

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491574 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.13

(22) Дата подачи заявки
2022.12.19

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К LTBR И СОДЕРЖАЩИЕ ИХ
БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

(31) 21215804.2; 22208828.8

(32) 2021.12.20; 2022.11.22

(33) EP

(86) PCT/EP2022/086540

(87) WO 2023/117834 2023.06.29

(71) Заявитель:
Ф. ХОФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

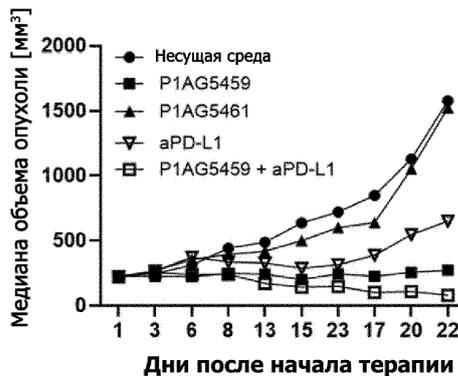
(72) Изобретатель:

Бьянки Роберта (CH), Борман Феликс (DE), Брайдон Мишель Виктория (CH), Денгль Штефан, Дюрр Харальд, Жорж Ги (DE), Ханиш Лидия Ясмин (CH), Хайдрих Моника (DE), Хоссе Ральф, Кунц Лео Фредерик (CH), Леклер Стефан (DE), Лайсибах Дезире, Менде Фанни (CH), Мундигль Олаф, Николов Мирослав (DE), Уманья Пабло (CH), Вагнер Корнелия (DE)

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение относится к новым антителам, которые связываются с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим эти новые антитела к LTBR и антигенсвязывающий домен, который связывает опухолеассоциированный антиген, в частности, с белком активации фибробластов (FAP), к способам получения этих молекул и к способам их применения.



202491574 A1

202491574 A1

АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К LTBR И СОДЕРЖАЩИЕ ИХ БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

5

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к новым антителам, которые связываются с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим эти новые антитела к LTBR и антигенсвязывающий домен, который связывает опухолеассоциированный антиген, в частности, с белком активации фибробластов (FAP), к способам получения этих молекул и к способам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Спектр средств лечения рака коренным образом изменился в последние годы после разработки и одобрения средств иммунотерапии рака, таких как средства, блокирующие иммунные контрольные точки PD-1/PD-L1 и CTLA-4. Эти противораковые средства иммунотерапии могут обеспечивать устойчивый ответ при онкологических показаниях, таких как меланома, немелкоклеточный рак легких и рак мочевого пузыря, и, следовательно, становятся новым стандартом лечения отдельно или в комбинации с другими средствами терапии. Тем не менее только подгруппа пациентов (<30%) испытывает длительную пользу от этих средств терапии, и большинство пациентов рецидивируют вследствие механизмов первичной или приобретенной резистентности. Кроме того, несколько распространенных онкологических показаний (например, колоректальный рак и рак поджелудочной железы) в основном невосприимчивы к этим иммуномодуляторам. Следовательно, существует острая медицинская потребность в разработке средств терапии для борьбы с механизмами резистентности и усиления ответов на средства иммунотерапии рака, включая ингибиторы контрольных точек.

Клинические данные показывают, что пациенты, которые не отвечают или слабо отвечают на ингибиторы контрольных точек, демонстрируют не-T-клеточный воспалительный иммунный фенотип, характеризующийся либо отсутствием цитотоксических T-клеток, либо их ограниченной локализацией в строме опухоли. Таким образом, новые средства терапии, направленные на

увеличение иммунной инфильтрации, будут иметь большое значение для улучшения частоты ответа на ингибиторы контрольных точек, расширяя их клиническую пользу.

Суперсемейство TNFR состоит из 19 лигандов и 29 рецепторов, которые имеют некоторое структурное сходство, но участвуют во многих различных физиологических функциях. В общем, члены этого суперсемейства могут либо индуцировать гибель клеток (например, DR5-TRAIL, Fas-FasL), либо они могут способствовать выживанию и воспалению (например, TNF-TNFR). Рецептор лимфотоксина-бета (LTBR) является членом суперсемейства TNFR, которое принадлежит к этой второй категории, и экспрессируется различными клетками, включая стромальные клетки микроокружения опухоли, миелоидные клетки и опухолевые клетки эпителиального происхождения. Взаимодействия лиганд-рецептор в суперсемействе TNFR могут быть моно- и поливалентными. Например, OX40 и его лиганд (OX40L) образуют монотипическую пару лиганд-рецептор, тогда как LTBR, LT α , LT β и LIGHT демонстрируют мультивалентные взаимодействия, которые создают сложную сеть взаимосвязанных путей. Активация LTBR связыванием лиганда лимфотоксина α 1 β 1 (LT α 1 β 1) или LIGHT индуцирует олигомеризацию рецептора и передачу сигнала через канонические и неканонические пути NF κ B, что приводит к активации генов воспаления и развития, таких как молекулы адгезии (ICAM и VCAM), хемоаттрактанты (CXCL9, 10, 11) и организующие лимфоидную ткань хемокины (CCL21, CCL19, CXCL13) (Lu и Browning., Front Immunol. 2014, 5:47, doi: 10.3389/fimmu.2014.00047). Этот путь имеет важное значение для развития и поддержания вторичных лимфоидных органов, как показано посредством фенотипа мышей с нокаутом по *ltbr*, у которых не развиваются лимфатические узлы и пейеровы бляшки (Fütterer et al, Immunity 1998, 9(1), 59-70, doi: 10.1016/s1074-7613(00)80588-9). Кроме того, он также является ключом к развитию и поддержанию наружных эндотелиальных венул (HEV) (Browning et al, Immunity 2005, 23(5), 539-550, doi: 10.1016/j.immuni.2005.10.002). Многоклеточные агрегаты, напоминающие вторичные лимфоидные органы, состоящие из Т-клеток и активированных дендритных клеток (DC), В-клеток и HEV, обнаруживаются гистологически во многих солидных опухолях. Клинические данные показывают, что наличие таких эктопических лимфоидных органов, также называемых третичными лимфоидными структурами (TLS), или

наличие HEV коррелируют с лучшим прогнозом при нескольких опухолевых показателях (Dieu-Nosjean et al, *Immunol. Rev.* 2016, 271(1), 260-275, doi: 10.1111/imr.12405). Считается, что TLS и HEV образуются в ответ на одни и те же молекулярные сигналы, участвующие в развитии лимфатических узлов, такие как активация пути LTBR. Таким образом, активация LTBR может способствовать образованию TLS в микроокружении опухоли и индуцировать противоопухолевые иммунные ответы.

Действительно, доклинические данные подтверждают гипотезу о том, что активация LTBR может увеличивать иммунную инфильтрацию, усиливать ответы на ингибиторы контрольных точек и индуцировать образование TLS. Активация LTBR с помощью агонистического антитела или лиганда-мишени повышала инфильтрацию Т-клеток в нескольких моделях опухолей мыши (Lukashev et al, *Cancer Res.* 2006, 66(19), 9617-9624, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0217). Следовательно, комбинированная терапия ингибиторами контрольных точек была более эффективной в комбинации с агонистом LTBR (Allen et al, *Sci Transl Med.* 2017, 9(385), eaak9679, doi: 10.1126/scitranslmed.aak9679; Johansson-Percival et al, *Cell Rep.* 2017, 13(12), 2687-2698, doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.004; и Tang et al, *Cancer Cell* 2016, 29(3), 285-296, doi: 10.1016/j.ccell.2016.02.004). Кроме того, сообщалось о доказательствах образования TLS и развития HEV в ответ на такие агонисты.

В дополнение к ключевой роли LTBR в развитии TLS и HEV, было обнаружено, что активация LTBR индуцирует гибель клеток некоторых клеточных линий карциномы (Browning et al, *J Exp Med* 1996, 183(3), 867-878, doi: 10.1084/jem.183.3.867). В исследовании фазы I оценивали безопасность и переносимость агонистического гуманизированного антитела к LTBR (hCBE11) у пациентов с распространенными солидными опухолями (ClinicalTrials.gov, NCT00105170). Исследование было приостановлено и впоследствии прекращено до завершения включения пациентов в исследование. Это указывает на возможность серьезных проблем безопасности, ассоциированных с широко распространенным агонизмом LTBR у людей.

Учитывая огромный терапевтический потенциал агонистов LTBR для улучшения иммунотерапии рака, необходимо обеспечить агонистические антитела к LTBR с превосходным фармакологическим профилем или биспецифические антитела с преимущественным профилем безопасности и

способностью активировать LTBR только в микроокружении опухоли, а не в других тканях, экспрессирующих LTBR.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым антителам, которые специфически связываются с рецептором лимфотоксина-бета человека (LTBR), в частности, агонистическим антителам к hu LTBR. Эти антитела способны связываться с LTBR человека и LTBR яванского макака с менее чем 2-кратной разницей аффинности. Некоторые из новых агонистических антител к hu LTBR даже способны связываться с LTBR человека, LTBR яванского макака и LTBR мыши. Настоящее изобретение также относится к мультиспецифическим антителам, содержащим эти новые агонистические антитела.

Таким образом, в данном документе представлено агонистическое антитело к рецептору лимфотоксина-бета (LTBR), которое специфично связывается с LTBR человека и LTBR яванского макака, где указанное антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, CDR-L2, 5 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; или

(viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, и CDR-H3, 10 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

15 В одном аспекте представлено агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее, где агонистическое антитело имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

(а) связывается с LTBR человека и LTBR яванского макака с менее чем 2-кратной разницей аффинности; или

20 (б) связывается с внеклеточным доменом LTBR человека с EC_{50} , составляющей менее 4 нМ, измеряемой посредством ELISA, и связывается с внеклеточным доменом LTBR яванского макака с EC_{50} , составляющей менее 5 нМ, измеряемой посредством ELISA; или

25 (в) требует перекрестного связывания для своей агонистической активности для активации LTBR человека; или

(г) требует перекрестного связывания для своей агонистической активности для индуцирования активации ICAM в эндотелиальных клетках пупочной вены человека или фибробластах, ассоциированных с раком; или

30 (д) ингибирует взаимодействие между LTBR человека и его человеческими лигандами: лимфотоксином $\alpha 1\beta 2$ и LIGHT.

В одном аспекте представлено агонистическое антитело к LTBR, содержащее:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере

- приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34; или
- 5 (ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую
- 10 аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:50; или
- (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
- 15 приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
- приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:82; или
- 20 (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую
- аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
- 25 приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:90; или
- (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
- приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID
- 30 NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
- приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:98;
- (vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:41, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере

5 приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:42;

(vii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID

10 NO:57, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:58; или

(viii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID

15 NO:65, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID

20 NO:66; или

(ix) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID

25 NO:73, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:74.

В одном аспекте агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее, содержит:

30 (i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или

5 (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или

10 (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или

15 (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98; или

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или

20 (vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58; или

25 (viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66;

30 (ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74.

В одном конкретном аспекте представлено агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее, где агонистическое антитело к LTBR дополнительно специфично связывается с LTBR мыши. В одном аспекте

агонистическое антитело к LTBR связывается с внеклеточным доменом LTBR мыши с EC_{50} , составляющей менее 1 нМ, измеряемой посредством ELISA.

В одном аспекте агонистическое антитело к LTBR, которое дополнительно специфично связывается с LTBR мыши, содержит:

5 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и
10 вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

15 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и
20 вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

25 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и
30 вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или

 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID

NO:85, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.

5 В одном аспекте агонистическое антитело к LTBR, которое дополнительно специфично связывается с LTBR мыши, содержит:

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

10 переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или

15 переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или

20 переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98.

В одном конкретном аспекте агонистическое антитело к LTBR, описанное в данном документе, связывается с областью эпитопа SEQ ID NO:351 на LTBR

25 человека. В одном аспекте такое агонистическое антитело к LTBR содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и

30 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32. В одном аспекте содержит

вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

Настоящее изобретение также относится к агонистическим антителам к LTBR, которые представляют собой мультиспецифические специфические антитела, содержащие агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее. В одном конкретном аспекте представлены агонистические антитела к LTBR, которые представляют собой биспецифические антитела. В любом из аспектов, описанных в данном документе ранее, агонистическое антитело к LTBR предпочтительно содержит Fc-домен человеческого происхождения, в частности, подкласса IgG человека, более конкретно, подкласса IgG1 человека. В одном аспекте агонистическое антитело к LTBR содержит Fc-домен подкласса IgG1 человека, содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. В одном аспекте агонистическое антитело к LTBR содержит Fc-домен подкласса IgG1 человека с аминокислотными мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

В одном аспекте агонистическое антитело к LTBR представляет собой биспецифическое антитело, которое специфично связывается с LTBR и опухолеассоциированным антигеном (ТАА).

В одном аспекте представлено агонистическое антитело к LTBR, которое представляет собой биспецифическое антитело, способное специфично связываться с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR) и белком активации фибробластов (FAP), и, таким образом, комбинирует антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, с по меньшей мере одним антигенсвязывающим доменом, способным агонистически связываться с LTBR, в частности, hu LTBR, где активация посредством LTBR обеспечивается с помощью перекрестного связывания посредством связывания с FAP, экспрессируемым на клетках стромы опухоли. В отличие от обычных нецелевых агонистических антител к LTBR, нацеливание на опухолеассоциированную мишень (ТАА), такую как FAP, позволяет ограничить агонизм LTBR исключительно микроокружением опухоли (опухолевым эндотелием и

фибробластами, ассоциированными с раком), за счет чего уменьшаются потенциальные побочные эффекты.

Белок активации фибробластов (FAP) представляет собой сериновую протеазу, высоко экспрессируемую на клеточной поверхности раковых стромальных клеток и на фибробластных ретикулярных клетках во вторичных лимфоидных органах, но в остальном очень ограниченную экспрессию в нормальных тканях. FAP широко распространен при различных показаниях к раку, что позволяет применять его в качестве нацеливающего фрагмента для лекарственных средств, которые должны накапливаться в строме опухоли.

Таким образом, в одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее:

(а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP);

(б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR); и

(в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антитела с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

Биспецифические антитела содержат Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, которые содержат одну или более аминокислотных замен, снижающих аффинность связывания антитела с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. Таким образом, опосредованное Fc-рецептором перекрестное сшивание устраняется, и опухолеспецифическая активация достигается посредством перекрестного сшивания посредством связывания антигенсвязывающего домена, который специфично связывается с FAP посредством связывания с его опухолеассоциированной мишенью. Представлено биспецифическое антитело, которое активирует LTBR только при связывании с FAP. Таким образом, представлено биспецифическое антитело, которое активирует LTBR в строме опухоли.

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее:

(а) первый Fab-фрагмент, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP),

(б) второй Fab-фрагмент, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, где биспецифическое агонистическое антитело к LTBR содержит третий антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, т.е. биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее: (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP); (б) второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

В одном конкретном аспекте третий антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, идентичен второму антигенсвязывающему домену, который специфично связывается с LTBR, что означает, что второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), являются одинаковыми. В одном аспекте второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с LTBR, представляют собой Fab-фрагменты, которые специфично связываются с LTBR. В одном аспекте Fab-фрагменты, которые специфично связываются с LTBR, представляют собой фрагменты crossFab. В дополнительном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, представляет собой Fab-фрагмент.

В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, раскрытое в данном документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP), содержащий:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, CDR-H2,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

В одном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит: (i) переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8; или (ii) переменную

область тяжелой цепи ($V_H FAP$), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и вариабельную область легкой цепи ($V_L FAP$), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24. В одном конкретном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит

5 (i) вариабельную область тяжелой цепи ($V_H FAP$), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и вариабельную область легкой цепи ($V_L FAP$), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

15

20 В одном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит вариабельную область тяжелой цепи ($V_H FAP$), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, и вариабельную область легкой цепи ($V_L FAP$), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10; или он содержит вариабельную область тяжелой цепи ($V_H FAP$), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:25, и вариабельную область легкой цепи ($V_L FAP$), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:26; или он содержит вариабельную область тяжелой цепи ($V_H FAP$), содержащую аминокислотную последовательность,

30

которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18. В одном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, или он содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26, или он содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18. В одном конкретном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10. В частности, первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и представляет собой Fab-фрагмент.

В другом аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, раскрытое в данном документе, содержит второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержащий:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую

комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

5 (ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и
10 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2,
15 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3,
20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 или SEQ ID
25 NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88; или

(v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1,
30 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38, CDR-L2,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40; или

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; или

(vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; или

(viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

В одном аспекте второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с LTBR, содержат:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую

комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

5 (ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и
10 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2,
15 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3,
20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 или SEQ ID
25 NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88; или

(v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1,
30 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38, CDR-L2,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40; или

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; или

(vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; или

(viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, раскрытое в данном документе, где второй антигенсвязывающий домен (и необязательно третий антигенсвязывающий домен), который специфично связывается с LTBR, каждый содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую

- аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34; или
- 5 (ii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:49, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID
- 10 NO:50; или
- (iii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:81, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую
- 15 аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:82; или
- (iv) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
- 20 приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:89, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:90; или
- 25 (v) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:97, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
- 30 приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:98;
- (vi) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID

NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:42;

5 (vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
10 приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:58; или

(viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID
15 NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66; или

(ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
20 приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID
25 NO:74.

В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, раскрытое в данном документе, содержит второй антигенсвязывающий домен (и необязательно третий антигенсвязывающий домен), который специфично связывается с LTBR, содержащий:

30 (i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или

5 (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или

10 (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или

15 (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98; или

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или

20 (vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58; или

25 (viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66;

30 (ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74.

В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, раскрытое в данном документе, где второй антигенсвязывающий домен (и необязательно третий антигенсвязывающий

домен), который специфично связывается с LTBR человека, LTBR яванского макака и LTBR мыши, содержит:

5 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую 10 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, 15 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, 20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и 25 вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или

 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, 30 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.

В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR содержит второй антигенсвязывающий домен (и необязательно третий антигенсвязывающий домен), который специфично связывается с LTBR человека, LTBR яванского макака и LTBR мыши, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98.

В другом аспекте второй антигенсвязывающий домен (и необязательно третий антигенсвязывающий домен), который специфично связывается с LTBR, содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или
 (ii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или
 (iii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50.

5 В одном конкретном аспекте второй антигенсвязывающий домен (и необязательно третий антигенсвязывающий домен), который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34. В другом конкретном аспекте второй
10 антигенсвязывающий домен (и необязательно третий антигенсвязывающий домен), который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42. В еще
15 одном конкретном аспекте второй антигенсвязывающий домен (и необязательно третий антигенсвязывающий домен), который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ
20 ID NO:50.

Таким образом, в одном конкретном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, описанное в данном документе, содержит: (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую
25 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и (б) второй антигенсвязывающий домен (и необязательно третий антигенсвязывающий домен), который специфично связывается с LTBR, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую
30 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34. В другом аспекте биспецифическая антигенсвязывающая молекула, описанная в данном документе, содержит: (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP,

содержащий переменную область тяжелой цепи ($V_H FAP$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи ($V_L FAP$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и (б) второй антигенсвязывающий домен (и необязательно третий антигенсвязывающий домен), который специфично связывается с LTBR, содержащий переменную область тяжелой цепи ($V_H LTBR$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи ($V_L LTBR$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42. В еще одном аспекте биспецифическая антигенсвязывающая молекула, описанная в данном документе, содержит: (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержащий переменную область тяжелой цепи ($V_H FAP$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи ($V_L FAP$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и (б) второй антигенсвязывающий домен (и необязательно третий антигенсвязывающий домен), который специфично связывается с LTBR, содержащий переменную область тяжелой цепи ($V_H LTBR$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи ($V_L LTBR$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50.

Во всех этих аспектах, описанных в данном документе ранее, биспецифическое агонистическое антитело к LTBR содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. В одном аспекте Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, представляет собой Fc-домен IgG. В одном конкретном аспекте Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, представляет собой Fc-домен IgG1 или Fc-домен IgG4. В одном конкретном аспекте Fc-домен относится к подклассу IgG1 человека с аминокислотными мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как определено в данном документе ранее, где первая субъединица Fc-области содержит выступы, а вторая субъединица Fc-области

содержит впадины в соответствии со способом «выступы-во-впадины». В частности, представлена биспецифическая антигенсвязывающая молекула, где (i) первая субъединица Fc-области содержит аминокислотные замены S354C и T366W (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat), а вторая субъединица Fc-области содержит аминокислотные замены Y349C, T366S и Y407V (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat), или (ii) первая субъединица Fc-области содержит аминокислотные замены K392D и K409D (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat), а вторая субъединица Fc-области содержит аминокислотные замены E356K и D399K (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat). Более конкретно, представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, где первая субъединица Fc-области содержит аминокислотные замены S354C и T366W (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat), а вторая субъединица Fc-области содержит аминокислотные замены Y349C, T366S и Y407V (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

В дополнительном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как определено в данном документе ранее, содержащее:

- (а) первый Fab-фрагмент, который специфично связывается с FAP,
- (б) второй Fab-фрагмент, который специфично связывается с LTBR, и
- (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антитела с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. В одном аспекте второй Fab-фрагмент, который специфично связывается с LTBR, представляет собой фрагмент crossFab. Таким образом, представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, которое обеспечивает одновалентное связывание с LTBR и одновалентное связывание с FAP.

В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее:

- (а) первый Fab-фрагмент, который специфично связывается с FAP,
- (б) второй и третий Fab-фрагменты, которые специфично связываются с LTBR, и
- (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность

связывания антитела с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, где первый Fab-фрагмент, который специфично связывается с FAP, слит на своем N-конце с C-концом одной из субъединиц Fc-домена, а каждый из второго и третьего Fab-фрагментов, который специфично связывается с LTBR, слит на своем C-конце с N-концом одной из субъединиц Fc-домена.

Таким образом, представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, которое обеспечивает бивалентное связывание с LTBR и одновалентное связывание с FAP.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения представлен один или более выделенных полинуклеотидов, кодирующих агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее. В настоящем изобретении дополнительно представлен вектор, в частности, вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид по настоящему изобретению и клетку-хозяина, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии по настоящему изобретению. В некоторых аспектах клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, в частности, клетку млекопитающего. В другом аспекте представлен способ получения агонистического антитела к LTBR или биспецифического агонистического антитела к LTBR, как описано в данном документе ранее, включающий культивирование клетки-хозяина, как описано выше, в условиях, подходящих для экспрессии агонистического антитела к LTBR или биспецифического агонистического антитела к LTBR, и выделение агонистического антитела к LTBR или биспецифического агонистического антитела к LTBR. Настоящее изобретение также охватывает агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, полученное посредством способа по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении дополнительно представлена фармацевтическая композиция, содержащая агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном аспекте фармацевтическая композиция содержит дополнительное терапевтическое средство.

