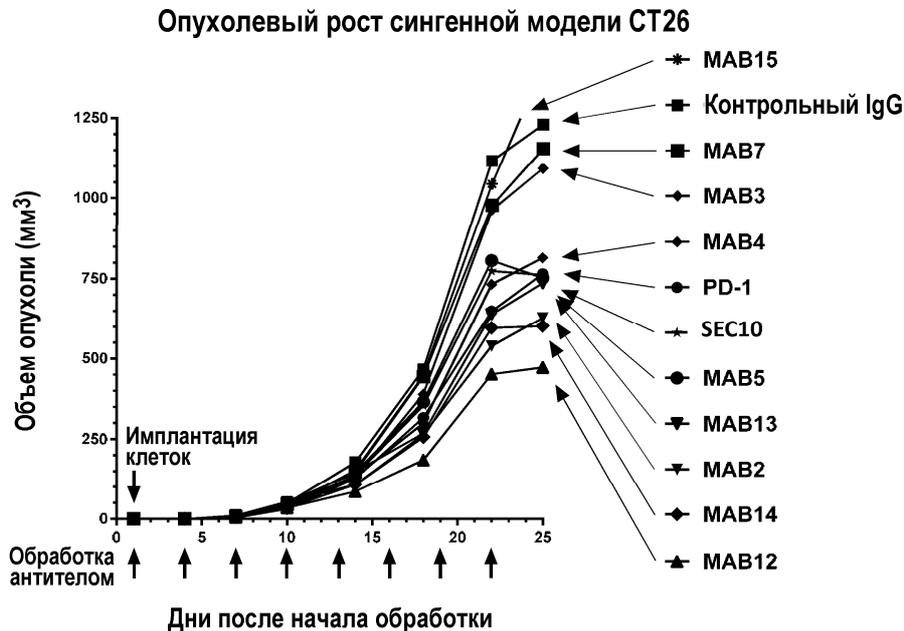
98. Способ по п.56, в котором иммуностимулирующий агент представляет собой антитело против PD-1.

99. Способ по п.98, в котором антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб, ниволумаб или их комбинацию.

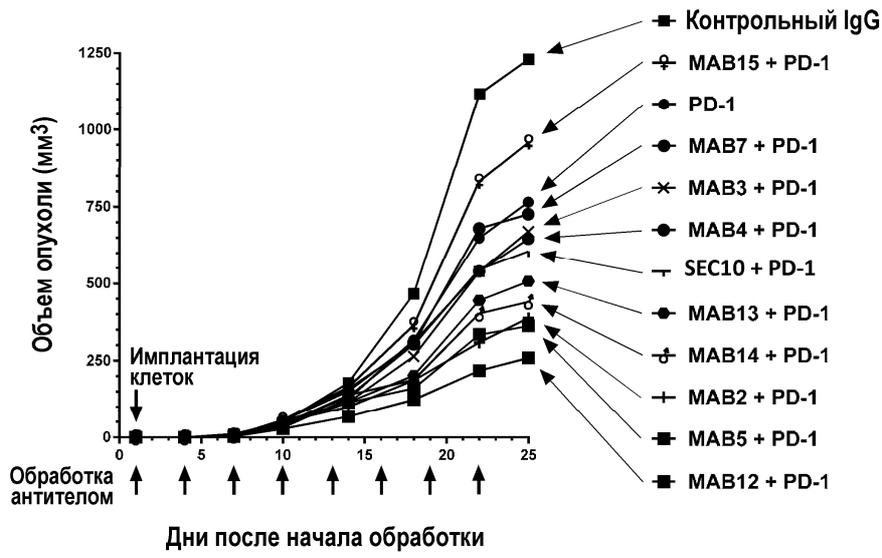
100. Способ по п.65, в котором дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против PD-1.

101. Способ по п.65, в котором антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб, ниволумаб или их комбинацию.

102. Способ профилактики или лечения злокачественного новообразования или вирусной инфекции, включающий введение терапевтически эффективного количества АВР по п.1 нуждающемуся в этом пациенту.