Настоящее изобретение также охватывает агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее, или фармацевтическую композицию, содержащую

биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, для применения в качестве лекарственного препарата.

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее, или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению для применения в (а) индуцировании активации ICAM на эндотелиальных клетках или фибробластах, ассоциированных с раком, или (б) усилении адгезии Т-клеток.

В конкретном аспекте представлено агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее, или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению для применения в лечении рака. В другом конкретном аспекте в настоящем изобретении представлено агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее, для применения в лечении рака, где агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR вводят в комбинации с химиотерапевтическим средством, лучевой терапией и/или другими средствами для применения в иммунотерапии рака. В одном аспекте агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе, предназначено для применения в лечении рака, где агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR предназначено для введения в комбинации со средством, блокирующим взаимодействие PD-L1/PD-1. В другом аспекте представлено агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее, или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению для применения для активации или продления активности цитотоксических Т-клеток.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении представлен способ ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества агонистического антитела к LTBR или биспецифического агонистического антитела к LTBR, как описано в данном документе ранее, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, для ингибирования роста опухолевых клеток. В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения или замедления развития рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного

количества агонистического антитела к LTBR или биспецифического агонистического антитела к LTBR, как описано в данном документе ранее, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

5 Также представлено применение биспецифической антигенсвязывающей молекулы, как описано в данном документе ранее, для производства лекарственного препарата для лечения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, в частности, для получения лекарственного препарата для лечения рака, а также способ лечения заболевания у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества
10 композиции, содержащей агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемой форме. В конкретном аспекте заболевание представляет собой рак. В любом из вышеприведенных аспектов индивидуум представляет собой млекопитающее, в частности, человека.

15 **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На **фиг. 1А-1Ж** показаны схематические представления рекомбинантных растворимых белков (рецепторов, лигандов и инструментальных белков), применяемых в качестве антигенов для фагового дисплея и иммунизации для получения антител к LTBR. На **фиг. 1А** показано схематическое представление
20 так называемого биотинилированного Fc-деплетирующего компонента (биотинилированного Fc-деплетирующего компонента kh NC avi, P1AA0981), который содержит Fc-домен «выступ во впадину» (kh), который используют в качестве средства предварительной очистки, чтобы избежать связывания клонов с Fc-доменом. На **фиг. 1Б** показано схематическое представление
25 одноцепочечного лимфотоксина $\alpha\beta 2$ человека avi his (P1AE1235). На **фиг. 1В** показано схематическое представление одноцепочечного лимфотоксина $\alpha\beta 2$ мыши avi his (P1AE1236). На **фиг. 1Г** показано схематическое представление мономерного эктодомена ECD hu LTBR (S28-M227) в виде биотинилированного Fc-слитого avi продукта (P1AE2835). На **фиг. 1Д** показано схематическое
30 представление мономерного эктодомена ECD muLTBR (S28-L223) в виде биотинилированного Fc-слитого avi продукта (P1AE4410). На **фиг. 1Е** показано схематическое представление мономерного эктодомена ECD LTBR яванского макака (S28-M227) в виде биотинилированного Fc-слитого avi продукта (P1AE4411). На **фиг. 1Ж** показано схематическое представление мономерного

N-концевого LTBR человека (полноразмерного ECD) в виде Fc-слитого huIgG1 kih HRYF avi продукта (P1AE1217).

На **фиг. 2А-2Е** показаны схематические представления дополнительных антигенов, применяемых для скрининга и характеристики клонов антител к LTBR и биспецифических антител к FAP-LTBR. На **фиг. 2А** показано схематическое представление биотинилированного димерного hu LTBR-Fc слитого продукта (P1AE2401). На **фиг. 2Б** показано схематическое представление ECD LTBR человека (S28-M227) с биотинилированным N- и C-концевым удлинением - Fc-слитым wt kih HRYF - Avi - His продуктом (P1AE7979). На **фиг. 2В** показано схематическое представление биотинилированного мономерного N-концевого LTBR яванского макака (полноразмерный ECD) hu IgG1 Fc-слитого kih HRYF avi продукта (P1AE2656). На **фиг. 2Г** показано схематическое представление димерного биотинилированного LTBR мыши-Fc-дисульфид-связанного гомодимера (P1AE2655). На **фиг. 2Д** показано схематическое представление биотинилированного FAP человека – Avi – His (P1AA5347). На **фиг. 2Е** показано схематическое представление биотинилированного FAP мыши – Avi – His (P1AD9907).

На **фиг. 3** показана идентификация клона Fab FAPltbr.P218.076 (P1AE5929 после преобразования IgG) в качестве перекрестно-реактивного антитела в сэндвич-ELISA, где определяли специфическое связывание с LTBR человека (P1AE2835) и LTBR мыши (P1AE4410). Антитело происходит из фагового дисплея. Fc-фрагмент человека (P1AA0981) использовали для подтверждения специфического связывания с LTBR и исключения связывания Fc, поскольку антигены, используемые в фаговом дисплее, представляли собой Fc-меченые слитые белки. Ось Y представляет OD₄₅₀₋₉₀₀.

На **фиг. 4** показано ингибирование взаимодействий LTBR-лимфотоксин $\alpha\beta 2$ антителами IgG к LTBR. Выбранные IgG к LTBR титровали в 3-кратных разведениях, начиная со 100 нМ (15 мкг/мл).

На **фиг. 5** показано ингибирование взаимодействий LTBR-LIGHT антителами IgG к LTBR. Выбранные IgG к LTBR титровали в 3-кратных разведениях, начиная со 100 нМ (15 мкг/мл).

На **фиг. 6** показаны результаты для различных IgG к LTBR в отсутствие или в присутствии сшивающего антитела (линкера), как определяют в

репортерном анализе HeLa NFκB luc, как описано в примере 1.7. Концентрацию IgG к LTBR определяют с помощью построение графиков против высвобождаемых световых единиц (RLU), как измеряют после инкубации и добавления раствора для обнаружения люциферазы.

5 **На фиг. 7** показаны результаты оценки связывания LTBR с клеточной поверхностью (FACS на рекомбинантных клетках CHO LTBR человека) для IgG к LTBR, представлены на графиках как медиана интенсивности флуоресценции в зависимости от концентрации. IgG к LTBR использовали в титровании с 3-кратными шагами разведения, начиная с 20 мкг/мл.

10 **На фиг. 8** показана тепловая карта связывания эпитопа на основе соответствующих значений связывания в процентах для 8 выбранных IgG к LTBR.

На фиг. 9А-9Д показаны схематические представления антител к LTBR и биспецифических антител к FAP-LTBR. **На фиг. 9А** показано схематическое изображение моноспецифического антитела к IgG1 PG LALA к LTBR человека. **На фиг. 9Б** показано схематическое представление биспецифического 1+1 антитела к LTBR/FAP в виде IgG1 PG LALA crossMab человека с перекрестно сшитыми V-доменами в плече Fab, направленном против LTBR, и зарядами в доменах CH1/Cκ плеча Fab, направленного против FAP. **На фиг. 9В** показано схематическое представление биспецифического антитела 1+1 к LTBR/FAP в виде IgG1 PG LALA crossMab с перекрестно сшитыми доменами CH1/Cκ в плече Fab, направленном против FAP. **На фиг. 9Г** показано схематическое представление 2+1 биспецифического антитела к LTBR/FAP в виде IgG1 PG LALA crossMab человека с перекрестно сшитыми доменами CH1/Cκ в плече Fab, направленным против FAP, и вторым фрагментом Fab, направленным против LTBR, слитым с С-концом Fc-домена. **На фиг. 9Д** показано схематическое представление 2+1 биспецифического антитела к LTBR/FAP в виде IgG1 PG LALA crossMab человека с перекрестно сшитыми V-доменами как в плечах Fab, направленных против LTBR, так и зарядах в доменах CH1/Cκ Fab-фрагмента, направленного против FAP, который слит с С-концом Fc-домена.

20
25
30

На фиг. 10 показано ингибирование взаимодействий LTBR-лимфотоксина α1β2 биспецифическими антителами к FAP/LTBR. Выбранные биспецифические антитела к FAP/LTBR титровали в 3-кратных разведениях, начиная со 100 нМ (15 мкг/мл).

На **фиг. 11** показано ингибирование взаимодействий LTBR-LIGHT биспецифическими антителами к FAP/LTBR. Выбранные биспецифические антитела к FAP/LTBR титровали в 3-кратных разведениях, начиная со 100 нМ (15 мкг/мл).

5 На **фиг. 12А** и **12Б** показаны схематические изображения суррогатных биспецифических антител FAP-LTBR мыши. На **фиг. 12А** показано схематическое представление 1+1 биспецифического антитела к LTBR/FAP в виде IgG1 DA PG crossMab мыши с перекрестно сшитыми V-доменами в плече Fab, направленном против FAP, и зарядами в доменах CH1/Ck плеча Fab,
10 направленного против ми LTBR. На **фиг. 12Б** показано схематическое представление 2+1 биспецифического антитела к LTBR/FAP в виде IgG1 DA PG crossMab мыши с зарядами в доменах CH1/Ck как Fab, направленных против LTBR, так и перекрестно сшитых доменах CH1/Ck в Fab-фрагменте, направленном против FAP, который слит с C-концом Fc-домена. На **фиг. 12В**
15 показано схематическое представление 2+1 биспецифического антитела к LTBR/нецелевой (DP47) в виде IgG1 DA PG crossMab мыши с зарядами в доменах CH1/Ck как Fab, направленных против LTBR, так и сшитых доменах CH1/Ck в нецелевом Fab-фрагменте (DP47), который слит с C-концом Fc-домена.

На **фиг. 13А-13Г** показано, что агонистические антитела к LTBR
20 активируют ICAM на эндотелиальных клетках перекрестно сшивающим зависимым образом. Показана медиана интенсивности флуоресценции ICAM на эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC), обработанных агонистическими антителами к LTBR человека в присутствии (**фиг. 13А** и **фиг. 13В**) или отсутствие (**фиг. 13Б** и **фиг. 13Г**) перекрестно сшивающего Fc антитела (сшивающего Fc средства). Данные нормализованы по отношению к
25 активности антитела к LTBR CBE11 (P1AE1873).

На **фиг. 14А-14Г** показано, что агонистические антитела к LTBR активируют ICAM на фибробластах, ассоциированных с раком (CAF), перекрестно сшивающим зависимым образом. Показана медиана интенсивности
30 флуоресценции ICAM на иммортализованных CAF, обработанных агонистическими антителами к LTBR человека в присутствии (**фиг. 14А** и **фиг. 14В**) или отсутствие (**фиг. 14Б** и **фиг. 14Г**) сшивающего Fc средства. Данные нормализованы по отношению к активности антитела к LTBR CBE11 (P1AE1873).

На **фиг. 15А-15Е** показано связывание биспецифических антигенсвязывающих молекул FAP-LTBR с LTBR человека (**фиг. 15А** и **фиг. 15Г**), яванского макака (**фиг. 15Б** и **фиг. 15Д**) и мыши (**фиг. 15В** и **фиг. 15Е**) на клетках CHO-K1, сконструированных для сверхэкспрессии LTBR человека, яванского макака или мыши. Показана медиана интенсивности флуоресценции вторичного антитела к Fc человека, обнаруживающего связанные биспецифические молекулы FAP-LTBR на клетках, сверхэкспрессирующих LTBR человека (**фиг. 15А** и **фиг. 15Г**), LTBR яванского макака (**Фиг. 15Б** и **фиг. 15Д**) или LTBR мыши (**фиг. 15В** и **фиг. 15Е**). Данные нормализованы по отношению к исходному уровню.

На **фиг. 16А-16Г** показано, что биспецифические антигенсвязывающие молекулы, направленные против FAP-LTBR, повышают уровень ICAM на фибробластах, ассоциированных с раком, FAP-зависимым образом. Показана медиана интенсивности флуоресценции ICAM на иммортализованных CAF, эндогенно экспрессирующих LTBR и FAP (**фиг. 16А** и **фиг. 16В**, hTERT CAF) или только экспрессирующих LTBR (**фиг. 16Б** и **фиг. 16Г**, hTERT CAFs_delFAP). Данные нормализованы по отношению к экспрессии ICAM необработанного контроля.

На **фиг. 17А-17Г** показано, что биспецифические молекулы, направленные против FAP-LTBR, активируют ICAM на эндотелиальных клетках FAP-зависимым образом. Показана медиана интенсивности флуоресценции ICAM на CD31⁺ HUVEC, кокультивируемых с клетками NIH-3Т3, сверхэкспрессирующими FAP (**фиг. 17А** и **фиг. 17В**) или клетками NIH-3Т3, лишенными экспрессии FAP (**фиг. 17Б** и **фиг. 17Г**). Данные нормализованы по отношению к экспрессии ICAM необработанного контроля, и значения EC₅₀ указаны в условных обозначениях.

На **фиг. 18А-18Е** показано, что биспецифические антигенсвязывающие молекулы, направленные против FAP-LTBR, индуцируют секрецию хемоаттрактантов эндотелиальными клетками FAP-зависимым образом. Концентрацию различных хемокинов (CXCL9, CXCL10 и CXCL11) измеряли посредством Bio-plex в супернатантах HUVEC, кокультивируемых с клетками NIH-3Т3, сверхэкспрессирующими FAP (**фиг. 18А**, **фиг. 18В** и **фиг. 18Д**) или клетками NIH-3Т3, лишенными экспрессии FAP (**фиг. 18Б**, **фиг. 18Г** и **фиг.**

18E), обработанными в течение 48 часов биспецифическими молекулами, направленными против FAP-LTBR.

На **фиг. 19** показано увеличение адгезии Т-клеток к эндотелию, стимулированному биспецифическими антигенсвязывающими молекулами, направленными против FAP-LTBR. Показана область меченых Т-клеток, прикрепленных к культурам HUVEC, которые стимулируют биспецифическими антителами к FAP-LTBR (2 нМ) в присутствии (полосы черного цвета) или в отсутствие (полосы белого цвета) FAP. TNF α (0,5 нг/мл) используют в качестве положительного контроля.

На **фиг. 20А** и **20Б** показано, что суррогатные молекулы биспецифического антитела к FAP-LTBR активируют молекулы адгезии на фибробластах мыши FAP-зависимым образом *in vitro*. Показана медиана интенсивности флуоресценции VCAM на клетках NIH-3T3 (**фиг. 20А**) или клетках NIH-3T3, сверхэкспрессирующих FAP (**фиг. 20Б**), обработанных суррогатными молекулами антитела к FAP-LTBR или агонистическим антителом к LTBR мыши (5G11). Данные нормализованы по отношению к исходной экспрессии VCAM необработанных контролей.

На **фиг. 21А** и **21Б** показано, что суррогатные молекулы биспецифического антитела к FAP-LTBR активируют молекулы адгезии на эндотелиальных клетках FAP-зависимым образом *in vitro*. Показана медиана интенсивности флуоресценции ICAM на CD31⁺ HUVEC, кокультивируемых с клетками NIH-3T3 (**фиг. 21А**) или клетками NIH-3T3, сверхэкспрессирующими FAP (**фиг. 21Б**).

На **фиг. 22** показан дизайн исследования *in vivo* на мышах для оценки безопасности, эффективности и фармакодинамического профиля биспецифических антител к FAP-LTBR отдельно или в комбинации с антителом к PD-L1 в подкожной модели опухоли MC38-hu CEA. Временная шкала описывает временные точки лечения и умерщвления, а в таблице описаны подробные сведения о группах обработки, дозировке и планировании этого исследования.

На **фиг. 23А** показано, что суррогатные молекулы, направленные против FAP-LTBR, ингибируют рост опухоли в модели подкожной опухоли MC38-huCEA при монотерапии и улучшают ответ на обработку aPD-L1. Кривые роста опухоли мышей, обработанных несущей средой, P1AF4664, P1AF4674, aPD-L1,

P1AF4664+aPD-L1 и P1AF4674+aPD-L1, представлены на графиках **на фиг. 23А**. Сравнение объемов опухоли в начале 12-дневной обработки показывает статистически значимый больший объем в группе несущей среды по сравнению с P1AF4764, в группе несущей среды по сравнению с P1AF4664+aPD-L1, в 5 группе несущей среды по сравнению с P1AF4674+aPD-L1 и в группе aPD-L1 по сравнению с P1AF4674+aPD-L1. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего Anova, критерия множественного сравнения Холма-Сидака (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (**фиг. 23Б**). Отдельные кривые роста опухоли 10 мышей, обработанных несущей средой, P1AF4664, P1AF4674, aPD-L1, P1AF4664+aPD-L1 и P1AF4674+aPD-L1, показаны на **фиг. 23В-23И**.

На **фиг. 24А** и **24Б** показано, что суррогатные молекулы, направленные против FAP-LTBR, способны индуцировать активацию эндотелиальных клеток в модели подкожной опухоли MC38-huCEA. Анализ методом проточной цитометрии опухолевых суспензий отдельных клеток проводили в день 9 и день 15 16 после начала лечения. Эндотелиальные клетки гейтировали в виде CD45-, huCEA-, CD31⁺ и подоплаин-, а медиану интенсивности флуоресценции для ICAM (**фиг. 24А** и **фиг. 24Б**) определяли количественно. Данные показывают, что обработка P1AF4664 и P1AF4674 увеличивает ICAM на опухолевых эндотелиальных клетках на протяжении всей обработки. Статистический анализ 20 проводили с помощью одностороннего Anova, критерия множественного сравнения Холма-Сидака (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

На **фиг. 25** показан дизайн исследования *in vivo* на мышах для оценки безопасности, эффективности и фармакодинамического профиля биспецифических антител к FAP-LTBR отдельно или в комбинации с антителом 25 к PD-L1 в подкожной модели опухоли KPC4662-huCEA. Временная шкала описывает временные точки лечения и умерщвления, а в таблице описаны подробные сведения о группах лечения, дозировке и графике этого протокола исследования KPC4662-huCEA.

На **фиг. 26А-26В** показано, что суррогатные молекулы, направленные 30 против FAP-LTBR, индуцируют образование наружных эндотелиальных венул в модели подкожной опухоли KPC4662-huCEA. В группах обработки регистрировали значимое увеличение Меса79-положительных кровеносных сосудов, как доли всех кровеносных сосудов, по сравнению с группой несущей среды. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего Anova,

критерия множественного сравнения Холма-Сидака (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) (**фиг. 26А**). Репрезентативное иммунофлуоресцентное окрашивание CD31 (все кровеносные сосуды) и Меса79 (HEV) в образце, обработанном P1AF4664, от дня 6 после начала обработки показано на **фиг. 26Б** и **фиг. 26В** соответственно.

На **фиг. 27** показан дизайн исследования *in vivo* на мышах для оценки безопасности, эффективности и фармакодинамического профиля биспецифических антигенсвязывающих молекул, направленных против LTBR, отдельно или в комбинации с антителом к PD-L1 в ортотопической модели опухоли EMT6. Временная шкала описывает временные точки лечения и умерщвления, а в таблице описаны подробные сведения о группах лечения, дозировке и графике этого протокола исследования EMT6. Несущая среда и суррогат биспецифические антигенсвязывающие молекулы, направленные против LTBR мыши, P1AG5459 и P1AG5461 (нецелевой контроль) вводили во все временные точки, указанные выше (д0, д2, д5, д7 и т.д.), если не указано иное. PDL1 вводили только во временные точки, обозначенные пустыми стрелками, если не указано иное.

На **фиг. 28А** и **28Б** показано, что суррогатные биспецифические антитела к FAP-LTBR мыши (P1AG5459) ингибируют рост опухоли в ортотопической модели опухоли EMT6 при монотерапии и улучшают ответ на обработку aPD-L1. Кривые роста опухоли (медиана) мышей, обработанных несущей средой, P1AG5459, P1AG5461, aPD-L1 и P1AG5459 + aPD-L1, представлены на графиках на **фиг. 28А**. Сравнение объемов опухоли через 22 дня после начала обработки представлено графике на **фиг. 28Б** и показан статистически значимый больший объем в группе несущей среды по сравнению с P1AG5459, в группе несущей среды по сравнению с группой P1AG5459+aPD-L1, в группе P1AG5459 по сравнению с P1AG5461 и в группе P1AG5461 по сравнению с группой P1AG5459+aPD-L1. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего Анова, критерия множественного сравнения Холма-Сидака (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

На **фиг. 29А-29В** показано, что суррогатное биспецифическое антитело к LTBR мыши P1AG5459 способно индуцировать активацию эндотелия и дифференцировку HEV FAP-зависимым образом в модели ортотопической опухоли EMT6. Анализ методом проточной цитометрии опухолевых суспензий

отдельных клеток проводили в день 13 после начала лечения. Эндотелиальные клетки гейтировали в виде CD45⁻, CD31⁺ и подопланин-, а медиану интенсивности флуоресценции для ICAM (**фиг. 29А**) и VCAM (**фиг. 29Б**) или % Meca79⁺ эндотелиальных клеток (**фиг. 29В**) определяли количественно. Данные показывают, что обработка P1AG5459 отдельно или в комбинации с aPD-L1, но не с нецелевым контролем P1AG5461, повышает содержание ICAM и VCAM на опухолевых эндотелиальных клетках и повышает частоту Meca79⁺ эндотелиальных клеток (**фиг. 29В**). Влияние на активацию эндотелия и дифференцировку HEV более выражено у мышей, отвечающих на обработку (□), чем у мышей, не отвечающих на обработку (●).

На **фиг. 30А** показано, что обработка P1AG5459 отдельно или в комбинации с aPD-L1, но не P1AG5461, повышает количество Meca79⁺ эндотелиальных клеток, количественно определенное посредством иммунофлуоресцентной визуализации в день 13 после начала обработки. На приведенном в качестве примера изображении показана локализация основной сосудистой сети (как показано окрашиванием CD31) и Meca79⁺ эндотелия.

На **фиг. 30Б, 30В** и **30Г** показана количественная оценка инфильтрации CD8 Т-клеток (**фиг. 30Б**), CD4 Т-клеток (**фиг. 30В**) и B220⁺ В-клеток (**фиг. 30Г**) в ортопическую опухоль EMT6, как измеряется посредством иммунофлуоресцентной визуализации в день 13 после начала обработки. P1AG5459 отдельно или в комбинации с aPD-L1, также aPD-L1 в определенной степени распространяется отдельно, но не P1AG5461 повышает количество Т- и В-клеток в опухоли. В случае монотерапии P1AG5459 четкая корреляция может наблюдаться у мышей, отвечающих на обработку (□), по сравнению с мышами, не отвечающими на обработку (●).

На **фиг. 31А-31В** показано, что суррогатное биспецифическое антитело к FAP-LTBR мыши (P1AG5459) индуцирует активацию хемокинов в модели ортопической опухоли EMT6. Концентрация хемокинов CXCL13 (**фиг. 31А**), CCL5 (**фиг. 31Б**) и CCL10 (**фиг. 31В**) измеряли в опухолевых лизатах, собранных в день 13 после начала обработки. Опухоли, обработанные P1AG5459, как правило, имеют более высокое количество CXCL13, CCL5 и CXCL10. Опухоли у отвечающих на обработку (□), как правило, демонстрируют более высокую концентрацию хемокинов.

На **фиг. 32А-32В** показано, что ингибирование роста опухоли, опосредованное суррогатным биспецифическим антителом к FAP-LTBR мыши (P1AG5459) в ортотопической опухолевой модели EMT6, опосредовано CD8, CD4 Т- и В-клетками. Кривые роста опухоли (медиана) представлены графике на **фиг. 32А**. Сравнение объемов опухолей в день 15 представлено на графике на **фиг. 32Б** и демонстрирует, что при отсутствии CD8 Т-клеток не наблюдается разницы в объеме опухоли при сравнении мышей, обработанных несущей средой, и мышей, обработанных P1AG5459. Сравнение объемов опухолей в день 20 представлено на графике на **фиг. 32В** и демонстрирует, что в отсутствие CD4 Т-клеток или CD20⁺ -экспрессирующих В-клеток при сравнении мышей, обработанных несущей средой, и мышей, обработанных P1AG5459, разницы в объеме опухоли не наблюдается.

На **фиг. 33** показаны репрезентативные иммунофлуоресцентные изображения ортотопических опухолей колоректального рака, обработанных несущей средой или суррогатом биспецифических антител к FAP-LTBR мыши (P1AG5459). Опухоль идентифицируют посредством окрашивания Ki67 в отношении пролиферирующих клеток, и граница опухоли отмечена пунктирной линией. CD31 обозначает кровеносные сосуды, pNAD/Меса79 обозначает наружные эндотелиальные венулы, а CD8 обозначает CD8 Т-клетки. Репрезентативные изображения показывают, что P1AG5459 индуцирует дифференцировку HEV и инфильтрацию CD8 в опухоли, но не в окружающей нормальной ткани толстой кишки.

На **фиг. 34** показано развитие третичной лимфоидной структуры (TLS) у мыши с ортотопическим CRC при обработке P1AG5459. Окрашивание Ki67 полного среза направляло идентификацию края опухоли, отмеченного пунктирной линией. Окрашивание B220 (В-клеток) полного среза выделяет агрегат В-клеток, который увеличен на последующих изображениях. Увеличение изображений более подробно характеризует клеточную композицию TLS, которая содержит pNAD/Меса79⁺ наружные эндотелиальные венулы, CD11c⁺ миелоидные клетки, B220⁺ Ki67⁺ пролиферирующие клетки, указывающие на зародышевый центр, CD8 и CD4 Т-клетки, некоторые из которых коэкспрессируют маркер активации PD1 и маркер стволовости TCF1.

На **фиг. 35А** и **35Б** сравнивают биспецифические антигенсвязывающие молекулы, направленные против FAP-LTBR, содержащие различные

антигенсвязывающие домены LTBR, в их способности повышать уровень ICAM на эндотелиальных клетках FAP-зависимым образом. Показана медиана интенсивности флуоресценции ICAM на CD31⁺ HUVEC, кокультивируемых с клетками NIH-3T3, сверхэкспрессирующими FAP (**фиг. 35А**), или клетками NIH-3T3, лишенными экспрессии FAP (**фиг. 35Б**). Данные нормализованы по отношению к экспрессии ICAM необработанного контроля.

На **фиг. 36А-36В** сравнивают биспецифические антигенсвязывающие молекулы, направленные против FAP-LTBR, содержащие различные антигенсвязывающие домены LTBR, в их способности связывать LTBR человека (**фиг. 36А**), яванского макака (**фиг. 36Б**) и LTBR мыши (**фиг. 36В**) на клетках СНО-К1, сконструированных для сверхэкспрессии LTBR человека, яванского макака или мыши. Показана медиана интенсивности флуоресценции вторичного антитела к Fc человека, обнаруживающего связанные биспецифические молекулы FAP-LTBR на клетках, сверхэкспрессирующих LTBR человека (**фиг. 36А**), LTBR яванского макака (**фиг. 36Б**) или LTBR мыши (**фиг. 36В**). Данные нормализованы по отношению к исходному уровню.

На **фиг. 37А-37Д** показаны схематические представления антитела IgG к LTBR и биспецифических антител к FAP-LTBR. На **фиг. 37А** показано схематическое изображение моноспецифического антитела к IgG1 PG LALA к LTBR (ВНА10, Р1АН0119) человека. На **фиг. 37Б** показано схематическое представление 2+1 биспецифического антитела к LTBR/FAP (4В9) в виде IgG1 PG LALA человека с 2 N-концевыми плечами Fab, специфичными для LTBR (СВЕ11), и С-концевыми доменами VL и VH, направленными против FAP, клона 4В9 (Р1АЕ1079). На **фиг. 37В** показано схематическое представление 1+1 биспецифического антитела к LTBR (ВНА10)/FAP (4В9) (Р1АН5884) в виде IgG1 PG LALA crossMab человека с перекрестно сшитыми доменами VL/VH в плече Fab, направленном против LTBR, и зарядами в доменах CH1/Ck плеча Fab, направленного против FAP. На **фиг. 37Г** показано схематическое представление 2+1 биспецифического антитела к LTBR (ВНА10)/FAP (4В9) (Р1АН5885) в виде IgG1 PG LALA crossMab человека с перекрестно сшитыми V-доменами в обоих плечах Fab, направленных против LTBR, и зарядами в доменах CH1/Ck Fab-фрагмента, направленными против FAP, который слит с С-концом домена Fc (цепь выступа Fc). На **фиг. 37Д** показано схематическое представление 2+1 биспецифического антитела к LTBR (Р1АЕ9459)/FAP (212) (Р1АН5886) в виде

IgG1 PG LALA crossMab человека с перекрестно сшитыми V-доменами в обоих плечах Fab, направленных против LTBR, и зарядами в доменах CH1/Ck фрагмента Fab, направленного против FAP, который слит с C-концом Fc-домена (цепь выступа Fc).

5 На **фиг. 38А-38Г** показаны карты разностей дейтерации между связанным LTBR человека по сравнению с не образующим комплекс LTBR. На карте
10 разности дейтераций показана первичная последовательность LTBR человека (P1АН2680) с разностью дейтераций между LTBR человека плюс антитело/лиганд по сравнению с LTBR без антитела/лиганда в течение пяти различных периодов мечения, составляющих 15 секунд, 1, 10, 60 и 300 минут. Столбцы над последовательностью демонстрируют пептиды. Поля указывают предлагаемые эпитопы для соответствующего антитела/лиганда. Ниже представленные эпитопы картированы (области черного цвета) на альфа-складчатую модель AF-P36941-F1-model_v2 S28 по отношению к M227.
15 Показаны предлагаемые эпитопы на LTBR человека для P1AE9459 (**фиг. 38А**), P1AE1873 (**фиг. 38Б**); P1АН0119 (**фиг. 38В**) и P1AE1235 (**фиг. 38Г**, лиганд).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

20 Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, обычно используемое в области, к которой принадлежит это изобретение. В целях интерпретации этого описания применимы нижеприведенные определения, и в тех случаях, когда это целесообразно, термины, используемые в единственном числе, также включают
25 множественное число и наоборот.

25 Используемые в данном документе термины «**антигенсвязывающая молекула**» или «**антитело**» используются взаимозаменяемо и относятся в самом широком смысле к молекуле, которая специфично связывает антигенную детерминанту. Примерами антигенсвязывающих молекул являются антитела, би-или мультиспецифические антитела, фрагменты антител и каркасные
30 антигенсвязывающие белки. Термин «**антитело**» в данном документе используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь этим, моноклональные антитела, поликлональные антитела, моноспецифические и мультиспецифические антитела

(например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они демонстрируют необходимую антигенсвязывающую активность.

Используемый в данном документе термин «**антигенсвязывающий домен, способный к специфическому связыванию с антигеном клетки-мишени**» или «фрагмент, способный к специфическому связыванию с антигеном клетки-мишени» относится к полипептидной молекуле, которая специфично связывается с антигенной детерминантой. В одном аспекте антигенсвязывающий домен способен активировать сигнализацию посредством антигена клетки-мишени. В конкретном аспекте антигенсвязывающий домен способен направлять объект, к которому он присоединен (например, агонистическое антитело к LTBR), на сайт-мишень, например, на конкретный тип опухолевой клетки или строму опухоли, несущие антигенную детерминанту. Антигенсвязывающие домены, способные к специфическому связыванию с антигеном клетки-мишени, включают антитела и их фрагменты, которые определены далее в данном документе. Кроме того, антигенсвязывающие домены, способные к специфическому связыванию с антигеном клетки-мишени, включают каркасные антигенсвязывающие белки, которые определены далее в данном документе, в основе которых лежат сконструированные повторяющиеся белки или сконструированные повторяющиеся домены (см., например, WO 2002/020565). В частности, антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с антигеном клетки-мишени, представляет собой антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с белком активации фибробластов (FAP). В отношении антитела или его фрагмента термин «антигенсвязывающий домен, способный к специфическому связыванию с антигеном клетки-мишени» относится к молекуле, которая содержит участок, который специфично связывается и является комплементарным с частью или со всем антигеном. Антигенсвязывающий домен, способный к специфическому связыванию антигена, может быть обеспечен, например, одним или более переменными доменами антитела (также называемыми переменными областями антитела). В частности, антигенсвязывающий домен, способный связывать специфический антиген, содержит переменную область легкой цепи антитела (VL) и переменную область тяжелой цепи антитела (VH) антитела. В другом аспекте «антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с антигеном

клетки-мишени», также может представлять собой Fab-фрагмент или фрагмент cross-Fab.

5 Термин «**моноклональное антитело**», как используется в данном документе, относится к антителу, полученному из популяции по сути
однородных антител, т.е. отдельные антитела, содержащие популяцию, являются
идентичными и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением
возможных вариантов антител, например, содержащих встречающиеся в природе
мутации или возникающие во время получения препарата моноклонального
10 антитела, причем такие варианты обычно присутствуют в незначительных
количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно
содержат разные антитела, направленные против разных детерминант
(эпитопов), каждое моноклональное антитело препарата моноклональных
антител направлено против одной детерминанты на антигене.

15 Термин «**моноспецифическое антитело**», как используется в данном документе, обозначает антитело, которое имеет один или более сайтов
связывания, каждый из которых связывается с одним и тем же эпитопом одного
и того же антигена. Термин «**биспецифический**» означает, что
антигенсвязывающая молекула способна к специфическому связыванию с по
меньшей мере двумя разными антигенными детерминантами. Как правило,
20 биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит два
антигенсвязывающих сайта, каждый из которых является специфическим в
отношении отличной антигенной детерминанты. В определенных вариантах
осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула способна
одновременно связывать две антигенные детерминанты, в частности, две
25 антигенные детерминанты, экспрессируемые на двух разных клетках.
Биспецифическая антигенсвязывающая молекула, как описано в данном
документе, также может образовывать часть мультиспецифического антитела.

30 Термин «**валентный**», как используется в контексте настоящей заявки, обозначает наличие конкретного числа сайтов связывания в
антигенсвязывающей молекуле, специфических в отношении одной отличной
антигенной детерминанты. Таким образом, термины «бивалентный»,
«тетравалентный» и «гексавалентный» обозначают наличие в
антигенсвязывающей молекуле двух сайтов связывания, четырех сайтов
связывания и шести сайтов связывания, специфических в отношении

определенной антигенной детерминанты, соответственно. В конкретных аспектах настоящего изобретения биспецифические антигенсвязывающие молекулы в соответствии с настоящим изобретением могут быть моновалентными в отношении определенной антигенной детерминанты, что означает, что они имеют только один сайт связывания для указанной антигенной детерминанты, или же они могут быть бивалентными или тетравалентными в отношении определенной антигенной детерминанты, что означает, что они имеют два сайта связывания или четыре сайта связывания, соответственно, для указанной антигенной детерминанты.

10 Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «цельное антитело» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, практически аналогичную структуре нативного антитела. **«Нативные антитела»** относятся к встречающимся в природе молекулам иммуноглобулинов с различной структурой. Например, нативные антитела класса IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины 15 массой приблизительно 150000 дальтон, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидными связями. В направлении от N- к C-концу каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область (VH), также называемую вариабельным тяжелым доменом или вариабельным доменом тяжелой цепи, за которой следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3), также называемые константной областью тяжелой цепи. Аналогично, от N- до C-конца каждая легкая цепь имеет вариабельную область (VL), также называемую вариабельным доменом легкой цепи или вариабельным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL), также называемый константной областью легкой цепи. Тяжелая цепь антитела может быть отнесена к одному из пяти типов, называемых α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) или μ (IgM), некоторые из которых могут быть дополнительно разделены на подтипы, например, γ_1 (IgG1), γ_2 (IgG2), γ_3 (IgG3), γ_4 (IgG4), α_1 (IgA1) и α_2 (IgA2). Легкая цепь антитела может быть отнесена к одному из двух типов, называемых 25 каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности ее константного домена.

30 **«Фрагмент антитела»** относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов

антител включают без ограничения Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела, триатела, тетрадела, фрагменты cross-Fab; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, scFv); и однодоменные антитела. Обзор некоторых фрагментов антител см. в Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Обзор фрагментов scFv см., например, в Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); также см. WO 93/16185 и патенты США №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение фрагментов Fab и F(ab')₂, содержащих остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации и имеющих увеличенное время полужизни *in vivo*, см. в патенте США № 5869046. Диатела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть бихвалентными или биспецифическими, см., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); и Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Триатела и тетрадела также описаны в Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (Domantis, Inc., Waltham, MA; см., например, патент США № 6248516 B1). Фрагменты антител можно получать с помощью ряда методик, включая без ограничения протеолитическое расщепление интактного антитела, а также выработку рекомбинантными клетками-хозяевами (например, *E. coli* или фага), как описано в данном документе.

Расщепление интактных антител папином позволяет получить два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab»-фрагментами, каждый из которых содержит переменные домены тяжелой и легкой цепи и также константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Таким образом, используемый в данном документе термин «**Fab**-фрагмент» относится к фрагменту антитела, содержащему фрагмент легкой цепи, содержащий VL-домен и константный домен легкой цепи (CL), и VH-домен и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков в карбоксиконце CH1-домена тяжелой цепи, включая один или более остатков цистеина из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляют собой Fab'-

фрагменты, в которых остаток(ки) цистеина константных доменов несет(ут) свободную тиольную группу. Обработка пепсином приводит к получению $F(ab')_2$ -фрагмента, который имеет два антигенсвязывающих сайта (два Fab-фрагмента) и часть Fc-области. В соответствии с настоящим изобретением термин «Fab-фрагмент» также включает «фрагменты cross-Fab» или «кроссоверные Fab-фрагменты», которые определены ниже.

Термин «**фрагмент cross-Fab**», или «xFab-фрагмент», или «кроссоверный Fab-фрагмент» относится к Fab-фрагменту, в котором переменные области или константные области тяжелой и легкой цепи поменяны. В биспецифических антителах по настоящему изобретению возможны и содержатся композиции с двумя разными цепями кроссоверной Fab-молекулы. С одной стороны, поменяны переменные области тяжелой и легкой цепи Fab, т.е. кроссоверная Fab-молекула содержит пептидную цепь, состоящую из переменной области легкой цепи (VL) и константной области тяжелой цепи (CH1), и пептидную цепь, состоящую из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области легкой цепи (CL). Эта кроссоверная Fab-молекула также называется CrossFab_(VLVH). С другой стороны, когда поменяны константные области тяжелой и легкой цепи Fab, кроссоверная Fab-молекула содержит пептидную цепь, состоящую из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области легкой цепи (CL), и пептидную цепь, состоящую из переменной области легкой цепи (VL) и константной области тяжелой цепи (CH1). Эта кроссоверная Fab-молекула также называется CrossFab_(CLCH1).

«Одноцепочечный Fab-фрагмент» или «**scFab**» представляет собой полипептид, состоящий из переменной домена тяжелой цепи антитела (VH), константного домена антитела 1 (CH1), переменной домена легкой цепи антитела (VL), константного домена легкой цепи антитела (CL) и линкера, причем указанные домены антитела и указанный линкер имеют один из следующих вариантов упорядочения в направлении от N-конца к C-концу: а) VH-CH1-линкер-VL-CL, б) VL-CL-линкер-VH-CH1, в) VH-CL-линкер-VL-CH1 или г) VL-CH1-линкер-VH-CL; и причем указанный линкер представляет собой полипептид из по меньшей мере 30 аминокислот, предпочтительно от 32 до 50 аминокислот. Указанные одноцепочечные Fab-фрагменты стабилизированы посредством естественной дисульфидной связи между доменом CL и доменом CH1. Кроме того, эти одноцепочечные Fab-молекулы можно дополнительно

стабилизировать путем создания межцепочечных дисульфидных связей посредством вставки остатков цистеина (например, в положении 44 в вариабельной области тяжелой цепи и положении 100 в вариабельной области легкой цепи в соответствии с нумерацией Kabat).

5 «Кроссоверный одноцепочечный Fab-фрагмент» или «**x-scFab**» представляет собой полипептид, состоящий из вариабельного домена тяжелой цепи антитела (V_H), константного домена антитела 1 (CH1), вариабельного домена легкой цепи антитела (V_L), константного домена легкой цепи антитела (CL) и линкера, причем указанные домены антитела и указанный линкер имеют
10 один из следующих вариантов упорядочения в направлении от N-конца к C-концу: а) V_H-CL-линкер-V_L-CH1 и б) V_L-CH1-линкер-V_H-CL; где V_H и V_L вместе образуют антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с антигеном, и при этом указанный линкер представляет собой полипептид из по
15 меньшей мере 30 аминокислот. Кроме того, эти x-scFab-молекулы можно дополнительно стабилизировать путем создания межцепочечных дисульфидных связей посредством вставки остатков цистеина (например, в положении 44 в вариабельной области тяжелой цепи и положении 100 в вариабельной области легкой цепи в соответствии с нумерацией Kabat).

«**Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv)**» представляет собой
20 слитый белок из вариабельных областей тяжелой (V_H) и легкой цепей (V_L) антитела, соединенный коротким линкерным пептидом из от десяти до приблизительно 25 аминокислот. Линкер обычно обогащен глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости, и может соединять N-конец V_H с C-концом V_L или наоборот. Этот белок сохраняет
25 специфичность исходного антитела, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Антитела на основе scFv, например, описаны в Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-96). Кроме того, фрагменты антител содержат одноцепочечные полипептиды, имеющие характеристики домена V_H, а именно способность собираться вместе с доменом V_L, или домена V_L, а именно
30 способность собираться вместе с доменом V_H с функциональным антигенсвязывающим сайтом и, таким образом, обеспечивать антигенсвязывающее свойство полноразмерных антител.

«**Каркасные антигенсвязывающие белки**» известны в данной области техники, например, фибронектин и сконструированные белки с анкириновыми

повторами (дарпины) использовали в качестве альтернативных каркасов для антигенсвязывающих доменов, смотрите, например, Gebauer and Skerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009) и Stumpp et al., Darpins: A new generation of protein therapeutics. *Drug Discovery Today* 13: 695-701 (2008). В одном аспекте настоящего изобретения каркасный антигенсвязывающий белок выбран из группы, состоящей из CTLA-4 (эвитело), липокалинов (антикалин), полученных из протеина А молекул, таких как Z-домен протеина А (аффитело), А-домена (авимер/макситело), сывороточного трансферрина (*транс*-тело); сконструированного белка с анкириновыми повторами (дарпин), переменного домена легкой цепи или тяжелой цепи антитела (однодоменное антитело, sdAb), переменного домена тяжелой цепи антитела (нанотело, aVH), фрагментов V_{NAR}, фибронектина (аднектин), лектинового домена С-типа (тетранектин); переменного домена бета-лактамазы нового антигенного рецептора (фрагменты V_{NAR}), человеческого гамма-кристаллина или убиквитина (молекулы аффилина); домена типа домена Куница ингибиторов протеазы человека, микротел, таких как белки семейства ноттина, пептидные аптамеры и фибронектин (аднектин). CTLA-4 (ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4) представляет собой рецептор семейства CD28, экспрессируемый преимущественно на CD4⁺ Т-клетках. Его внеклеточный домен имеет укладку, подобную переменному домену Ig. Петли, соответствующие CDR антител, могут быть замещены гетерологичной последовательностью для придания отличных связывающих свойств. Молекулы CTLA-4, сконструированные так, чтобы иметь разные варианты специфичности связывания, также известны как эвитела (например, US7166697B1). Эвитела имеют приблизительно такой же размер, что и выделенная переменная область антитела (например, доменного антитела). Дополнительные подробности см. в *Journal of Immunological Methods* 248 (1-2), 31-45 (2001). Липокалины представляют семейство внеклеточных белков, которые переносят небольшие гидрофобные молекулы, такие как стероиды, билины, ретиноиды и липиды. Они имеют жесткую бета-складчатую вторичную структуру с рядом петель в открытом конце конической структуры, которая может быть сконструирована так, чтобы связываться с разными целевыми антигенами. Размер антикалинов составляет 160-180 аминокислот, и они получены из липокалинов.

Дополнительные подробности смотрите в *Biochim Biophys Acta* 1482: 337-350 (2000), US7250297B1 и US20070224633. Аффитело представляет собой каркас, полученный из протеина А *Staphylococcus aureus*, который может быть сконструирован так, чтобы связывать антиген. Домен состоит из

5 трехспирального пучка приблизительно из 58 аминокислот. Путем рандомизации поверхностных остатков были созданы библиотеки. Дополнительные подробности см. в *Protein Eng. Des. Sel.* 2004, 17, 455-462 и EP 1641818A1. Авимеры представляют собой многодоменные белки, полученные из семейства А-доменных каркасов. Нативные домены приблизительно из 35 аминокислот

10 принимают определенную дисульфидно связанную структуру. Разнообразие создают путем перетасовки природной вариации, демонстрируемой семейством А-доменов. Дополнительные подробности см. в *Nature Biotechnology* 23(12), 1556 - 1561 (2005) and *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16(6), 909-917 (June 2007). Трансферрин представляет собой мономерный сывороточный

15 транспортный гликопротеин. Трансферрины могут быть сконструированы так, чтобы связывать разные антигены-мишени, путем вставки пептидных последовательностей в наружную петлю, доступную для встраивания. Примеры сконструированных трансферриновых каркасов включают транс-тело. Дополнительные подробности см. в *J. Biol. Chem* 274, 24066-24073 (1999).