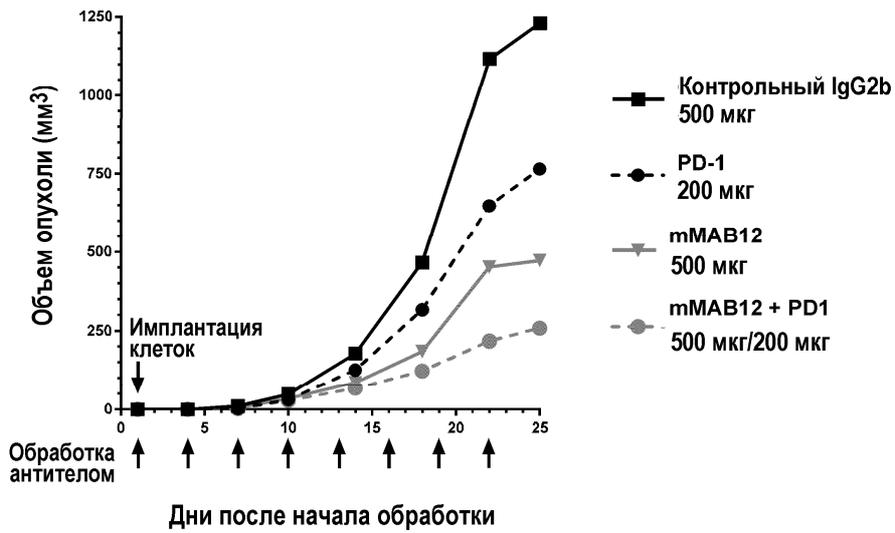


Опухолевый рост сингенной модели СТ26



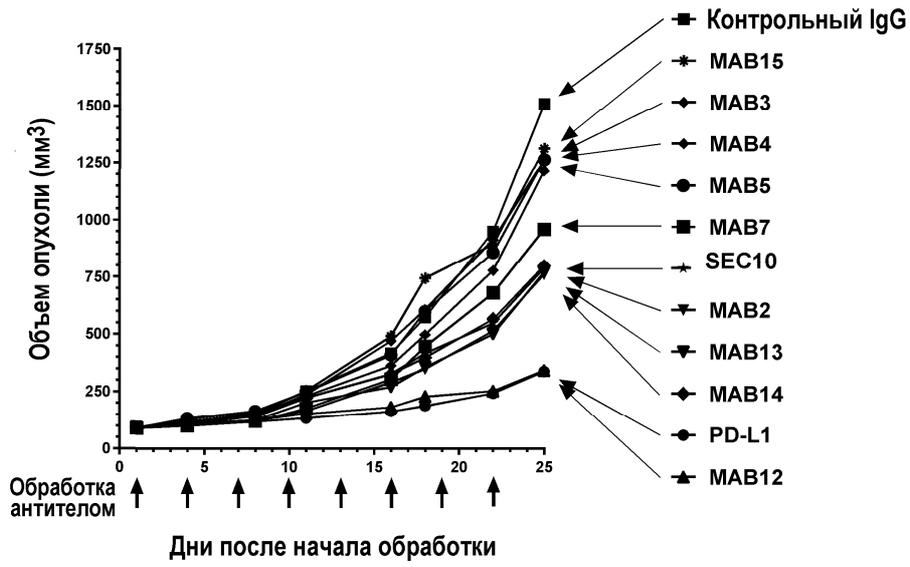
Фиг. 1B

Опухолевый рост сингенной модели СТ26

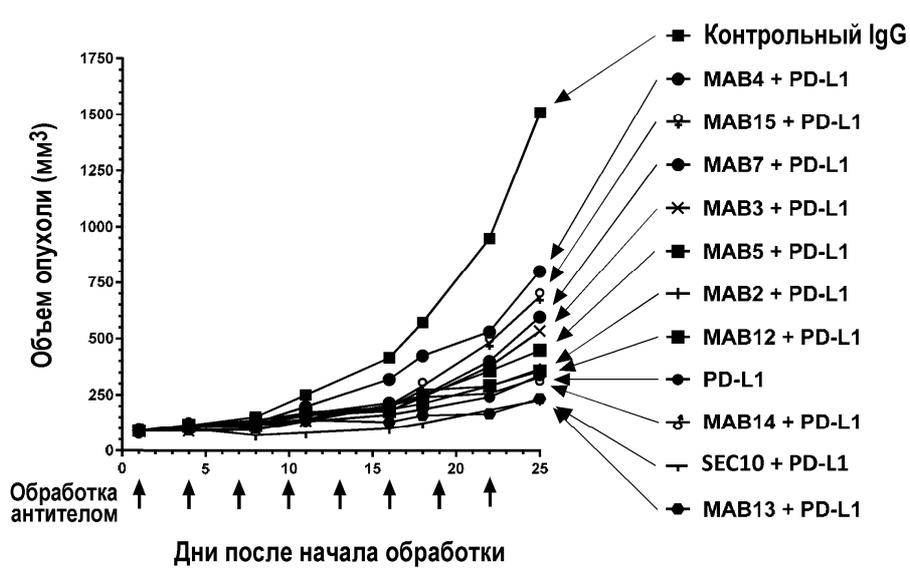


Фиг. 1C