20 Сконструированные белки с анкириновыми повторами (дарпины) получены из анкирина, который принадлежит семейству белков, которые опосредуют присоединение интегральных мембранных белков к цитоскелету. Один анкириновый повтор представляет собой мотив из 33 остатков, состоящий из двух альфа-спиралей и бета-изгиба. Их можно сконструировать так, чтобы они

25 связывали разные целевые антигены, путем рандомизации остатков в первой альфа-спирали и бета-изгибе каждого повтора. Их поверхность связывания можно увеличить за счет увеличения числа модулей (способ созревания аффинности). Дополнительные подробности см. в *J. Mol. Biol.* 332, 489-503 (2003), *PNAS* 100(4), 1700-1705 (2003) и *J. Mol. Biol.* 369, 1015-1028 (2007) и

30 US20040132028A1. Однодоменное антитело представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного переменного домена антитела. Первые однодоменные антитела были получены из переменного домена тяжелой цепи антитела верблюжьих (нанотела или фрагменты V_HH). Кроме того, термин однодоменное антитело включает автономный человеческий

вариабельный домен тяжелой цепи (aVN) или фрагменты V_{NAR} , полученные от акул. Фибронектин представляет собой каркас, который может быть сконструирован так, чтобы связывать антиген. Аднектины состоят из остова природной аминокислотной последовательности 10-го домена из 15
5 повторяющихся единиц фибронектина человека типа III (FN3). Три петли в одном конце бета-сандвича могут быть сконструированы так, чтобы аднектин мог специфически распознавать представляющую интерес терапевтическую мишень. Дополнительные подробности см. в Protein Eng. Des. Sel. 18, 435- 444 (2005), US20080139791, WO2005056764 и US6818418B1. Пептидные аптамеры
10 представляют собой комбинаторные молекулы распознавания, которые состоят из константного каркасного белка, как правило, тиоредоксина (TtxA), который содержит пространственно-ограниченную вариабельную пептидную петлю, вставленную в активном сайте. Дополнительные подробности см. в Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005). Микротела получены из микропротеинов
15 природного происхождения длиной 25-50 аминокислот, которые содержат 3-4 цистеиновых мостика; примеры микропротеинов включают KalataVI, конотоксин и ноттины. Микропротеины имеют петлю, которая может быть сконструирована так, чтобы содержать до 25 аминокислот, не влияя на общую укладку микропротеина. Дополнительные подробности в отношении сконструированных
20 доменов ноттинов см. в WO2008098796.

«Антитело, которое связывается с тем же эпитопом», что и эталонная молекула, относится к антигенсвязывающей молекуле, которая блокирует связывание эталонной молекулы с ее антигеном в конкурентном анализе на 50% или больше, и, наоборот, эталонная молекула блокирует связывание
25 антигенсвязывающей молекулы с ее антигеном в конкурентном анализе на 50% или больше. **«Антитело, которое не связывается с тем же эпитопом»**, что и эталонная молекула, относится к антигенсвязывающей молекуле, которая не блокирует связывание эталонной молекулы с ее антигеном в конкурентном анализе на 50% или больше, и, наоборот, эталонная молекула не блокирует
30 связывание антигенсвязывающей молекулы с ее антигеном в конкурентном анализе на 50% или больше.

Термин **«антигенсвязывающий домен»** или **«антигенсвязывающий сайт»** относится к части антитела, которая содержит область, которая специфично связывается и комплементарна части или всему антигену. Если антиген является

большим, антитело может связываться только с определенной частью антигена, которая называется эпитопом. Антигенсвязывающий домен можно обеспечить, например, одним или более переменными доменами (также называемыми переменными областями). Предпочтительно антигенсвязывающий домен
5 содержит переменную область легкой цепи антитела (VL) и переменную область тяжелой цепи антитела (VH).

Как используется в данном документе, термин **«антигенная детерминанта»** является синонимом с терминами «антиген» и «эпитоп» и относится к сайту (например, непрерывному участку из аминокислот или
10 конформационной конфигурации, состоящей из разных областей из не являющихся непрерывными аминокислот) на полипептидной макромолекуле, с которым связывается антигенсвязывающий фрагмент с образованием комплекса антигенсвязывающий фрагмент-антиген. Подходящие антигенные детерминанты могут находиться, например, на поверхности опухолевых клеток, на
15 поверхностях инфицированных вирусом клеток, на поверхностях других пораженных заболеванием клеток, на поверхности иммунных клеток, в свободном виде в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ECM). Белки, применимые в качестве антигенов в данном документе, могут представлять собой любую нативную форму белков из любого источника,
20 относящегося к позвоночным, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. В конкретном варианте осуществления антиген представляет собой человеческий белок. Когда в данном документе приводится ссылка на конкретный белок, этот термин включает «полноразмерный» непротесированный белок, а также любую
25 форму белка, которая является результатом процессинга в клетке. Этот термин также охватывает встречающиеся в природе варианты белка, например, сплайс-варианты или аллельные варианты.

Под выражением **«специфическое связывание»** подразумевается, что связывание является избирательным в отношении антигена и может быть
30 отделено от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Способность антигенсвязывающей молекулы связываться с конкретным антигеном можно определить с помощью ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) или других методик, известных специалисту в данной области техники, например, метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (с анализом на приборе

ВIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), и традиционных анализов связывания (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). В одном варианте осуществления степень связывания антигенсвязывающей молекулы с неродственным белком составляет менее чем приблизительно 10% связывания антигенсвязывающей молекулы с антигеном при измерении, например, посредством SPR. В определенных вариантах осуществления молекула, которая связывается с антигеном, имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или меньше, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

10 «**Аффинность**» или «аффинность связывания» относится к силе суммарных нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в данном документе термин «аффинность связывания» относится к присущей молекуле аффинности связывания, отражающему взаимодействию между членами пары связывающихся

15 компонентов (например, антителом и антигеном) при их соотношении 1:1. Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y в общем случае можно выразить константой диссоциации (K_d), которая представляет собой отношение констант диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on} соответственно). Таким образом, эквивалентные аффинности могут включать разные константы скорости при условии, что отношение между константами скорости остается одинаковым. Аффинность можно измерять с помощью общепринятых способов, известных в данной области техники, включая описанные в данном документе. Конкретным способом измерения аффинности является поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

20

25

30 Антитело с «**созревшей аффинностью**» относится к антителу с одним или более изменениями в одной или более гипервариабельных областях (HVR) по сравнению с исходным антителом, которое не содержит таких изменений, при этом такие изменения приводят к улучшению аффинности антитела в отношении антигена.

Термин «**антиген клетки-мишени**», используемый в данном документе, относится к антигенной детерминанте, представленной на поверхности клетки-мишени, в частности, клетки-мишени в опухоли, такой как раковая клетка или клетка стромы опухоли. Таким образом, антиген клетки-мишени является

опухолеассоциированным антигеном. В частности, «**опухолеассоциированный антиген**» или ТАА представляет собой белок активации фибробластов (FAP).

5 Термин «**белок активации фибробластов (FAP)**», также известный как FAP пролилэндопептидаза или сепраза (ЕС 3.4.21), относится к любому нативному FAP из любого источника, относящегося к позвоночным, включая
 10 млекопитающих, таких как приматы (например, люди), отличные от человека приматы (например, яванские макаки) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Этот термин охватывает «полноразмерный» непротессированный FAP, а также любую форму FAP, полученную в результате процессинга в клетке. Данный термин также включает встречающиеся в природе варианты FAP, например, сплайс-варианты или аллельные варианты. В одном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению способна к специфическому связыванию с FAP человека, мыши и/или яванского макака. Аминокислотная последовательность FAP человека
 15 приведена под номером доступа UniProt (www.uniprot.org) Q12884 (версия 149, SEQ ID NO:2) или NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2. Внеклеточный домен (ECD) FAP человека простирается от аминокислотного положения 26 до 760. Аминокислотная последовательность FAP человека, меченого Avi-His, показана в SEQ ID NO: 264. Аминокислотная
 20 последовательность FAP мыши приведена под номером доступа P97321 (версия 126, SEQ ID NO:282) или NCBI RefSeq NP_032012.1. Внеклеточный домен (ECD) FAP мыши простирается от аминокислотного положения 26 до 761. SEQ ID NO:265 показывает аминокислоту FAP мыши, меченого Avi-His. Предпочтительно связывающая молекула, направленная против FAP, по
 25 настоящему изобретению связывается с внеклеточным доменом FAP.

Термин «**вариабельная область**» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антигенсвязывающей молекулы с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела обычно
 30 имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три гипервариабельные области (HVR). См., например, Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности.

Термин «гипервариабельная область» или «HVR», как используется в данном документе, относится к каждой из областей переменного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности и которые определяют антигенсвязывающую специфичность, например, к «определяющим комплементарность областям» («CDR»).

В общем случае антитела содержат шесть CDR: три в VH (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три в VL (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Иллюстративные CDR в данном документе включают:

(а) гипервариабельные петли, находящиеся в аминокислотных остатках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(б) CDR, находящиеся в аминокислотных остатках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.* Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)); и

(в) антигенные контакты, находящиеся в аминокислотных остатках 27с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)).

Если не указано иное, CDR определены в соответствии с Kabat et al., выше. Специалисту в данной области техники известно, что отнесение CDR также можно определить в соответствии с Chothia, выше, McCallum, выше, или любой другой научно принятой системой номенклатуры.

«Каркасная область» или «FR» относится к остаткам переменного домена, отличным от определяющих комплементарность областей (CDR). FR переменного домена обычно состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности CDR и FR обычно находятся в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-CDR-H1(CDR-L1)-FR2- CDR-H2(CDR-L2)-FR3- CDR-H3(CDR-L3)-FR4.

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.

«Класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, которые содержит его тяжелая цепь. Существует пять основных

классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно подразделены на подклассы («изотипы»), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие разным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ соответственно.

5 «Гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из отличных от человеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В определенных вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит по сути все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по
10 по сути все HVR (например, CDR) соответствуют таковым из нечеловеческого антитела, а все или практически все FR соответствуют таковым из человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, полученную из человеческого антитела. «Гуманизированная форма» антитела, например,
15 нечеловеческого антитела, относится к антителу, подвергнутому гуманизации. Другие формы «гуманизированных антител», охватываемые настоящим изобретением, представляют собой те, в которых константная область была дополнительно модифицирована или изменена относительно исходного антитела для обеспечения свойств в соответствии с изобретением, в особенности в
20 отношении связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR).

Термин «**домен CH1**» обозначает часть полипептида тяжелой цепи антитела, которая простирается приблизительно от положения 118 по EU до положения 215 по EU (система нумерации EU в соответствии с Kabat). В одном аспекте домен CH1 имеет аминокислотную последовательность ASTKGPSVFP
25 LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKQV (SEQ ID NO: 283). Обычно сегмент, имеющий аминокислотную последовательность EPKSC (SEQ ID NO:284), следует за ним, чтобы связать домен CH1 с шарнирной областью, однако в случае домена CH1 со свободным C-концевым концом (например, во
30 фрагменте crossFab) этот сегмент может также содержать аминокислотную последовательность EPKSCD (SEQ ID NO:285) или EPKSCS (SEQ ID NO:286).

Термин «**шарнирная область**» обозначает часть полипептида тяжелой цепи антитела, которая соединяет в тяжелой цепи антитела дикого типа домен CH1 и домен CH2, например, от приблизительно положения 216 до

приблизительно положения 230 в соответствии с системой нумерации EU по Kabat или от приблизительно положения 226 до приблизительно положения 230 в соответствии с системой нумерации EU Kabat. Шарнирные области других подклассов IgG можно определить путем выравнивания с остатками цистеина шарнирной области последовательности подкласса IgG1. Шарнирная область обычно представляет собой димерную молекулу, состоящую из двух полипептидов с идентичной аминокислотной последовательностью. В общем случае шарнирная область содержит до 25 аминокислотных остатков и является гибкой, позволяя связанным с ней связывающим мишень сайтам двигаться независимо. Шарнирная область может быть подразделена на три домена: верхний, средний и нижний шарнирный домен (см., например, Roux, et al., J. Immunol. 161 (1998) 4083). В одном аспекте шарнирная область имеет аминокислотную последовательность DKTHTCPXCP (SEQ ID NO: 287), где X представляет собой либо S, либо P. В другом аспекте шарнирная область имеет аминокислотную последовательность HTCPXCP (SEQ ID NO: 288), где X представляет собой либо S, либо P. В одном аспекте шарнирная область имеет аминокислотную последовательность CPXCP (SEQ ID NO: 289), где X представляет собой либо S, либо P.

Термин «Fc-домен» или «**Fc-область**» используется в данном документе для определения C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Этот термин включает Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области. Fc-область IgG содержит домен CH2 IgG и домен CH3 IgG. «Домен CH2» Fc-области IgG человека обычно простирается от аминокислотного остатка приблизительно в положении 231 до аминокислотного остатка приблизительно в положении 340. (система нумерации EU в соответствии с Kabat). В одном аспекте домен CH2 имеет аминокислотную последовательность APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVWDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQUESTYRW SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAК (SEQ ID NO: 290). Домен CH2 является уникальным в том, что он не характеризуется близким спариванием с другим доменом. Точнее, две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами CH2 интактной нативной Fc-области. Было предположено, что этот углевод может заменять домен-доменное спаривание и помогать стабилизировать домен CH2. Burton, Mol.

Immunol. 22 (1985) 161-206. В одном варианте осуществления к CH2-домену присоединена углеводная цепь. Домен CH2 в данном документе может представлять собой домен CH2 с нативной последовательностью или вариант домена CH2. «CH3-домен» содержит участок из остатков, С-терминальных к домену CH2 в Fc-области (т.е. от аминокислотного остатка в приблизительно положении 341 до аминокислотного остатка в приблизительно положении 447 IgG согласно системе нумерации EU в соответствии с Kabat). В одном аспекте домен CH3 имеет аминокислотную последовательность GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO: 291). Область CH3 в данном документе может представлять собой нативный домен CH3 последовательности или вариант домена CH3 (например, домен CH3 с введенной «выпуклостью» («выступом») в одной его цепи и соответствующей введенной «полостью» («впадиной») в другой его цепи; см. патент США № 5821333, явно включенный в данный документ посредством ссылки). Такие варианты доменов CH3 можно использовать, чтобы стимулировать гетеродимеризацию двух неидентичных тяжелых цепей антитела, как описано в данном документе. В одном варианте осуществления Fc-область тяжелой цепи IgG человека простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксиконца тяжелой цепи. Однако С-концевой лизин (Lys447) Fc-области может присутствовать или может не присутствовать. Если в данном документе не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой EU-индексом, как это описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Термин **«Fc-домен дикого типа»** обозначает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-домена, встречающейся в природе. Fc-домены дикого типа включают нативную Fc-область IgG1 человека (аллотипы не-А и А); нативную Fc-область IgG2 человека; нативную Fc-область IgG3 человека; и нативную Fc-область IgG4 человека, а также их встречающиеся в природе варианты. Fc-области дикого типа обозначены в SEQ ID NO: 155 (IgG1, европейский аллотип), SEQ ID NO: 156 (IgG1, афроамериканский аллотип), SEQ ID NO: 157 (IgG2), SEQ ID NO: 158 (IgG3) и SEQ ID NO: 159 (IgG4). Термин **«вариант Fc-домена (человека)»**

обозначает аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности Fc-домена (человека) «дикого типа» за счет по меньшей мере одной «аминокислотной мутации». В одном аспекте вариант Fc-области имеет по меньшей мере одну аминокислотную мутацию по сравнению с нативной Fc-областью, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных мутаций, и в одном аспекте от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных мутаций в нативной Fc-области. В одном аспекте (вариант) Fc-область имеет по меньшей мере приблизительно 95% гомологии с Fc-областью дикого типа.

10 Технология «**выступ-во-впадину**» описана, например, в US 5731168; US 7695936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) и Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Как правило, этот способ включает внесение выпуклости («выступа») на поверхности контакта первого полипептида и соответствующей полости («впадины») на поверхности контакта второго полипептида, так, чтобы выпуклость могла располагаться в полости, чтобы способствовать образованию гетеродимера и затруднять образование гомодимера. Выпуклости конструируют путем замещения небольших боковых цепей аминокислот на поверхности контакта первого полипептида более крупными боковыми цепями (например, тирозина или триптофана). Компенсирующие полости идентичного или сходного размера с выпуклостями создают на поверхности контакта второго полипептида путем замены крупных боковых цепей аминокислот на более мелкие (например аланина или треонина). Выпуклость и полость можно создавать путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, например, с помощью сайт-специфического мутагенеза, или путем пептидного синтеза. В конкретном варианте осуществления модификация выступа включает аминокислотную замену T366W в одной из двух субъединиц Fc-домена, а модификация впадины включает аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V в другой из двух субъединиц Fc-домена. В дополнительном конкретном варианте осуществления субъединица Fc-домена, содержащая модификацию выступа, дополнительно содержит аминокислотную замену S354C, а субъединица Fc-домена, содержащая модификацию впадины, дополнительно содержит аминокислотную замену Y349C. Внесение этих двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами Fc-области, таким

образом, дополнительно стабилизируя димер (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Предполагается, что «область, эквивалентная Fc-области иммуноглобулина» включает встречающиеся в природе аллельные варианты Fc-области иммуноглобулина, а также варианты, имеющие изменения, которые соответствуют заменам, добавлениям или делециям, но которые практически не снижают способность иммуноглобулина опосредовать эффекторные функции (такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность). Например, из N-конца или C-конца Fc-области иммуноглобулина могут быть удалены одна или более аминокислот практически без утраты биологической функции. Такие варианты могут быть выбраны в соответствии с общими правилами, известными в данной области техники, чтобы оказывать минимальное влияние на активность (см., например, Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-10 (1990)).

Термин «**эффекторная функция**» относится к видам биологической активности, характерным для Fc-области антитела, которые варьируются в зависимости от изоформа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание Fc-рецептора, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), секрецию цитокинов, опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора) и активацию B-клеток.

Эффекторные функции связывания Fc-рецептора могут быть опосредованы взаимодействием Fc-области антитела с Fc-рецепторами (FcR), которые представляют собой специализированные рецепторы клеточной поверхности на гемопозитических клетках. Fc-рецепторы принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов, и было показано, что они опосредуют как удаление покрытых антителами патогенов посредством фагоцитоза иммунных комплексов, так и лизис эритроцитов и различных других клеточных мишеней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующими антителами, посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) (см., например, Van de Winkel, J.G. and Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524). FcR определяют по их специфичности в отношении изоформ

иммуноглобулина: Fc-рецепторы для антител IgG называются FcγR. Связывание с Fc-рецептором описано, например, в Ravetch, J.V. и Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492, Capel, P.J., et al., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M., et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; и Gessner, J.E., et al., *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248.

Перекрестное сшивание рецепторов к Fc-области антител IgG (FcγR) стимулирует широкий ряд эффекторных функций, включая фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность и высвобождение воспалительных медиаторов, а также выведение иммунных комплексов и регуляцию выработки антител. У людей были описаны три класса FcγR, которые представляют собой:

- FcγRI (CD64) связывает мономерный IgG с высокой аффинностью и экспрессируется на макрофагах, моноцитах, нейтрофилах и эозинофилах. Модификация Fc-области IgG по меньшей мере в одном из аминокислотных остатков E233-G236, P238, D265, N297, A327 и P329 (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat) снижает связывание с FcγRI. Остатки IgG2 в положениях 233-236, замещенные на IgG1 и IgG4, снижали связывание с FcγRI в 10^3 раз и устраняли реакцию моноцитов человека на сенсibilизированные антителом эритроциты (Armour, K.L., et al., *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613–2624).

-FcγRII (CD32) связывает образующий комплекс IgG со средней или низкой аффинностью и экспрессируется повсеместно. Этот рецептор можно разделить на два подтипа, FcγRIIA и FcγRIIB. FcγRIIA встречается на многих клетках, участвующих в уничтожении (например, макрофагах, моноцитах, нейтрофилах) и, похоже, способен активировать процесс уничтожения. FcγRIIB, похоже, играет роль в процессе ингибирования и встречается на В-клетках, макрофагах и на тучных клетках и эозинофилах. В случае В-клеток его функция, по-видимому, состоит в подавлении дальнейшей выработки иммуноглобулина и переключении изотипа, например, на класс IgE. В случае макрофагов действие FcγRIIB состоит в ингибировании фагоцитоза, опосредованного FcγRIIA. В случае эозинофилов и тучных клеток В-форма может способствовать подавлению активации этих клеток посредством связывания IgE с отдельным рецептором. Пониженное связывание с FcγRIIA обнаружено, например, для антител, содержащих Fc-область IgG с мутациями по меньшей мере в одном из

аминокислотных остатков E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 и K414 (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

- FcγRIII (CD16) связывает IgG со средней или низкой аффинностью и существует в виде двух типов. FcγRIIIA встречается на NK-клетках, макрофагах, эозинофилах, и некоторых моноцитах и T-клетках и опосредует ADCC. FcγRIIIB на высоком уровне экспрессируется на нейтрофилах. Сниженное связывание с FcγRIIIA встречается, например, у антител, содержащих Fc-область IgG с мутациями по меньшей мере в одном из аминокислотных остатков E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 и D376 (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

Картирование сайтов связывания Fc-рецепторов на IgG1 человека, вышеупомянутые сайты мутаций и способы измерения связывания с FcγRI и FcγRIIA описаны в Shields, R.L., et al. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604.

Термин «ADCC» или «антителозависимая клеточная цитотоксичность» обозначает функцию, опосредованную связыванием Fc-рецептора, и относится к лизису целевых клеток антителом, описанным в данном документе, в присутствии эффекторных клеток. Способность антитела индуцировать начальные шаги опосредования ADCC исследуют путем измерения их связывания с экспрессирующими Fcγ-рецепторы клетками, такими как клетки, рекомбинантно экспрессирующие FcγRI и/или FcγRIIA, или NK-клетки (экспрессирующие преимущественно FcγRIIIA). В частности, измеряют связывание с FcγR на NK-клетках.

«Активирующий Fc-рецептор» представляет собой Fc-рецептор, который после связывания Fc-областью антитела вызывает сигнальные события, которые стимулируют несущие рецепторы клетки осуществлять эффекторные функции. Активирующие Fc-рецепторы включают FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) и FcαRI (CD89). Конкретным активирующим Fc-рецептором является FcγRIIIa человека (см. номер доступа в UniProt P08637, версия 141).

Термин «LTBR», используемый в данном документе, относится к любому нативному рецептору лимфотоксина-бета (LTBR) из любого источника позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Этот термин охватывает «полноразмерный» непротессированный LTBR, а также любую

форму LTBR, полученную в результате процессинга в клетке. Данный термин также включает встречающиеся в природе варианты LTBR, например, сплайс-варианты или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность иллюстративного LTBR человека представлена в SEQ ID NO:1 (№ P36941 в Uniprot), а аминокислотная последовательность иллюстративного LTBR мыши представлена в SEQ ID NO: 297 (№ B2RRV3 в Uniprot). Рецептор экспрессируется на поверхности клеток в паренхиме и строме большинства лимфоидных органов, но отсутствует на Т- и В-лимфоцитах. LTBR также можно обозначать «представителем 3 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли» (TNFRSF3). Передача сигналов посердившим LTBR с помощью гетеротримера $LT\alpha/\beta$ ($LT\alpha1\beta2$) важна во время лимфоидного развития. Известно также, что LTBR связывает лиганд LIGHT (TNFSF14). В то время как $LT\alpha1\beta2$ специфичен для LTBR, LIGHT также связывается и активирует HVEM (TNFRSF14), рецептор, экспрессируемый и вовлеченный в регуляцию иммунных клеток.

Термин «**агонист LTBR**», как используется в данном документе, включает любой фрагмент, который агонизирует взаимодействие LTBR с его лигандом. LTBR, как используется в данном контексте, предпочтительно относится к LTBR человека, таким образом, агонист LTBR предпочтительно является агонистом LTBR человека (SEQ ID NO:1). Как правило, фрагмент будет представлять собой агонистическое антитело к LTBR или фрагмент антитела.

Термины «**антитело к LTBR**», «антитело против LTBR», «антитело, направленное LTBR» и «антитело, которое специфично связывается с LTBR» относятся к антителу, которое специфично связывается с LTBR с достаточной аффинностью, так что антитело является применимым в качестве диагностического и/или терапевтического средства для нацеливания на LTBR. В одном аспекте степень связывания антитела к LTBR с неродственным отличным от LTBR белком составляет менее чем приблизительно 10% связывания антитела с LTBR, как измеряется, например, посредством радиоиммуноанализа (RIA) или проточной цитометрии (FACS). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с LTBR, имеет константу диссоциации (K_D) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-6} М или меньше, например, от 10^{-68} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-8} М до 10^{-10} М).

Термин **«пептидный линкер»** относится к пептиду, содержащему одну или более аминокислот, обычно от приблизительно 2 до 20 аминокислот. Пептидные линкеры известны в данной области техники или описаны в данном документе. Подходящими неиммуногенными линкерными пептидами являются, например, пептидные линкеры $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ или $G_4(SG_4)_n$, «n» в общем случае представляет собой число от 1 и 10, как правило, от 2 до 4, в частности 2, т. е. пептиды, выбранные из группы, состоящей из GGGGS (SEQ ID NO:298), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:299), SGGGSGGGG (SEQ ID NO:300) и GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO:301), но также включают последовательности GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:302), $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:303), $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:304), GSGSGSGS (SEQ ID NO:305), GSGSGNGS (SEQ ID NO:306), GSGSGSG (SEQ ID NO:307), GGSGSG (SEQ ID NO:308), GGSG (SEQ ID NO:309), GGSGNGSG (SEQ ID NO:310), GGNGSGSG (SEQ ID NO:311) и GGNGSG (SEQ ID NO:312). Особенный интерес представляют пептидные линкеры (G_4S) (SEQ ID NO:298), $(G_4S)_2$ или GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:299), $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:303) и $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:304).

Термин **«аминокислота»**, используемый в данном документе, обозначает группу встречающихся в природе карбокси α -аминокислот, содержащих аланин (трехбуквенный код: ala, однобуквенный код: A), аргинин (arg, R), аспарагин (asn, N), аспарагиновую кислоту (asp, D), цистеин (cys, C), глутамин (gln, Q), глутаминовую кислоту (glu, E), 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).

Под **«слитым»** или **«соединенным»** подразумевается, что компоненты (например, тяжелая цепь антитела и Fab-фрагмент) связаны пептидными связями, как напрямую, так и посредством одного или более пептидных линкеров.

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» в отношении последовательности эталонного полипептида (белка) определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в последовательности эталонного полипептида, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности

последовательности, и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательности и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательности для целей выравнивания. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) или программный пакет FASTA. Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. В качестве альтернативы значения процента идентичности можно получить с помощью компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана Genentech, Inc., а исходный код был подан вместе с пользовательской документацией в Бюро регистрации авторских прав США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где он зарегистрирован под номером регистрации авторского права США TXU510087 и описан в WO 2001/007611. Если не указано иное, в целях данного документа значения процента идентичности аминокислотной последовательности получают с использованием программы ggsearch из пакета FASTA версии 36.3.8c или более поздней с матрицей сравнения BLOSUM50. Программный пакет FASTA был создан W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227- 258; и Pearson et. al. (1997), Genomics 46:24-36 и находится в открытом доступе на www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml или www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta. В качестве альтернативы публичный сервер, доступный на fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi, можно использовать для сравнения последовательностей, используя программу ggsearch (global protein:protein) и параметры по умолчанию (BLOSUM50; открытие: -10; продление: -2; Ktup = 2) для обеспечения выполнения общего, а не местного,

выравнивания. Процент идентичности аминокислот дан в заголовке выходных данных выравнивания.

В определенных вариантах осуществления предусмотрены **варианты аминокислотной последовательности** биспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в данном документе. Например, может существовать необходимость в улучшении аффинности связывания и/или других биологических свойств антигенсвязывающих молекул, содержащих тример лиганда TNF. Варианты аминокислотной последовательности антигенсвязывающих молекул, содержащих тример лиганда TNF, можно получать посредством внесения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулы, или посредством пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечной конструкции можно осуществлять любую комбинацию делеций, вставок и замен при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, связывания антигена. Сайты, представляющие интерес для заместительного мутагенеза, включают HVR и каркасные области (FR). Консервативные замены приведены в таблице Б под заголовком «Предпочтительные замены» и дополнительно описаны ниже в отношении классов боковых цепей аминокислот от (1) до (6). Аминокислотные замены можно вносить в молекулу, представляющую интерес, и проводить скрининг продуктов в отношении необходимой активности, например, сохранения/улучшения связывания антигена, снижения иммуногенности или улучшения ADCC или CDC.

25 ТАБЛИЦА А

Исходный остаток	Примеры замен	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn

Исходный остаток	Примеры замен	Предпочтительные замены
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Аминокислоты можно разделить на группы в соответствии с общими свойствами боковых цепей:

- 5 (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

10 Неконсервативные замены повлекут за собой замену члена одного из этих классов другим классом.

Термин «**варианты аминокислотной последовательности**» включает заместительные варианты, в которых аминокислотные замены присутствуют в одном или более остатках гипервариабельной области исходной

антигенсвязывающей молекулы (например, гуманизированное или человеческое антитело). В общем случае полученные в результате варианты, отобранные для дополнительного исследования, имеют модификации (например, улучшение) определенных биологических свойств (например, повышенную аффинность, сниженную иммуногенность) по сравнению с родительской антигенсвязывающей молекулой и/или в значительной степени сохраняют определенные биологические свойства исходной антигенсвязывающей молекулы. Иллюстративный заместительный вариант представляет собой антитело с созревшей аффинностью, которое удобно получать, например, используя методики созревания аффинности на основе фагового дисплея, такие как описанные в данном документе. Вкратце, один или более остатков CDR подвергают мутации, а варианты антигенсвязывающие молекулы отображают на поверхности фага и проводят их скрининг в отношении конкретного вида биологической активности (например, аффинности связывания). В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции могут происходить в одной или более HVR, если такие изменения существенно не снижают способность антигенсвязывающей молекулы связывать антиген. Например, в CDR можно проводить консервативные изменения (например, консервативные замены, представленные в данном документе), которые в значительной степени не снижают аффинность связывания. Подходящий способ идентификации остатков или областей антитела, которые могут быть нацелены на мутагенез, называется «аланиновым сканирующим мутагенезом», как описано в Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. В этом способе идентифицируют аминокислотный остаток или группу целевых аминокислотных остатков (например, заряженные аминокислотные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) для определения, повлияло ли это на взаимодействие антитела с антигеном. Дополнительные замены можно вносить в аминокислотные положения, демонстрирующие функциональную чувствительность к исходным заменам. В качестве альтернативы или в качестве дополнения используют кристаллическую структуру комплекса антиген-антигенсвязывающая молекула, чтобы идентифицировать точки контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки можно использовать для нацеливания

или удалять из кандидатов для замены. Можно проводить скрининг вариантов, чтобы определить, имеют ли они необходимые свойства.

Вставки аминокислотных последовательностей включают amino- и/или карбоксиконцевые слияния с диапазоном длины от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или некоторого количества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению с N-концевым остатком метионила. Другие инсерционные варианты молекулы включают слияние N- или C-конца антитела полипептидом, который увеличивает время полужизни биспецифических антигенсвязывающих молекул в сыворотке крови.

В некоторых аспектах биспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в данном документе, изменяют для увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Варианты молекул по гликозилированию удобно получать, изменяя аминокислотную последовательность так, чтобы создать или удалить один или более сайтов гликозилирования. Если антигенсвязывающая молекула, содержащая тример лиганда TNF, содержит Fc-область, можно изменять присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный биантеннарный олигосахарид, который обычно присоединен посредством N-связи к Asn297 домена CH2 Fc-области. См., например, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Олигосахарид может содержать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в «стебле» биантеннарной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления модификации олигосахарида в антигенсвязывающей молекуле, содержащей тример лиганда семейства TNF, можно осуществлять с целью создания вариантов с определенными улучшенными свойствами. В одном аспекте представлены варианты биспецифических антигенсвязывающих молекул или антител по настоящему изобретению, имеющие углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или непрямо) к Fc-области. Такие варианты по фукозилированию могут иметь улучшенную функцию ADCC, см., например, публикации патентов США №№ US 2003/0157108 (Presta, L.) или US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). В другом аспекте представлены

варианты биспецифических антигенсвязывающих молекул или антител по настоящему изобретению с разделенными олигосахаридами, например, в которых биантенарный олигосахарид, присоединенный к Fc-области, разделен надвое GlcNAc. Такие варианты могут иметь сниженное фукозилирование и/или улучшенную функцию ADCC., см., например, WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патент США № 6602684 (Umana et al.); и US 2005/0123546 (Umana et al.). Также представлены варианты с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию CDC и описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); и WO 1999/22764 (Raju, S.).

В определенных аспектах может быть желательно создавать цистеин-сконструированные варианты биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, например, «thioMAb» в которых один или более остатков молекулы замещены остатками цистеина. В конкретных аспектах замещенные остатки находятся в доступных сайтах молекулы. За счет замены этих остатков цистеином реакционноспособные тиольные группы располагаются в доступных сайтах антитела и могут быть использованы для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как лекарственные фрагменты или фрагменты линкер-лекарственное средство, для создания иммуноконъюгата. В определенных аспектах цистеином может быть замещен любой из следующих остатков: V205 (нумерация Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и S400 (нумерация EU) Fc-области тяжелой цепи. Цистеин-сконструированные антигенсвязывающие молекулы можно создавать, как описано, например, в патенте США № 7521541.

Термин «нуклеиновая кислота» или «**полинуклеотид**» включает любое соединение и/или вещество, которое содержит полимер из нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из основания, в частности, пуринового или пиримидинового основания (т.е. цитозина (C), гуанина (G), аденина (A), тимина (T) или урацила (U)), сахара (т.е. дезоксирибозы или рибозы) и фосфатной группы. Часто молекула нуклеиновой кислоты описана по последовательности оснований, при этом указанные основания представляют первичную структуру (линейную структуру) молекулы нуклеиновой кислоты. Последовательность оснований, как правило, представлена от 5' к 3'. В данном документе термин молекула нуклеиновой кислоты охватывает дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК),

включая, например, комплементарную ДНК (кДНК) и геномную ДНК, рибонуклеиновую кислоту (РНК), в частности матричную РНК (мРНК), синтетические формы ДНК или РНК и смешанные полимеры, содержащие две или более из этих молекул. Молекула нуклеиновой кислоты может быть

5 линейной или кольцевой. Кроме того, термин молекула нуклеиновой кислоты включает как смысловые, так и бессмысловые нити, а также однонитевые и двухнитевые формы. Помимо этого, описанная в данном документе молекула нуклеиновой кислоты может содержать встречающиеся в природе и не

10 встречающиеся в природе нуклеотиды. Примеры не встречающихся в природе нуклеотидов включают модифицированные нуклеотидные основания с дериватизированными сахарами, или фосфатными остовными связями, или химически модифицированными остатками. Молекулы нуклеиновых кислот также включают молекулы ДНК и РНК, подходящие в качестве вектора для

15 прямой экспрессии антитела по изобретению *in vitro* и/или *in vivo*, например, в организме-хозяине или организме пациента. Такие ДНК (например, кДНК)- или РНК (например, мРНК)-векторы могут быть немодифицированными или модифицированными. Например, мРНК может быть химически модифицирована для повышения стабильности РНК-вектора и/или экспрессии кодируемой молекулы так, чтобы мРНК можно было вводить субъекту для получения

20 антител *in vivo* (см., например, Stadler et al, Nature Medicine 2017, опубликованная онлайн 12 июня 2017 г., doi:10.1038/nm.4356 или EP 2101823 B1).

«**Выделенная**» нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонента ее естественного окружения.

25 Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат эту молекулу нуклеиновой кислоты, но при этом молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в хромосомном положении, которое отличается от ее природного хромосомного положения.

30 «**Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическую антигенсвязывающую молекулу или антитело**» относится к одной или более молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим тяжелые и легкие цепи (или их фрагменты) биспецифической антигенсвязывающей молекулы или антитела, включая такие молекулы нуклеиновых кислот в одном векторе или отдельных

векторах и такие молекулы нуклеиновых кислот, присутствующие в одной или более локациях в клетке-хозяине.

Под нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, имеющими нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере, например, 95% «идентичную» эталонной последовательности по настоящему изобретению, 5 подразумевается, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична эталонной последовательности за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной нуклеотидной 10 последовательности. Другими словами, чтобы получить полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную эталонной нуклеотидной последовательности, до 5% нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими нуклеотидами или в эталонную последовательность может быть вставлено число 15 нуклеотидов, составляющее до 5% от общего числа нуклеотидов в эталонной последовательности. Эти изменения эталонной последовательности могут находиться в 5' или 3' концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, размещаясь по отдельности между остатками в эталонной последовательности 20 или одной или более непрерывными группами в эталонной последовательности. На практике определение того, что любая конкретная полинуклеотидная последовательность является на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению, можно осуществлять традиционным способом, 25 используя известные компьютерные программы, такие как те, которые обсуждаются выше для полипептидов (например, ALIGN-2).

Термин «**кассета экспрессии**» относится к полинуклеотиду, созданному рекомбинантным или синтетическим способом, с рядом определенных элементов нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают возможность транскрипции 30 конкретной нуклеиновой кислоты в клетке-мишени. Рекомбинантная кассета экспрессии может быть включена в плазмиду, хромосому, митохондриальную ДНК, пластидную ДНК, вирус или фрагмент нуклеиновой кислоты. Как правило, рекомбинантная кассета экспрессии, как часть вектора экспрессии, содержит, помимо других последовательностей, последовательность нуклеиновой кислоты,

предназначенную для транскрипции, и промотор. В определенных вариантах осуществления кассета экспрессии по настоящему изобретению содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению или их фрагменты.

5 Термин «**вектор**» или «вектор экспрессии» является синонимом «экспрессионной конструкции» и относится к молекуле ДНК, которая используется для введения и направления экспрессии конкретного гена, с которым он функционально связан в клетке-мишени. Этот термин включает вектор в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также
10 вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую его внесли. Вектор экспрессии по настоящему изобретению содержит кассету экспрессии. Векторы экспрессии делают возможной транскрипцию больших количеств стабильной мРНК. После того, как вектор экспрессии оказывается в клетке-мишени, клеточный аппарат транскрипции и/или трансляции продуцирует молекулу
15 рибонуклеиновой кислоты или белок, кодируемые геном. В одном варианте осуществления вектор экспрессии по настоящему изобретению содержит кассету экспрессии, которая содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению или их фрагменты.

20 Термины «**клетка-хозяин**», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была внесена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформантов» и «трансформированные клетки», которые включают первично трансформированные клетки и полученное от них
25 потомство вне зависимости от числа пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным исходной клетке по содержанию нуклеиновой кислоты и может содержать мутации. В данный документ включено мутантное потомство, которое имеет такую же функцию или биологическую активность, в отношении которых проводится скрининг или отбор изначально трансформированных
30 клеток. Клетка-хозяин принадлежит любому типу клеточной системы, который можно использовать для создания биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, клетки ВНК, клетки NS0, клетки SP2/0, клетки миеломы

УО, клетки миеломы мышей Р3Х63, клетки PER, клетки PER.C6 или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки растений, если называть только некоторые, но также клетки, принадлежащие трансгенному животному, трансгенному растению или культивируемой растительной или животной ткани.

«**Эффективное количество**» средства относится к количеству, необходимому для физиологического изменения в клетке или ткани, в которую его вводят.

«**Терапевтически эффективное количество**» средства, например, фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата. Терапевтически эффективное количество средства, например, устраняет, снижает, замедляет, сводит к минимуму или предупреждает нежелательные явления заболевания.

«**Индивидуум**» или «субъект» представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают без ограничения одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и отличных от человека приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В частности, индивидуум или субъект представляет собой человека.

Термин «**фармацевтическая композиция**» или «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в форме, обеспечивающей эффективность биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительные компоненты, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому предполагается вводить фармацевтическую композицию.

«**Фармацевтически приемлемый носитель**» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции или фармацевтическом составе, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает без ограничения буфер, вспомогательное вещество, стабилизатор или консервант.

Термин «**вкладыш в упаковку**» используется для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических

продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся применения таких терапевтических продуктов.

Используемый в данном документе термин «лечение» (и его грамматические варианты, такие как «лечить» или «лечащий») относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения заболевания индивидуума, подлежащего лечению, и может проводиться как для профилактики, так и в течении клинической патологии. Необходимые эффекты лечения включают без ограничения предупреждение появления или повторного появления заболевания, смягчение симптомов, уменьшение каких-либо прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предупреждение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления молекулы по настоящему изобретению применяют для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

Термин «рак», как используется в данном документе, относится к пролиферативным заболеваниям, таким как лимфомы, лимфоцитарные лейкозы, рак легкого, немелкоклеточный рак легких (НМРЛ), рак легкого из бронхиолоальвеолярных клеток, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы и шеи, кожная или интраокулярная меланома, рак матки, рак яичника, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак матки, карцинома фаллопиевых труб, карцинома эндометрия, карцинома шейки матки, карцинома вагины, карцинома вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак парашитовидной железы, рак надпочечника, саркома мягкой ткани, рак уретры, рак полового члена, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточная карцинома, карцинома почечной лоханки, мезотелиома, печеночноклеточный рак, рак желчного пузыря, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), опухоли оси позвоночника, глиома ствола головного мозга, мультиформная глиобластома, астроцитомы, шванномы, эпендимомы, медуллобластомы, менингиомы, плоскоклеточные карциномы, аденома гипофиза и саркома Юинга, включая рефрактерные версии любого из вышеперечисленных

видов рака или комбинации одного или более из вышеперечисленных видов рака.

Термин «**химиотерапевтическое средство**», как используется в данном документе, относится к химическому соединению, применимому для лечения рака. В одном аспекте химиотерапевтическое средство представляет собой антиметаболит. В одном аспекте антиметаболит выбран из группы, состоящей из 5 аминоптерина, метотрексата, пеметрекседа, ралтитрекседа, кладрибина, клофарабина, флударабина, меркаптопурина, пентостатина, тиогуанина, капецитабина, цитарабина, фтороурацила, флоксуридина и гемцитабина. В 10 одном конкретном аспекте антиметаболит представляет собой капецитабин или гемцитабин. В другом аспекте антиметаболит представляет собой фторурацил. В одном аспекте химиотерапевтическое средство представляет собой средство, который влияет на образование микротрубочек. В одном аспекте средство, которое влияет на образование микротрубочек, выбрано из группы, состоящей 15 из паклитаксела, доцетаксела, винкристина, винбластина, виндезина, винорелбина, таксотера, этопозиды и тенипозиды. В другом аспекте химиотерапевтическое средство представляет собой алкилирующее средство, такое как циклофосфамид. В одном аспекте химиотерапевтическое средство представляет собой цитотоксический антибиотик, такой как ингибитор 20 топоизомеразы II. В одном аспекте ингибитор топоизомеразы II представляет собой доксорубин.

Иллюстративные агонистические антитела к LTBR

В данном документе представлены новые антитела и фрагменты антител, которые специфично связываются с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR). 25 Представлены новые антитела и фрагменты антител, которые специфично связываются с антигеном, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. Таким образом, указанные антитела специфично связываются с LTBR человека. Они представляют собой агонистические антитела к hu LTBR.

Эти антитела способны связываться с LTBR человека и LTBR яванского макака с менее чем 2-кратной разницей аффинности. Некоторые из новых агонистических антител к hu LTBR даже способны связываться с LTBR 30 человека, LTBR яванского макака и LTBR мыши.

В данном документе раскрыты агонистические антитела к LTBR, которые связываются с внеклеточным доменом LTBR человека (ECD аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 359) с EC_{50} , составляющей менее 4 нМ, измеряемой посредством ELISA (см. пример 1.5). В одном аспекте агонистические антитела к LTBR связываются с ECD LTBR человека с EC_{50} , составляющей менее 1 нМ, измеряемой посредством помощью ELISA. В одном конкретном аспекте агонистические антитела к LTBR связываются с ECD LTBR человека с EC_{50} , составляющей менее 0,15 нМ, измеряемой посредством ELISA.

Агонистические антитела к LTBR, раскрытые в данном документе, связываются с внеклеточным доменом LTBR яванского макака (ECD аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 361) с EC_{50} , составляющей менее 5 нМ, измеряемой посредством ELISA (см. пример 1.5). В одном аспекте агонистические антитела к LTBR связываются с ECD LTBR яванского макака с EC_{50} , составляющей менее 0,5 нМ, измеряемой посредством помощью ELISA. В одном конкретном аспекте агонистические антитела к LTBR связываются с ECD LTBR яванского макака с EC_{50} , составляющей менее 0,1 нМ, измеряемой посредством ELISA.

Агонистические антитела к LTBR, описанные в данном документе, требуют сшивания для своей агонистической активности для активации LTBR человека, что означает, что они могут стимулировать LTBR только посредством механизма, зависящего от сшивания. «Зависимый от сшивания механизм» может представлять собой, например, зависящий от сшивания Fc механизм, где антитело должно связывать как LTBR, так и Fc-рецептор для стимуляции LTBR. Таким образом, антитело должно быть способно связывать как LTBR, так и Fc-рецептор. Если антитело будет независимым от сшивания, оно может стимулировать LTBR в отсутствие связывания с Fc-рецептором. Это может приводить к широко распространенной активации LTBR в организме человека и ассоциированным с этим серьезным проблемам безопасности.