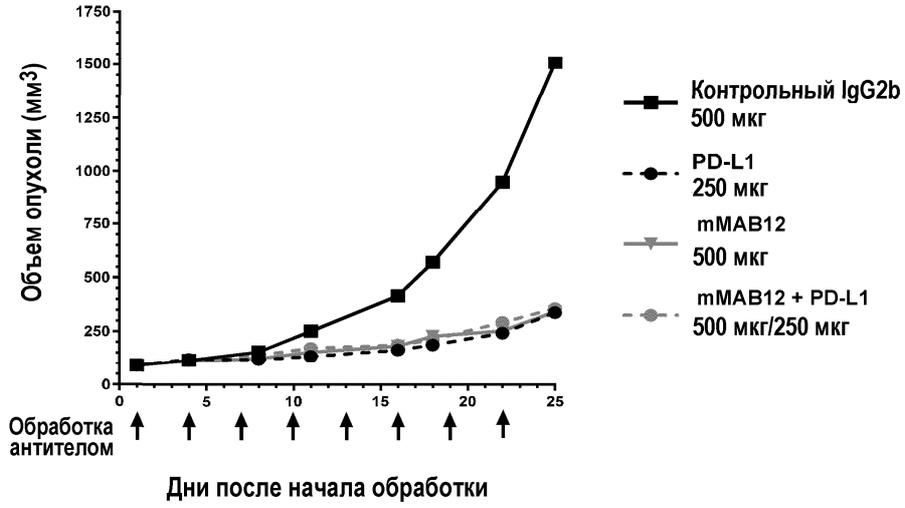
Опухолевый рост сингенной модели МС38



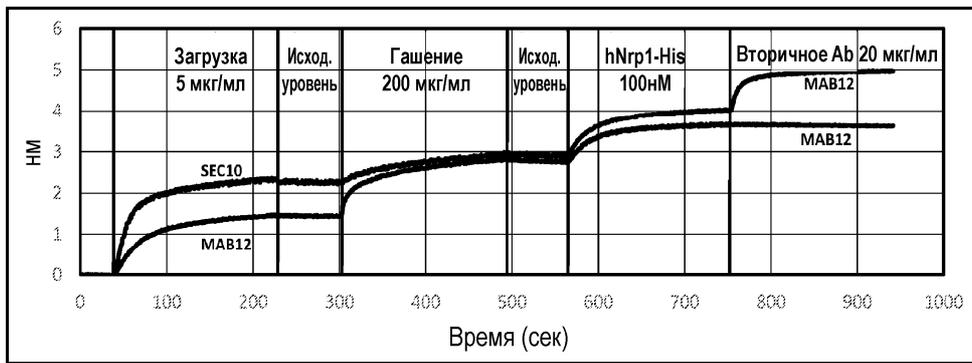
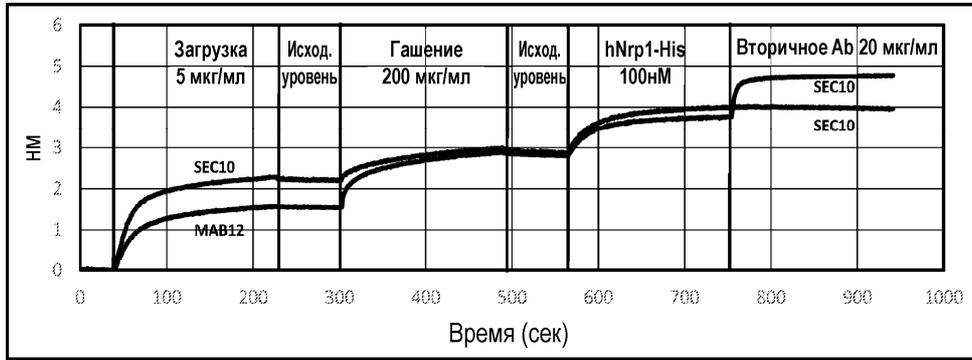
Опухолевый рост сингенной модели МС38



Опухолевый рост сингенной модели МС38



Фиг. 2С



Фиг. 3