Агонистические антитела к LTBR, описанные в данном документе, также требуют сшивания для их агонистической активности, чтобы индуцировать активацию ICAM в эндотелиальных клетках пупочной вены человека или фибробластах, ассоциированных с раком, как показано в данном документе в примере 5.2.

Агонистические антитела к LTBR, описанные в данном документе, также способны ингибировать взаимодействие между LTBR человека и его человеческими лигандами: лимфотоксином $\alpha 1\beta 2$ и LIGHT. Это было

продемонстрировано в экспериментах по конкуренции лигандов посредством ELISA, как описано в примере 1.6.

Было показано, что агонистические антитела к LTBR, описанные в данном документе, конкурируют за связывание с hu LTBR с LIGHT человека, т.е. природным лигандом LTBR, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:358.

В одном аспекте в данном документе представлено агонистическое антитело к LTBR (или антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR), где указанное антитело или антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40; или

вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2,

вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.

В одном аспекте представлено агонистическое антитело к LTBR (или антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR), где указанное антитело содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34; или вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:41, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:42; или вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:49, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:50; или вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:57, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:58; или вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:65, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66; вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:73, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3

аминокислотной последовательности SEQ ID NO:74; вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:81, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:82; или

5 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:89, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:90; или

10 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:97, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:98.

В одном аспекте представлено агонистическое антитело к LTBR (или антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR), где

15 указанное антитело или антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ

20 ID NO:34; или вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную

25 последовательность SEQ ID NO:49, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58; или

30 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66; вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и вариабельную область легкой цепи (V_L

LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74; переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или

5 переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L

10 LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98.

В одном конкретном аспекте агонистические антитела к LTBR, описанные в данном документе, представляют собой агонистические антитела к LTBR, которые специфично связываются с LTBR человека, LTBR яванского макака и

15 LTBR мыши. В данном документе раскрыты агонистические антитела к LTBR, которые связываются с внеклеточным доменом LTBR мыши (ECD аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 360) с EC_{50} , составляющей менее 1 нМ, измеряемой посредством ELISA (см. пример 1.5). В одном аспекте агонистические антитела к LTBR связываются с ECD LTBR мыши с EC_{50} , составляющей менее 0,15 нМ, измеряемой посредством помощи ELISA.

20 В одном аспекте представлено агонистическое антитело к LTBR (или антигенсвязывающий домен), которое специфично связывается с LTBR человека, LTBR яванского макака и LTBR мыши, содержащее:

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1),

25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую

30 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, 5 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3, 10 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 или SEQ ID 15 NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, 20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.

В одном аспекте агонистическое антитело к LTBR (или антигенсвязывающий домен), которое специфично связывается с LTBR 25 человека, LTBR яванского макака и LTBR мыши, содержит:

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID 30 NO:34; или

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или 35 переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L

LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или
вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:89, и вариабельную область легкой цепи (V_L
LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или
5 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:97, и вариабельную область легкой цепи (V_L
LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98.

В одном конкретном аспекте агонистическое антитело к LTBR, описанное
в данном документе, связывается с областью эпитопа SEQ ID NO:351 на LTBR
10 человека. В одном аспекте агонистическое антитело к LTBR, описанное в
данном документе, связывается с эпитопом, который перекрывается с эпитопом,
с которым связывается лимфотоксин $\alpha 1\beta 2$ человека на LTBR человека. В одном
аспекте агонистическое антитело к LTBR, описанное в данном документе,
связывается с другой областью эпитопа на LTBR человека, чем эталонные
15 антитела ВНА10 и СВЕ11. Это было продемонстрировано посредством масс-
спектрометрии водород/дейтерий (HDX), как описано в примере 6.4.

В одном аспекте такое агонистическое антитело к LTBR содержит
вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2,
20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и
вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую
комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую
25 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32. В одном аспекте содержит
вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи (V_L
LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34
30 (антитело P1AE9459).

В одном аспекте представлено агонистическое антитело к LTBR (или
антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR), которое
образуется в результате иммунизации у трансгенных кроликов. В одном аспекте
данное антитело (или антигенсвязывающий домен) содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; или

(v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, и
5 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; или

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-
10 H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70, CDR-L2,
15 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

В одном аспекте агонистическое антитело к LTBR (или антигенсвязывающий домен), полученное в результате иммунизации трансгенных кроликов, представляет собой перекрестно-реактивное антитело
20 или антигенсвязывающий домен, которые специфично связываются с LTBR человека, яванского макака и мыши. В одном аспекте антитело или антигенсвязывающий домен содержат: переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID
25 NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2,
30 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и
вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3,
5 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48. В одном
аспекте антитело или антигенсвязывающий домен содержат вариабельную
область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи (V_L
LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, или
10 вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:49, и вариабельную область легкой цепи (V_L
LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50.

В другом аспекте представлено антитело или антигенсвязывающий домен
LTBR человека, которые образуются в результате иммунизации крыс. В
15 частности, указанное антитело или антигенсвязывающий домен представляют
собой перекрестно-реактивное антитело или антигенсвязывающий домен,
которые специфично связываются с LTBR человека, яванского макака и мыши.
В одном аспекте антитело или антигенсвязывающий домен содержат
вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1,
20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и
вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2,
25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80. В одном
аспекте антитело или антигенсвязывающий домен содержат вариабельную
область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:81, и вариабельную область легкой цепи (V_L
30 LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82.

В еще одном аспекте представлено антитело человека к LTBR или
антигенсвязывающий домен, полученный из библиотеки фагового дисплея. В
частности, указанное антитело или антигенсвязывающий домен представляют
собой перекрестно-реактивное антитело или антигенсвязывающий домен,

которые специфично связываются с LTBR человека, яванского макака и мыши. В одном аспекте антитело или антигенсвязывающий домен содержат переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88. В одном аспекте антитело или антигенсвязывающий домен содержат переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:93, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:94, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:96. В одном аспекте антитело или антигенсвязывающий домен содержат переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90. В другом аспекте антитело или антигенсвязывающий домен содержат переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98.

В одном аспекте антитело, которое специфично связывается с LTBR, представляет собой полноразмерное антитело, в частности, подкласса IgG1 человека. В одном конкретном аспекте оно содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat). В одном конкретном аспекте антитело содержит:

(i) две тяжелые цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:227, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:228; или
(ii) две тяжелые цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:229, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:230; или
5 (iii) две тяжелые цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:231, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:232; или
(iv) две тяжелые цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:233, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность
10 SEQ ID NO:234; или
(v) две тяжелые цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:235, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:236; или
(vi) две тяжелые цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID
15 NO:237, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:238; или
(vii) две тяжелые цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:239, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:240; или
20 (viii) две тяжелые цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:241, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:242; или
(ix) две тяжелые цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:243, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность
25 SEQ ID NO:244.

Биспецифические агонистические антитела к LTBR

В данном документе также представлены новые биспецифические антигенсвязывающие молекулы, способные специфично связываться с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR) и с опухолеассоциированным антигеном, таким как белок активации фибробластов (FAP), которые
30 объединяют антигенсвязывающий домен, специфично связывающийся с FAP, с по меньшей мере одним антигенсвязывающим доменом, способным агонистически связываться с LTBR, где активация посредством LTBR обеспечивается посредством перекрестного связывания посредством связывания

с FAP, экспрессируемым на клетках стромы опухоли. Биспецифические агонистические антитела к LTBR, раскрытые в данном документе, обладают особенно преимущественными свойствами, такими как продуктивность, стабильность, аффинность связывания, биологическая активность, эффективность нацеливания, сниженная интернализация, приемлемые фармакокинетические (ПК) свойства, сниженная токсичность, расширенный диапазон доз, которые могут быть предоставлены пациенту, и, таким образом, возможно повышенная эффективность.

Иллюстративные биспецифические агонистические антитела к LTBR

10 В одном аспекте представлены агонистические антитела к LTBR, которые представляют собой мультиспецифические антитела, содержащие агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе ранее. В одном аспекте представлены агонистические антитела к LTBR, которые представляют собой биспецифические антитела. Биспецифическое агонистическое антитело к LTBR предпочтительно содержит Fc-домен человеческого происхождения, в частности, подкласса IgG человека, более конкретно, подкласса IgG1 человека. В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR содержит Fc-домен подкласса IgG1 человека, содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR содержит Fc-домен подкласса IgG1 человека с аминокислотными мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

25 В одном аспекте агонистическое антитело к LTBR представляет собой биспецифическое антитело, которое специфично связывается с LTBR и опухолеассоциированным антигеном (ТАА). В частности, биспецифическое агонистическое антитело к LTBR представляет собой агонист LTBR, который нацелен на FAP. В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR содержит Fc-область, состоящую из первой и второй субъединиц, которые содержат мутации, снижающие эффекторную функцию. Применение Fc-области, содержащей мутации, которые уменьшают или устраняют эффекторную функцию, будет предупреждать неспецифический агонизм посредством перекрестного сшивания посредством Fc-рецепторов и будет предупреждать

ADCC клеток, экспрессирующих LTBR. Биспецифические агонистические антитела к LTBR, описанные в данном документе, обладают преимуществом перед обычными антителами в том, что они избирательно индуцируют иммунный ответ в клетках-мишенях, которые обычно находятся в строме опухоли, т.е. вблизи опухоли.

Таким образом, биспецифические агонистические антитела к LTBR характеризуются нацеленным на FAP агонистическим связыванием с LTBR. В присутствии FAP-экспрессирующих клеток биспецифические антигенсвязывающие молекулы способны активировать фибробласты, ассоциированные с раком (CAF) (пример 5.2.1), активировать эндотелиальные клетки (пример 5.2.2) и модулировать эндотелий человека для активации молекул адгезии и хемоаттрактантов, которые имеют решающее значение для каскада иммунной инфильтрации. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, описанные в данном документе, способны индуцировать адгезию T-клеток (пример 5.2.3).

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее:

- (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP);
- (б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR); и
- (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

Биспецифические агонистические антитела к LTBR обладают Fc-доменом, состоящим из первой и второй субъединиц, которые содержат одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. Таким образом, опосредованное Fc-рецептором перекрестное сшивание устраняется, и опухолеспецифическая активация достигается посредством перекрестного сшивания посредством связывания антигенсвязывающего домена, который специфично связывается с FAP посредством связывания с его опухолеассоциированной мишенью.

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее:

(а) первый Fab-фрагмент, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP),

5 (б) второй Fab-фрагмент, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

10 В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, раскрытое в данном документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP), содержащий:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую
15 определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую определяющую
20 комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1,
25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, CDR-L2, содержащую
30 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, и CDR-H3,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, и
вариабельную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, CDR-L2, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, и CDR-L3, содержащую
5 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

В одном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который
специфично связывается с FAP, содержит:
(i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую определяющую
комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую
10 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, CDR-H2, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и CDR-H3, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и вариабельную область
легкой цепи (V_L FAP), содержащую определяющую комплементарность область
легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность
15 SEQ ID NO:6, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ
ID NO:7, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO:8;

или (ii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, CDR-H2,
20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, и CDR-H3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и
вариабельную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, CDR-L2, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и CDR-L3, содержащую
25 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

В одном конкретном аспекте первый антигенсвязывающий домен,
который специфично связывается с FAP, содержит (i) вариабельную область
тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую определяющую комплементарность
область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную
30 последовательность SEQ ID NO:3, CDR-H2, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:4, и CDR-H3, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:5, и вариабельную область легкой цепи (V_L
FAP), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv)
CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR-

L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8. В одном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24. В другом аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

В одном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10. В другом аспекте он содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:25, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:26. В еще одном аспекте он содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18.

В одном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10; или он содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:25, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:26; или он содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18.

В одном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, или он содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26, или он содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18. В одном конкретном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и

вариабельную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10. В одном аспекте он содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, и вариабельную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26. В другом аспекте он содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и вариабельную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18. В частности, первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и вариабельную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10. В частности, первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, представляет собой Fab-фрагмент.

В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, раскрытое в данном документе, содержит второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержащий:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2, 5 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3, 10 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID 15 NO:85, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88; или

(v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, 20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38, CDR-L2, 25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40; или

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, и CDR-H3, 30 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; или

(vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, и
5 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; или

(viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и
10 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

В одном конкретном аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой
20 цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1,
25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32. В другом аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую
30 CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38, CDR-L2,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40. В другом аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48. В дополнительном аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56. В другом аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, и легкую переменную область цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64. В другом аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, и CDR-H3,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и
вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70, CDR-L2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и CDR-L3,
5 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72. В еще одном
аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с
LTBR, содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую
CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75,
CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и
10 CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и
вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80. В
15 дополнительном аспекте второй антигенсвязывающий домен, который
специфично связывается с LTBR, содержит вариабельную область тяжелой цепи
(V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:84, и CDR-H3, содержащую аминокислотную
20 последовательность SEQ ID NO:85, и вариабельную область легкой цепи (V_L
LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:88.

25 В другом аспекте второй антигенсвязывающий домен, который
специфично связывается с LTBR, может содержать вариабельную область
тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность
область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:101, CDR-H2, содержащую аминокислотную
30 последовательность SEQ ID NO:102, и CDR-H3, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO:103, и вариабельную область легкой цепи (V_L
LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи
(iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104,
CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, и

CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:106. В одном конкретном аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, и
5 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:100 (CBE11).

В другом аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, может содержать переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность
10 область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:343, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:344, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:345, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи
15 (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:346, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:347, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:348. В одном конкретном аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи
20 (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:349, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:350 (BHA10).

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфично
25 связывается с LTBR, содержащий:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую
30 аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере

приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:50; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:82; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:90; или

(v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:98;

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:42;

(vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере

5 приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:58; или

(viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID

10 NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66; или

(ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере

15 приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID

20 NO:74.

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержащий:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID

25 NO:34; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ

30 ID NO:50; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ

- ID NO:82; или
 (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или
 5 (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98; или
 10 (vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или
 15 (vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58; или
 20 (viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66; или
 25 (ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74.

В одном аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит (i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или (ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50. В одном конкретном аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34. В другом конкретном аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42. В еще одном конкретном аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50.

В другом аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, также способен специфично связываться с LTBR мыши, и содержит:

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,

LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98.

5 В одном аспекте второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, также способен специфично связываться с LTBR мыши, и содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную
10 последовательность SEQ ID NO:34.

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, где биспецифическое антитело содержит третий антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, означая биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

15 (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP);

(б) второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и

(в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий
20 одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

В одном конкретном аспекте третий антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, идентичен второму антигенсвязывающему
25 домену, который специфично связывается с LTBR, что означает, что второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), являются одинаковыми. В одном аспекте второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с LTBR, представляют собой Fab-фрагменты, которые специфично
30 связываются с LTBR. В одном аспекте Fab-фрагменты, которые специфично связываются с LTBR, представляют собой фрагменты crossFab. В дополнительном аспекте первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, представляет собой Fab-фрагмент.

В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, раскрытое в данном документе, содержит второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с LTBR, при этом оба содержат:

5 (i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и
10 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1,
15 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2,
20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3,
25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или

30 (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88; или

(v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, 5 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38, CDR-L2, 10 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40; или

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, и CDR-H3, 15 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; или

(vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, и CDR-H3, 20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, и CDR-L3, 25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; или

(viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, CDR-H2, 30 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70, CDR-L2,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

В одном конкретном аспекте второй и третий антигенсвязывающие домены являются идентичными.

5 В одном аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающего домена, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую
10 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную
15 последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32. В другом аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35,
20 CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3,
25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40. В другом аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную
30 последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:48. В дополнительном аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56. В другом аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64. В другом аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72. В еще одном аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:77, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80. В дополнительном аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с LTBR, содержащие:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:34; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:50; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID

- NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:82; или
- 5 (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
- 10 приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:90; или
- (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID
- 15 NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:98;
- (vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере
- 20 приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID
- 25 NO:42;
- (vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID
- 30 NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:58; или
- (viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере

приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66; или

(ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:74.

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с LTBR, содержащие:

- (i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или
- (ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или
- (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или
- (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или
- (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ

- ID NO:98; или
 (vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или
 5 (vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58; или
 10 (viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66;
 (ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74.

В одном аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит (i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или
 20 (ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50. В одном конкретном аспекте каждый из второго и третьего
 25 антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34. В другом конкретном аспекте каждый из второго и третьего
 30 антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34. В другом конкретном аспекте каждый из второго и третьего

антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42. В еще одном конкретном аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50.

В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее второй и третий антигенсвязывающие домены, каждый из которых специфично связывается с LTBR, содержащие переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:106. В одном конкретном аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:100 (CBE11).

В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее второй и третий антигенсвязывающие домены, каждый из которых специфично связывается с LTBR, содержащие переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:343, CDR-H2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:344, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:345, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:346, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:347, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:348. В одном конкретном аспекте каждый из второго и третьего антигенсвязывающих доменов, который специфично связывается с LTBR, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:349, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:350 (BHA10).

В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с LTBR человека, и способны также специфично связываться с LTBR, каждый из которых содержит:

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и
 5 вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или

вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.
 10
 15

В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR содержит второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с LTBR человека, а также специфично связываются с LTBR мыши, каждый из которых содержит:
 20

(i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или
 25

(iii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или
 30

(vii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или
 30

(viii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и вариабельную область

легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или

(ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98.

В одном конкретном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR содержит второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с LTBR человека, а также специфично связываются с LTBR мыши, каждый из которых содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

Биспецифические агонистические антитела к LTBR, связывающиеся с FAP и LTBR

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее:

(a) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержащий: переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, или переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26, или переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18;

(б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), содержащий:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

- (ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или
- 5 (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или
- 10 (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или
- 15 (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98;
- 20 (vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42;
- (vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58; или
- 25 (viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66; или
- 30 (ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74; и
- (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность

связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее:

5 (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержащий: вариабельную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и вариабельную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, или
10 вариабельную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, и вариабельную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26, или вариабельную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и вариабельную область легкой цепи
15 (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18;

(б) второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), каждый из которых содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую
20 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ
25 ID NO:50; или

(iii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ
30 ID NO:82; или

(iv) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ
ID NO:90; или

- (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98;
- 5 (vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42;
- 10 (vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58; или
- (viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66; или
- 15 (ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74; и
- 20

(в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

- 25 В одном конкретном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, которое содержит (i) первый антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с FAP, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и (ii) второй и третий антигенсвязывающие домены, способные специфично связываться с LTBR, содержащие переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID
- 30

NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, которое содержит: (i) первый антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с FAP, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и (ii) второй и третий антигенсвязывающие домены, способные специфично связываться с LTBR, содержащие переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:100.

Биспецифические моновалентные агонистические антитела к LTBR (формат 1+1)

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP), второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, при этом биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит:

(i) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь полноразмерного антитела, которое специфично связывается с FAP, и

(ii) вторую (модифицированную) легкую цепь и вторую (модифицированную) тяжелую цепь полноразмерного антитела, которое специфично связывается с LTBR, где переменные домены VL и VH заменены друг на друга, и/или где константные домены CL и CH1 заменены друг на друга.

Первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, представляет собой Fab-фрагмент, а второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, представляет собой фрагмент crossFab.

В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP), второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, при этом биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит:

10 (i) первую (модифицированную) легкую цепь и первую (модифицированную) тяжелую цепь полноразмерного антитела, которое специфично связывается с FAP, где переменные домены VL и VH заменены друг на друга, и/или где константные домены CL и CH1 заменены друг на друга, и

15 (ii) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь полноразмерного антитела, которое специфично связывается с LTBR.

Первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, представляет собой фрагмент crossFab, а второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, представляет собой Fab-фрагмент.

20 В одном конкретном аспекте представлены:

(а) биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:107, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:109, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:108, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:110; или

(б) биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:111, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:112, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114; или

ID NO:159, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:161, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:160, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:162; или

5 (с) биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:163, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:165, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:164, и вторую легкую цепь,
10 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:166; или

(у) биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:215, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:217, первую легкую цепь, содержащую
15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:216, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:218.

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:329, вторую тяжелую цепь, содержащую
20 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:330, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:331, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:332.

Биспецифические агонистические антитела к LTBR, бивалентные для связывания с LTBR и моновалентные для связывания с FAP (формат 2+1)

25 В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP), второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и Fc-домен, состоящий из первой и второй
30 субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, при этом биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит:

(i) две легкие цепи и две тяжелые цепи полноразмерного антитела, которое специфично связывается с LTBR, и

(ii) Fab-фрагмент или фрагмент crossFab, который специфично связывается с FAP, соединен посредством пептидного линкера с одним из С-концов двух тяжелых цепей.

В другом аспекте представлена биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP), второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, при этом биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит:

(i) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь полноразмерного антитела, которое специфично связывается с FAP, и

(ii) вторую (модифицированную) легкую цепь и вторую (модифицированную) тяжелую цепь полноразмерного антитела, которое специфично связывается с LTBR, где Fab-фрагмент или фрагмент CrossFab, который специфично связывается с LTBR, соединен посредством пептидного линкера с С-концом второй тяжелой цепи.

Таким образом, представлена биспецифическая антигенсвязывающая молекула, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула имеет бивалентное связывание с LTBR и моновалентное связывание с FAP.

В одном конкретном аспекте представлены:

(а) биспецифическое агонистическое антитело LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:167, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:169, две легкие цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:168, и одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:170; или

(б) биспецифическое агонистическое антитело LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:171, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную

(и) биспецифическое агонистическое антитело LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:195, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:197, две легкие цепи, каждая из которых
5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:196, и одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:198; или

(к) биспецифическое агонистическое антитело LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:199, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную
10 последовательность SEQ ID NO:201, две легкие цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:200, и одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:202; или

(л) биспецифическое агонистическое антитело LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID
15 NO:203, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:205, две легкие цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:204, и одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:206; или

(м) биспецифическое агонистическое антитело LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID
20 NO:207, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:209, две легкие цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:208, и одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:210; или

(н) биспецифическое агонистическое антитело LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID
25 NO:211, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:213, две легкие цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:212, и одну легкую
30 цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:214.

Кроме того, представлены:

(п) биспецифическое агонистическое антитело LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID
NO:326, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:328, две легкие цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:327, и одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:329; или

5 (p) биспецифическое агонистическое антитело LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:333, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:334, две легкие цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:335, и одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:336; или

10 (с) биспецифическое агонистическое антитело LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:337, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:338, две легкие цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:339, и одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:340.

В одном конкретном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:195, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:197, две легкие цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:196, одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:198.

Суррогатные агонистические антитела к LTBR мыши

25 В данном документе также представлены суррогатные молекулы мыши. В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее:

(а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержащий: 30 переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18,

(б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), содержащий переменную область

тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; и

5 (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

10 В одном конкретном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:219, вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:221, первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:220, и вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222 (формат 1+1).

15 В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее:

(а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержащий: 20 переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18,

(б) второй и третий антигенсвязывающие домены, которые специфично связываются с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), каждый из которых содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; и

30 (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:223, и вторую тяжелую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:225, две легкие цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:224, одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:226.

5 В одном конкретном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело LTBR, содержащее первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:318, и вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:320, две легкие цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:319, и одну легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность
10 SEQ ID NO:321.

Модификации Fc-домена, снижающие связывание Fc-рецептора и/или эффекторную функцию

Биспецифические агонистические антитела к LTBR, описанные в данном документе, дополнительно содержат Fc-домен, состоящий из первой и второй
15 субъединиц, и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. Таким образом, одна или более модификаций аминокислот могут быть введены в Fc-область антитела, представленного в данном документе, за счет чего получают вариант Fc-области.
20 Вариант по Fc-области может содержать последовательность человеческой Fc-области (например, человеческой Fc-области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях.

Fc-домен придает благоприятные фармакокинетические свойства
25 биспецифическим антителам по настоящему изобретению, включая длительное время полужизни в сыворотке крови, которое способствует надлежащему накоплению в ткани-мишени и благоприятному соотношению распределения ткань-кровь. В то же время это может, однако, приводить к нежелательному нацеливанию биспецифических агонистических антител к LTBR на клетки,
30 экспрессирующие Fc-рецепторы, а не на предпочтительные антиген-несущие клетки. Соответственно, в конкретных аспектах Fc-домен биспецифических агонистических антител к LTBR демонстрирует сниженную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или сниженную эффекторную функцию по

сравнению с нативным Fc-доменом IgG, в частности, Fc-доменом IgG1 или Fc-доменом IgG4. В частности, Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1.

В одном таком аспекте Fc-домен (или биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, содержащая указанный Fc-домен) проявляет менее 50%, предпочтительно менее 20%, более предпочтительно менее 10% и наиболее предпочтительно менее 5% аффинности связывания с Fc-рецептором по сравнению с нативным Fc-доменом IgG1 (или биспецифической антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению, содержащей нативный Fc-домен IgG1) и/или менее 50%, предпочтительно менее 20%, более предпочтительно менее 10% и наиболее предпочтительно менее 5% эффекторной функции по сравнению с нативным Fc-доменом IgG1 (или биспецифической антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению, содержащей нативный Fc-домен IgG1). В одном аспекте Fc-домен (или биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, содержащая указанный Fc-домен) практически не связывается с Fc-рецептором и/или не индуцирует эффекторную функцию. В конкретном аспекте Fc-рецептор представляет собой Fc γ -рецептор. В одном аспекте Fc-рецептор представляет собой Fc-рецептор человека. В одном аспекте Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном аспекте Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc γ -рецептор человека, конкретнее Fc γ RIIIa, Fc γ RI или Fc γ RIIa человека, наиболее конкретно Fc γ RIIIa человека. В одном аспекте Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-рецептор. В конкретном аспекте Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc γ -рецептор человека, в частности, Fc γ RIIB человека. В одном аспекте эффекторная функция представляет собой одно или более из CDC, ADCC, ADCP и секреции цитокинов. В конкретном аспекте эффекторная функция представляет собой ADCC. В одном аспекте Fc-домен демонстрирует практически аналогичную аффинность связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) с нативным Fc-доменом IgG1. По сути аналогичное связывание с FcRn достигается, когда Fc-домен (или биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, содержащая указанный Fc-домен) проявляет более чем приблизительно 70%, в частности, более чем приблизительно 80%, более конкретно более чем приблизительно 90% аффинности связывания нативного

Fc-домена IgG1 (или биспецифического агонистического антитела к LTBR, содержащего нативный Fc-домен IgG1) с FcRn.

В конкретном аспекте Fc-домен сконструирован так, чтобы иметь сниженную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или сниженную эффекторную функцию по сравнению с несконструированным Fc-доменом. В конкретном аспекте Fc-домен биспецифического агонистического антитела к LTBR содержит одну или более аминокислотных мутаций, которые снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. Как правило, в каждой из двух субъединиц Fc-домена присутствуют одинаковые одна или более аминокислотных мутаций. В одном аспекте аминокислотная мутация снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором. В другом аспекте аминокислотная мутация снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором в по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 5 раз или по меньшей мере 10 раз. В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее сконструированный Fc-домен, демонстрирует менее 20%, в частности, менее 10%, более конкретно менее 5% аффинности связывания с Fc-рецептором по сравнению с биспецифическими антителами по настоящему изобретению, содержащими несконструированный Fc-домен. В конкретном аспекте Fc-рецептор представляет собой Fc γ -рецептор. В других аспектах Fc-рецептор представляет собой Fc-рецептор человека. В одном аспекте Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc-рецептор. В конкретном аспекте Fc-рецептор представляет собой ингибирующий Fc γ -рецептор человека, в частности, Fc γ RIIB человека. В некоторых аспектах Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном аспекте Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc γ -рецептор человека, конкретнее Fc γ RIIIa, Fc γ RI или Fc γ RIIa человека, наиболее конкретно Fc γ RIIIa человека. Предпочтительно связывание с каждым из этих рецепторов снижено. В некоторых аспектах также снижена аффинность связывания с компонентом комплемента, в частности, аффинность связывания с C1q. В одном аспекте аффинность связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) не снижена. По сути аналогичное связывание с FcRn, т.е. сохранение аффинности связывания Fc-домена с указанным рецептором, достигается, когда Fc-домен (или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее указанный Fc-домен) демонстрирует более чем приблизительно 70% аффинности связывания

несконструированной формы Fc-домена (или (биспецифического агонистического антитела к LTBR, содержащего указанную не сконструированную форму Fc-домена) с FcRn. Fc-домен или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее указанный Fc-домен, может проявлять более чем приблизительно 80% и даже более чем приблизительно 90% такой аффинности. В некоторых аспектах Fc-домен биспецифического агонистического антитела к LTBR сконструирован так, чтобы иметь сниженную эффекторную функцию по сравнению с несконструированным Fc-доменом. Сниженная эффекторная функция может включать без ограничения одно или более из следующего: сниженной комплементзависимой цитотоксичности (CDC), сниженной антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC), сниженного антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), сниженной секреции цитокинов, сниженного опосредованного иммунным комплексом поглощения антигена антигенпрезентирующими клетками, сниженного связывания с NK-клетками, сниженного связывания с макрофагами, сниженного связывания с моноцитами, сниженного связывания с полиморфноядерными клетками, сниженной прямой сигнализации, индуцирующей апоптоз, сниженного созревания дендритных клеток или сниженного примирования T-клеток.

Антитела со сниженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или более остатков Fc-области 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (патент США № 6737056). Такие Fc-мутанты включают Fc-мутантов с заменами в двух или более аминокислотных положениях 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый Fc-мутант «DANA» с заменой остатков 265 и 297 аланином (патент США № 7332581). Описаны некоторые варианты антител с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. (например, патент США № 6737056; WO 2004/056312 и Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

В одном аспекте Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении E233, L234, L235, N297, P331 и P329. В некоторых аспектах Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A и L235A («LALA»). В одном таком аспекте Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1, в частности, Fc-домен IgG1 человека. В одном аспекте Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329. В более конкретном аспекте аминокислотная замена представляет собой P329A или P329G, в частности, P329G. В одном варианте осуществления Fc-домен

содержит аминокислотную замену в положении P329 и дополнительную аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S. В более конкретных аспектах Fc-домен содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и P329G («P329G LALA»).

5 Комбинация аминокислотных замен «P329G LALA» практически полностью устраняет связывание Fc γ -рецептора Fc-доменом человеческого IgG1, как описано в патентной заявке PCT № WO 2012/130831 A1. В указанном документе также описаны способы получения таких мутантных Fc-доменов и способы определения их свойств, таких как связывание Fc-рецептора или эффекторные функции. Такое антитело представляет собой IgG1 с мутациями L234A и L235A
10 или с мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

В одном аспекте Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4. В более конкретном аспекте Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4, содержащий аминокислотную замену в положении S228 (нумерация Kabat), в частности, аминокислотную замену S228P. В более конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4, содержащий аминокислотные замены L235E, S228P и P329G. Эта аминокислотная замена уменьшает *in vivo* обмен Fab
15 плеч антител IgG4 (см. Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)).

Антитела с увеличенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за передачу материнских IgG плоду (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-
25 593, и Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434), описаны в US 2005/0014934. Эти антитела содержат Fc-домен с одной или более заменами, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Такие Fc-варианты включают варианты с заменами в одном или более остатках Fc-области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424
30 или 434, например, замену аминокислотного остатка 434 в Fc-области (патент США № 7371826). Также см. Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5648260; US 5624821; и WO 94/29351 в отношении других примеров вариантов по Fc-области.

Связывание с Fc-рецепторами можно легко определить, например, с помощью ELISA или поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя стандартное оборудование, такое как инструмент BIAcore (GE Healthcare), и Fc-рецепторы, которые можно получить с помощью рекомбинантной экспрессии.

5 Подобный подходящий анализ связывания описан в данном документе. В качестве альтернативы аффинность связывания Fc-доменов или активирующих клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих Fc-домен для Fc-рецепторов, можно оценить с использованием клеточных линий, которые, как известно, экспрессируют определенные Fc-рецепторы, такие как NK-клетки

10 человека, экспрессирующие рецептор FcγIIIa. Эффекторная функция Fc-домена или биспецифических агонистических антител к LTBR, содержащих Fc-домен, может быть измерена способами, известными в данной области техники. Подходящий анализ для измерения ADCC описан в данном документе. Другие примеры анализов *in vitro* для оценки активности ADCC молекулы,

15 представляющей интерес, описаны в патенте США № 5500362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) и Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); патенте США № 5821337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). В качестве альтернативы можно использовать нерадиоактивные методы анализа (см., например, нерадиоактивный анализ

20 цитотоксичности для проточной цитометрии АСТИ™ (CellTechnology, Inc., Маунтин-Вью, Калифорния); и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Мадисон, Висконсин)). Эффекторные клетки, подходящие для такого анализа, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки-киллеры (NK). В качестве

25 альтернативы или в качестве дополнения активность в виде ADCC молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, такой как описана в Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

В следующем разделе описаны предпочтительные аспекты биспецифического агонистического антитела к LTBR, описанного в данном

30 документе, содержащего модификации Fc-домена, снижающие связывание с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP), (б) второй (и, необязательно, третий)

антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, где Fc-домен содержит одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антитела с Fc-рецептором, в частности, с Fc-рецептором. В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP), (б) второй (и, необязательно, третий) антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, способных к стабильной связи, при этом Fc-домен содержит одну или более аминокислотных замен, снижающих эффекторную функцию. В конкретном аспекте Fc-домен принадлежит подклассу IgG1 человека с аминокислотными мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

15 **Модификации Fc-домена, способствующие гетеродимеризации**

Биспецифические агонистические антитела к LTBR, описанные в данном документе, содержат различные антигенсвязывающие сайты, слитые с одной или другой из двух субъединиц Fc-домена, таким образом, две субъединицы Fc-домена могут содержаться в двух неидентичных полипептидных цепях. Рекомбинантная коэкспрессия этих полипептидов и последующая димеризация приводят к нескольким возможным комбинациям двух полипептидов. Таким образом, для повышения выхода и чистоты биспецифических агонистических антител к LTBR при рекомбинантном получении будет предпочтительно ввести в Fc-домен биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению модификацию, способствующую ассоциации требуемых полипептидов.

Соответственно, в конкретных аспектах представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP), (б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, где Fc-домен содержит модификацию,

способствующую ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена. Сайтом наиболее интенсивного белок-белкового взаимодействия между двумя субъединицами Fc-домена IgG человека является домен СНЗ Fc-домена. Таким образом, в одном аспекте указанная модификация находится в домене СНЗ Fc-домена.

В конкретном аспекте указанная модификация представляет собой так называемую модификацию «выступ-во-впадину», содержащую модификацию «выступа» в одной из двух субъединиц Fc-домена и модификацию «впадины» в другой из двух субъединиц Fc-домена. Таким образом, представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее (а) по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с LTBR, (б) по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с антигеном клетки-мишени, и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, способных к стабильной ассоциации, при этом первая субъединица Fc-домена содержит выступы, а вторая субъединица Fc-домена содержит впадины в соответствии со способом «выступ-во-впадину». В конкретном аспекте первая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены S354C и T366W (нумерация EU), а вторая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены Y349C, T366S и Y407V (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

Технология «выступ-во-впадину» описана, например, в US 5731168; US 7695936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) и Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Как правило, этот способ включает внесение выпуклости («выступа») на поверхности контакта первого полипептида и соответствующей полости («впадины») на поверхности контакта второго полипептида, так, чтобы выпуклость могла располагаться в полости, чтобы способствовать образованию гетеродимера и затруднять образование гомодимера. Выпуклости конструируют путем замещения небольших боковых цепей аминокислот на поверхности контакта первого полипептида более крупными боковыми цепями (например, тирозина или триптофана). Компенсирующие полости идентичного или сходного размера с выпуклостями создают на поверхности контакта второго полипептида путем замены крупных боковых цепей аминокислот на более мелкие (например аланина или треонина).

Соответственно, в одном аспекте в домене СНЗ первой субъединицы Fc-домена биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим больший объем боковой цепи, тем самым создавая выступ в домене СНЗ первой субъединицы, который совместим с полостью в домене СНЗ второй субъединицы, а в домене СНЗ второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим меньший объем боковой цепи, тем самым создавая впадину в домене СНЗ второй субъединицы, в которой может размещаться выступ в домене СНЗ первой субъединицы. Выпуклость и полость можно создавать путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, например, с помощью сайт-специфического мутагенеза, или путем пептидного синтеза. В конкретном аспекте в домене СНЗ первой субъединицы Fc-домена остаток треонина в положении 366 замещен остатком триптофана (T366W), а в домене СНЗ второй субъединицы Fc-домена остаток тирозина в положении 407 замещен остатком валина (Y407V). В одном аспекте во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток треонина в положении 366 замещен остатком серина (T366S), а остаток лейцина в положении 368 замещен остатком аланина (L368A).

В дополнительном аспекте в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 замещен остатком цистеина (S354C), а во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в положении 349 замещен остатком цистеина (Y349C). Внесение этих двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами Fc-домена, дополнительно стабилизируя димер (Carter (2001), *J Immunol Methods* 248, 7-15). В конкретном аспекте первая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены S354C и T366W (нумерация EU), а вторая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены Y349C, T366S и Y407V (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

В альтернативном аспекте, модификация, способствующая ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена, включает модификацию, которая опосредует эффекты электростатического взаимодействия, например, как описано в публикации PCT WO 2009/089004. В общем случае этот способ включает замещение одного или более из аминокислотных остатков на поверхности контакта двух субъединиц Fc-домена заряженными

аминокислотными остатками так, чтобы образование гомодимера становилось электростатически невыгодным, но гетеродимеризация была бы электростатически выгодной.

5 С-конец тяжелой цепи биспецифического агонистического антитела к LTBR, как описано в данном документе, может представлять собой полный С-конец, заканчивающийся аминокислотными остатками PGK. С-конец тяжелой цепи может представлять собой укороченный С-конец, в котором были удалены один или два С-концевых аминокислотных остатка. В одном конкретном аспекте С-конец тяжелой цепи представляет собой укороченный С-конец, заканчивающийся PG. В одном конкретном аспекте С-конец тяжелой цепи представляет собой укороченный С-конец, заканчивающийся P. В одном аспекте всех аспектов, как описано в данном документе, биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую С-концевой домен СН3, как указано в данном документе, содержит С-концевой глицин-лизиновый дипептид (G446 и 10 K447, нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat). В одном аспекте всех аспектов, как описано в данном документе, биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее тяжелую цепь, включающую С-концевой домен СН3, как указано в данном документе, содержит С-концевой остаток глицина (G446, нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

20 **Модификации в Fab-доменах**

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее (а) первый Fab-фрагмент, способный специфично связываться с FAP, (б) второй Fab-фрагмент, способный специфично связываться с LTBR, и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, где в одном из Fab-фрагментов заменены либо переменные домены VH и VL, либо константные домены CH1 и CL. Биспецифические антитела получают в соответствии с технологией Crossmab.

Мультиспецифические антитела с заменой/обменом домена в одном связывающем плече (CrossMabVH-VL или CrossMabCH-CL) подробно описаны в 30 WO2009/080252 и Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-11191. Они несомненно снижают количество побочных продуктов, возникающих в результате несовпадения легкой цепи против первого антигена с неправильной тяжелой цепью против второго антигена (по сравнению с подходами без такого обмена доменов).

В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее (а) первый Fab-фрагмент, способный специфично связываться с FAP, (б) второй Fab-фрагмент, способный специфично связываться с LTBR, и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, способных к стабильной ассоциации, при этом в одном из Fab-фрагментов 5 варьируемые домены VL и VH заменены друг другом таким образом, что домен VH является частью легкой цепи, а домен VL является частью тяжелой цепи. Более конкретно, во втором Fab-фрагменте, способном специфично связываться с LTBR, варьируемые домены VL и VH заменены друг на друга, так что домен 10 VH является частью легкой цепи, а домен VL является частью тяжелой цепи.

В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее (а) первый Fab-фрагмент, способный специфично связываться с FAP, при этом константные домены CL и CH1 заменены друг на друга таким образом, что домен CH1 является частью легкой цепи, а домен CL 15 является частью тяжелой цепи, и (б) второй Fab-фрагмент, способный специфично связываться с LTBR. Такая молекула обеспечивает одновалентное связывание как с LTBR, так и с FAP.

В другом аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее (а) первый Fab-фрагмент, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP), (б) второй и третий Fab-фрагменты, которые специфично связываются с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и 20 содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, при этом во втором и третьем Fab-фрагменте, который специфично связывается с LTBR, варьируемые домены VL и VH заменены друг 25 другом, так что домен VH является частью легкой цепи, а домен VL является частью тяжелой цепи.

В другом аспекте и для дополнительного улучшения правильного спаривания биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащее (а) 30 первый Fab-фрагмент, способный специфично связываться с LTBR, (б) второй Fab-фрагмент, способный специфично связываться с FAP, и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, способных к стабильной ассоциации, может содержать различные заряженные аминокислотные замены (так

называемые «заряженные остатки»). Эти модификации вносят в перекрестные сшитые или не перекрестно сшитые домены СН1 и СL. В конкретном аспекте настоящее изобретение относится к биспецифической антигенсвязывающей молекуле, в которой в одном из доменов СL аминокислота в положении 123 (нумерация EU) была замещена аргинином (R) и/или аминокислота в положении 124 (нумерация EU) была замещена лизином (K), и в которой в одном из доменов СН1 аминокислоты в положении 147 (нумерация EU) и/или в положении 213 (нумерация EU) были замещены глутаминовой кислотой (E).

Полинуклеотиды

10 Дополнительно представлены выделенные полинуклеотиды, кодирующие агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе, или их фрагмент.

Выделенные полинуклеотиды, кодирующие агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, могут быть экспрессированы в виде одного полинуклеотида, который кодирует всю антигенсвязывающую молекулу, или в виде нескольких (например, двух или более) полинуклеотидов, которые коэкспрессируются. Полипептиды, кодируемые коэкспрессируемыми полинуклеотидами, могут ассоциироваться, например, посредством дисульфидных связей или иным образом, с образованием функциональной антигенсвязывающей молекулы. Например, часть легкой цепи иммуноглобулина может кодироваться отдельным полинуклеотидом из части тяжелой цепи иммуноглобулина. При коэкспрессии полипептиды тяжелой цепи будут ассоциироваться с полипептидами легкой цепи с образованием иммуноглобулина.

25 В некоторых аспектах выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, содержащийся в агонистическом антителе к LTBR или биспецифическом агонистическом антителе к LTBR, как описано в данном документе.

В одном аспекте представлен выделенный полинуклеотид, кодирующий биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, содержащий: (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP), (б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR), и (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более

аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

В определенных аспектах полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В других вариантах осуществления полинуклеотид по
5 настоящему изобретению представляет собой РНК, например, в форме матричной РНК (мРНК). РНК, как описано в данном документе, может быть однострэнковой или двухстрэнковой.

Рекомбинантные методы

Агонистические антитела к LTBR или биспецифические агонистические
10 антитела к LTBR, описанные в данном документе, могут быть получены, например, посредством рекомбинантного получения. Для рекомбинантного получения представлен один или более полинуклеотидов, кодирующих агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR или его полипептидные фрагменты. Один или более полинуклеотидов,
15 кодирующих агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, выделяют и встраивают в один или более векторов для дополнительного клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такой полинуклеотид можно легко выделять и секвенировать, используя традиционные процедуры. В одном аспекте представлен вектор,
20 предпочтительно экспрессирующий вектор, содержащий один или более полинуклеотидов, описанных в данном документе. Методы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих кодирующую последовательность агонистического антитела к LTBR или биспецифического агонистического антитела к LTBR (фрагмента) наряду с соответствующими сигналами контроля транскрипции/трансляции. Эти методы включают методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и рекомбинацию *in vivo*/генетическую рекомбинацию. См., например, технологии, описанные в
25 Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); и Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). Вектор экспрессии может быть частью плазмиды, вируса или может быть фрагментом нуклеиновой кислоты. Вектор экспрессии включает кассету экспрессии, в которой полинуклеотид, кодирующий агонистическое антитело к

LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR или его полипептидные фрагменты (т.е. кодирующую область), клонируют в функциональной ассоциации с промотором и/или другими элементами контроля транскрипции или трансляции. Как используется в данном документе, «кодирующая область» представляет собой участок нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя «стоп-кодон» (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, он может считаться частью кодирующей области, в случае наличия, но любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосомы, терминаторы транскрипции, интроны, 5' и 3' нетранслируемые области и т.п., не являются частью кодирующей области. Две или более кодирующих областей могут присутствовать в одной полинуклеотидной конструкции, например, в одном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например, в отдельных (разных) векторах. Кроме того, любой вектор может содержать одну кодирующую область или может содержать две или более кодирующих областей, например, вектор по настоящему изобретению может кодировать один или более полипептидов, которые разделяются после или во время трансляции на конечные белки посредством протеолитического расщепления. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота, описанные в данном документе, могут кодировать гетерологичные кодирующие области, слитые или не слитые с полинуклеотидом, кодирующим агонистическое антитело к LTBR или его биспецифическое агонистическое антитело к LTBR или его полипептидные фрагменты, или их варианты или производные. Гетерологичные кодирующие области включают без ограничения специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен. Функциональная ассоциация имеет место, когда кодирующая область генетического продукта, например, полипептида, связана с одной или более регуляторными последовательностями так, чтобы экспрессия генного продукта находилась под влиянием или управлением этих регуляторных последовательностей. Два фрагмента ДНК (такие как кодирующая полипептид область и связанный с ней промотор) являются «функционально связанными», если индукция промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей необходимый генный продукт, и если природа связи между двумя фрагментами ДНК не препятствует способности экспрессионных регуляторных

последовательностей управлять экспрессией генного продукта или не препятствует способности транскрибировать ДНК-матрицу. Таким образом, промоторная область является функционально связанной с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор способен влиять на
5 транскрипцию этой нуклеиновой кислоты. Промотор может быть клеточно-специфическим промотором, который обуславливает достаточную транскрипцию ДНК только в определенных клетках. Помимо промотора, другие транскрипционные регуляторные элементы, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, могут быть функционально
10 связаны с полинуклеотидом с целью управления клеточно-специфической транскрипцией.

Подходящие промоторы и другие транскрипционные регуляторные области описаны в данном документе. Специалистам в данной области техники известны различные транскрипционные регуляторные области. Они включают
15 без ограничения транскрипционные регуляторные области, которые являются функциональными в клетках позвоночных, таких как без ограничения промоторные и энхансерные сегменты из цитомегаловирусов (например, немедленно ранний промотор в сочетании с интроном-А), вируса обезьян 40 (например, ранний промотор) и ретровирусов (таких как, например, вирус саркомы Рауса). Другие области управления транскрипцией включают полученные из генов позвоночных, таких как гены актина, белка теплового шока, бычьего гормона роста и кроличьего α -глобина, а также другие
20 последовательности, способные управлять экспрессией генов в эукариотических клетках. Дополнительные подходящие транскрипционные регуляторные области включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также индуцибельные промоторы (например, промоторы, индуцируемые тетрациклинами). Аналогично, специалистам в данной области техники известны различные
25 трансляционные регуляторные элементы. Они включают без ограничения сайты связывания рибосомы, кодоны инициации и терминации трансляции и элементы, полученные из вирусных систем (в частности, внутренний сайт посадки рибосомы или IRES, также называемый последовательностью CITE). Кассета экспрессии также может включать другие элементы, такие как точка начала репликации и/или элементы интеграции в хромосому, такие как ретровирусные
30

длинные концевые повторы (LTR) или инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

Кодирующие области полинуклеотидов и нуклеиновых кислот, описанные в данном документе, могут быть связаны с дополнительными кодирующими областями, которые кодируют секреторные или сигнальные пептиды, которые направляют секрецию полипептида, кодируемого полинуклеотидом, описанным в данном документе. Например, если требуется секреция агонистического антитела к LTBR или его биспецифического агонистического антитела к LTBR или его полипептидных фрагментов, ДНК, кодирующая сигнальную последовательность, может быть помещена выше нуклеиновой кислоты, кодирующей агонистическое антитело к LTBR или его биспецифическое агонистическое антитело к LTBR или его полипептидные фрагменты. В соответствии с сигнальной гипотезой, белки, секретируемые клетками млекопитающих, имеют сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, которые отщепляются от зрелого белка после инициации экспорта растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Специалистам в данной области техники известно, что полипептиды, секретируемые клетками позвоночных в общем случае имеют сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от транслируемого полипептида с образованием секретируемой или «зрелой» формы полипептида. В определенных вариантах осуществления используют нативный сигнальный пептид, например, сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, или функциональное производное этой последовательности, которое сохраняет способность управлять секрецией полипептида, который с ней функционально связан. В качестве альтернативы можно использовать гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих или его функциональное производное. Например, лидерная последовательность дикого типа может быть замещена лидерной последовательностью человеческого тканевого активатора плазминогена (ТРА) или мышинной β -глюкуро니다зой.

ДНК, кодирующая короткую белковую последовательность, которая может быть использована для облегчения последующей очистки (например, гистидинового метки) или содействия мечению слитого белка, может быть включена в состав или на концах полинуклеотида, кодирующего агонистическое

антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR или его полипептидные фрагменты.

В дополнительном аспекте представлена клетка-хозяин, содержащая один или более полинуклеотидов, описанных в данном документе. В некоторых аспектах представлена клетка-хозяин, содержащая один или более векторов, описанных в данном документе. Полинуклеотиды и векторы могут включать любые элементы, по отдельности или в комбинации, описанные в данном документе в связи с полинуклеотидами и векторами соответственно. В одном аспекте клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована или трансфицирована) вектор, содержащий полинуклеотид, который кодирует (часть) агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, как описано в данном документе. Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» относится к любому типу клеточной системы, которую можно сконструировать для создания слитых белков по настоящему изобретению или их фрагментов. Клетки-хозяева, подходящие для репликации и поддержания экспрессии антигенсвязывающих молекул, хорошо известны в данной области техники. Такие клетки можно трансфицировать или трансдуцировать, сообразно ситуации, конкретным вектором экспрессии, и можно выращивать большие количества содержащих вектор клеток для засеваания крупномасштабных ферментеров для получения достаточных количеств антигенсвязывающей молекулы для клинических применений. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические микроорганизмы, такие как *E. coli*, или различные эукариотические клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (СНО), клетки насекомых и т.п. Например, полипептиды могут продуцироваться в бактериях, в частности, если отсутствует необходимость гликозилирования. После экспрессии полипептид можно выделять из бактериальной клеточной пасты в растворимую фракцию и дополнительно очищать. Помимо прокариот, эукариотические микроорганизмы, такие как нитевидные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии кодирующих полипептид векторов, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что приводит к получению полипептида с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. См. Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004), и Li et al., *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006).

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии (гликозилированных) полипептидов также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые можно использовать в сочетании с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. Культуры клеток растений также можно использовать в качестве хозяев. См., например, патенты США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (в которых описана технология PLANTIBODIESTM для получения антител в трансгенных растениях). Клетки позвоночных также можно использовать в качестве хозяев. Например, можно использовать линии клеток млекопитающих, которые адаптированы для роста в суспензии. Другими примерами применимых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7), линия клеток почки эмбриона человека (клетки 293 или 293T, описанные, например, в Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)), клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки Сертоли мышей (клетки TM4, описанные, например, в Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), клетки почки обезьяны (CV1), клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76), клетки карциномы шейки матки человека (HELA), клетки почки собаки (MDCK), клетки печени серой крысы (BRL 3A), клетки легких человека (W138), клетки печени человека (Hep G2), клетки опухоли молочной железы мышей (MMT 060562), клетки TRI (описанные, например, в Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие применимые линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), включая dhfr- клетки CHO (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); и линии клеток миеломы, такие как YO, NS0, P3X63 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции белков, см., например, в Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003). Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки бактерий и клетки растений, если называть лишь некоторые, но также клетки, находящиеся в организме трансгенного животного, трансгенного растения или в культивируемой растительной или животной ткани. В одном

варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, предпочтительно клетку млекопитающего, такую как клетка яичника китайского хомяка (СНО), клетка почки эмбриона человека (НЕК) или лимфоидная клетка (например, клетка Y0, NS0, Sp20). Стандартные технологии для экспрессии чужеродных генов в этих системах известны в данной области техники. Клетки, экспрессирующие полипептид, содержащий тяжелую или легкую цепь иммуноглобулина, можно конструировать так, чтобы они также экспрессировали другую цепь иммуноглобулина, чтобы экспрессируемый продукт представлял собой иммуноглобулин, который имеет как тяжелую, так и легкую цепь.

В одном аспекте представлен способ получения агонистического антитела к LTBR или его биспецифического агонистического антитела к LTBR или его полипептидных фрагментов, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие агонистическое антитело к LTBR или его биспецифическое агонистическое антитело к LTBR или его полипептидные фрагменты, как представлено в данном документе, в условиях, подходящих для экспрессии агонистического антитела к LTBR или его биспецифического агонистического антитела к LTBR или его полипептидных фрагментов, и выделение агонистического антитела к LTBR или его биспецифического агонистического антитела к LTBR или его полипептидных фрагментов из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяев).

Агонистические антитела к LTBR или биспецифические агонистические антитела к LTBR, полученные, как описано в данном документе, могут быть очищены известными в данной области техники методиками, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, эксклюзионная хроматография и тому подобное. Фактические условия, используемые для очищения конкретного белка, будут зависеть частично от факторов, таких как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность и т.д., и будут очевидны для специалистов в данной области техники. Для аффинной хроматографической очистки можно использовать антитело, лиганд, рецептор или антиген, с которыми связывается агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR. Например, для аффинной хроматографической очистки антител можно использовать матрицу с белком А или белком G. Последовательную аффинную

хроматографию с белком А или G и эксклюзионную хроматографию можно использовать для выделения антигенсвязывающей молекулы по сути так, как описано в данном документе. Чистота агонистического антитела к LTBR или биспецифического агонистического антитела к LTBR или его фрагментов может
5 быть определена любым из множества хорошо известных аналитических методов, включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и тому подобное. Например, было показано, что агонистические антитела к LTBR или биспецифические агонистические антитела к LTBR, экспрессируемые, как описано в примерах, являются интактными и должным
10 образом собранными, как продемонстрировано с помощью восстанавливающего и невосстанавливающего SDS-PAGE-электрофореза.

Анализы

Агонистические антитела к LTBR или биспецифические агонистические антитела к LTBR, представленные в данном документе, могут быть
15 охарактеризованы по их связывающим свойствам и/или биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области техники. В частности, их характеристики получают с помощью анализов, более подробно описанных в примерах.

1. Анализ связывания

Связывание агонистических антител к LTBR или биспецифических агонистических антител к LTBR, представленных в данном документе, с соответствующими клетками, экспрессирующими мишени, может быть оценено, например, с использованием клеточной линии фибробластов мыши, экспрессирующей белок активации фибробластов человека (FAP), и анализа
25 методом проточной цитометрии (FACS). Связывание биспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в данном документе, с LTBR может быть определяются с использованием клеток CHO-K1, сконструированных для сверхэкспрессии LTBR человека, яванского макака или мыши, как описано в примере 5.1.

2. Анализ активности

Агонистические антитела к LTBR или биспецифические агонистические антитела к LTBR, описанные в данном документе, тестируют в отношении биологической активности. Биологическая активность может включать
30 эффективность и специфичность биспецифических антигенсвязывающих

молекул. Эффективность и специфичность продемонстрированы с помощью анализов, измеряющих их способность активировать ICAM в эндотелиальных клетках человека и раковых фибробластах (CAF) *in vitro* (пример 4). Активацию LTBR можно дополнительно измерить посредством активации стромальными клетками генов воспаления и развития, таких как молекулы адгезии (ICAM и VCAM) и хемоаттрактанты (CXCL9, CXCL10 и CXCL11) (пример 5.2).

Фармацевтические композиции, составы и пути введения

В дополнительном аспекте представлены фармацевтические композиции, содержащие любое из агонистических антител к LTBR или биспецифических агонистических антител к LTBR, представленных в данном документе, например, для применения в любом из нижеприведенных терапевтических способов. В одном аспекте фармацевтическая композиция содержит любое из агонистических антител к LTBR или биспецифических агонистических антител к LTBR, представленных в данном документе, и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит любое из агонистических антител к LTBR или биспецифических агонистических антител к LTBR, представленных в данном документе, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, как описано ниже.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, содержат терапевтически эффективное количество одного или более агонистических антител к LTBR или биспецифических агонистических антител к LTBR, растворенных или диспергированных в фармацевтически приемлемом носителе. Фразы «фармацевтически или фармакологически приемлемый» относятся к молекулярным объектам и композициям, которые в общем случае являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях, т.е. не вызывают нежелательную, аллергическую или другую неблагоприятную реакцию при введении животному, такому как, например, человек, в зависимости от ситуации. Получение фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере одно агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело к LTBR и необязательно дополнительный активный ингредиент, будет известно специалистам в данной области техники в свете настоящего изобретения, как показано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, включенной в

данный документ посредством ссылки. В частности, композиции представляют собой лиофилизированные составы или водные растворы. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» включает любые и все растворители, буферы, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные средства, противогрибковые средства), изотонические средства, соли, стабилизаторы и их комбинации, как известно специалисту в данной области техники.

Исходные композиции включают разработанные для введения путем инъекции, например, подкожной, интрадермальной, внутриочаговой, внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, интратекальной или внутрибрюшинной инъекции. Для инъекций агонистические антитела к LTBR или биспецифические агонистические антитела к LTBR могут быть включены в состав в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Раствор может содержать вспомогательные средства, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. В качестве альтернативы, агонистические антитела к LTBR или биспецифические агонистические антитела к LTBR могут находиться в форме порошка для конституции с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед применением. Стерильные растворы для инъекций получают посредством включения агонистических антител к LTBR или биспецифических агонистических антител к LTBR в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными ниже, при необходимости. Стерильность можно легко обеспечить, например, посредством фильтрации через стерильные фильтровальные мембраны. В общем случае дисперсии готовят путем внесения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и/или другие ингредиенты. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, суспензий или эмульсий предпочтительными способами приготовления являются технологии вакуумной сушки или сублимационной сушки, которые позволяют получать порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный необходимый ингредиент из предварительно стерильно-профильтрованной

жидкой среды. При необходимости жидкую среду следует должным образом забуферить, а жидкому растворителю перед инъекцией сначала придать изотоничность с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Композиция должна быть стабильной в условиях производства и хранения и защищенной от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Следует понимать, что загрязнение эндотоксинами следует свести к минимальному безопасному уровню, например, менее 0,5 нг/мг белка. Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлсодержащие комплексы (например, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG). Водные инъекционные суспензии могут содержать соединения, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит, декстран и т.п. Не обязательно суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы или вещества, которые повышают растворимость соединений, для возможности получения высококонцентрированных растворов. Кроме того, суспензии активных соединений можно готовить в виде подходящих масляных инъекционных суспензий. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеаты или триглицериды, или липосомы.

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулах, полученных, например, с помощью методик коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах для доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие методики описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие полипептид, причем матрицы находятся в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. В конкретных вариантах осуществления длительное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто путем использования в композициях средств, замедляющих всасывание, таких как, например, моностеарат алюминия, желатин или их комбинации.

Помимо ранее описанных композиций антигенсвязывающие молекулы также можно готовить в виде депо-препаратов. Такие составы пролонгированного действия можно вводить путем имплантации (например, подкожной или внутримышечной) или путем внутримышечной инъекции. Таким образом, например, слитые белки могут быть смешаны с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменными смолами, или в виде умеренно растворимых производных, например, умеренно растворимой соли.

Фармацевтические композиции, содержащие агонистические антитела к LTBR или биспецифические агонистические антитела к LTBR, раскрытые в данном документе, могут быть получены посредством обычного смешивания, растворения, эмульгирования, инкапсулирования, захвата или лиофилизации. Фармацевтические композиции можно составлять традиционным образом, используя один или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ, которые облегчают обработку белков в препараты, которые можно использовать в фармацевтических целях. Надлежащий состав зависит от выбранного пути введения.

Агонистические антитела к LTBR или биспецифические агонистические антитела к LTBR могут быть включены в композицию в форме свободной кислоты или основания, нейтральной или солевой формы. Фармацевтически приемлемыми солями являются соли, которые по сути сохраняют биологическую активность свободных кислоты или основания. Они включают соли присоединения кислот, например, образуемые со свободными аминогруппами белковой композиции или образуемые с неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислота. Соли, образуемые со свободными карбоксильными группами, также можно получать из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа; или таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин. Фармацевтические соли, как правило, более растворимы в водных и других протонных растворителях, чем соответствующие формы свободных оснований.

Композиции в данном документе также могут содержать более одного активного ингредиента, необходимого для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно те, которые обладают комплементарной активностью, которая не оказывает неблагоприятного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты приемлемо присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели.

Составы, подлежащие применению для введения *in vivo*, как правило, являются стерильными. Стерильность можно легко обеспечить, например, посредством фильтрации через стерильные фильтровальные мембраны.

25 **Терапевтические способы и композиции**

Любое из агонистических антител к LTBR или биспецифических агонистических антител к LTBR, представленных в данном документе, в частности, биспецифические агонистические антитела к LTBR, можно применять в терапевтических способах. Для применения в терапевтических способах биспецифические агонистические антитела к LTBR могут быть включены в состав, введены и введены способом, соответствующим надлежащей медицинской практике. Факторы, которые необходимо учитывать в этом контексте, включают конкретное нарушение, подлежащее лечению, конкретное молокопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного

пациента, причину нарушения, место доставки средства, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам.

В одном аспекте представлены агонистические антитела к LTBR или биспецифические агонистические антитела к LTBR для применения в качестве
5 лекарственного препарата.

В дополнительных аспектах представлены биспецифические агонистические антитела LTBR, описанные в данном документе, для применения в индуцировании иммунной стимуляции путем активации раковых фибробластов (CAF) или эндотелиальных клеток. Кроме того, биспецифические
10 антигенсвязывающие молекулы, описанные в данном документе, предназначены для (i) лечения рака, (ii) задержки прогрессирования рака и (iii) продления выживаемости пациента, страдающего от рака, в частности, в присутствии FAP-экспрессирующих клеток. В конкретном аспекте представлены биспецифические агонистические антитела к LTBR для применения в лечении заболевания, в
15 частности, для применения в лечении рака.

В определенных аспектах представлены агонистические антитела к LTBR или биспецифические агонистические антитела к LTBR, описанные в данном документе, для применения в способе лечения. В одном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, описанное в данном
20 документе, для применения в лечении заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR для применения в способе лечения индивидуума, имеющего заболевание, включающем введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества биспецифического агонистического антитела к LTBR. В определенных аспектах подлежащее
25 лечению заболевание представляет собой рак. Субъект, пациент или «индивидуум», нуждающийся в лечении, как правило, представляет собой млекопитающее, конкретнее, человека.

В одном аспекте представлен способ i) индуцирования иммунной
30 стимуляции CD40+ антигенпрезентирующими клетками (APC), (ii) стимуляции опухолеспецифического T-клеточного ответа, (iii) индуцирования апоптоза опухолевых клеток, (iv) лечения рака, (v) задержки прогрессирования рака, (vi) продления выживаемости пациента, страдающего от рака, или (vii) лечения инфекций, где способ включает введение терапевтически эффективного

количества биспецифического агонистического антитела к LTBR, раскрытого в данном документе, индивидууму, нуждающемуся в этом.

В дополнительном аспекте представлено применение биспецифического агонистического антитела к LTBR, описанного в данном документе, в производстве или получении лекарственного препарата для лечения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом. В одном аспекте лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения заболевания, включающем введение индивидууму, имеющему заболевание, терапевтически эффективного количества лекарственного средства. В определенных аспектах подлежащее лечению заболевание представляет собой пролиферативное нарушение, в частности, рак. Примеры видов рака включают без ограничения рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак матки, рак шейки матки, рак эндометрия, рак пищевода, рак толстой кишки, колоректальный рак, ректальный рак, рак желудка, рак предстательной железы, рак крови, рак кожи, плоскоклеточную карциному, рак костей и рак почки. Другие примеры рака включают карциному, лимфому (например, ходжкинскую и неходжкинскую лимфому), бластому, саркому и лейкоз. Другие клеточно-пролиферативные нарушения, которые можно лечить, используя биспецифическую антигенсвязывающую молекулу или антитело по изобретению, включают, но не ограничиваются этим, новообразования, находящиеся в: верхней части брюшной полости, костной ткани, молочной железе, пищеварительной системе, печени, поджелудочной железе, брюшной полости, эндокринных железах (надпочечнике, паращитовидной, гипофизе, семенниках, яичниках, вилочковой, щитовидной), глазе, голове и шее, нервной системе (центральной и периферической), лимфатической системе, тазовой области, коже, мягкой ткани, селезенке, области грудной клетки и урогенитальной системе. Также включены предраковые состояния или поражения и раковые метастазы. В определенных вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из почечно-клеточного рака, рака кожи, рака легких, колоректального рака, рака молочной железы, рака головного мозга, рака головы и шеи. Специалисту в данной области техники легко понять, что во многих случаях биспецифическое агонистическое антитело к LTBR может не обеспечить излечение, но может обеспечить благоприятный эффект. В некоторых аспектах физиологическое

изменение, имеющее некоторый благоприятный эффект, также считается терапевтически благоприятным. Таким образом, в некоторых аспектах количество биспецифического агонистического антитела к LTBR или агонистического антитела к LTBR, которое обеспечивает физиологическое изменение, считается «эффективным количеством» или «терапевтически эффективным количеством».

Для предупреждения или лечения заболевания подходящая дозировка биспецифического агонистического антитела к LTBR, описанного в данном документе (при использовании отдельно или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими средствами), будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, пути введения, веса тела пациента, конкретной молекулы, тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению в профилактических или терапевтических целях, от предшествующих или сопутствующих терапевтических вмешательств, от истории болезни пациента и ответа на биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, а также от усмотрения лечащего врача. Практикующий врач, ответственный за введение, в любом случае определит концентрацию активного(активных) ингредиента(ингредиентов) в композиции и соответствующую(соответствующие) дозу(дозы) для каждого отдельного субъекта. В данном документе представлены различные схемы введения доз, включая без ограничения однократное или многократное введение в различные временные точки, болюсное введение и импульсную инфузию.

Биспецифическое агонистическое антитело к LTBR подходящим образом вводят пациенту однократно или в течение серии процедур. В зависимости от типа и тяжести заболевания, начальная кандидатная дозировка биспецифической антигенсвязывающей молекулы для введения пациенту может составлять от приблизительно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1 мг/кг – 10 мг/кг), независимо от того, например, осуществляют ли одно или более отдельных введений или непрерывную инфузию. Одна типичная суточная доза может находиться в диапазоне от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. В случае повторных введений в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение в общем случае проводят до достижения необходимой степени подавления симптомов

заболевания. Одна иллюстративная дозировка биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению находится в диапазоне от приблизительно 0,005 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В других примерах доза также может составлять от приблизительно 1 мкг/кг веса тела, приблизительно 5 мкг/кг веса тела, приблизительно 10 мкг/кг веса тела, приблизительно 50 мкг/кг веса тела, приблизительно 100 мкг/кг веса тела, приблизительно 200 мкг/кг веса тела, приблизительно 350 мкг/кг веса тела, приблизительно 500 мкг/кг веса тела, приблизительно 1 мг/кг веса тела, приблизительно 5 мг/кг веса тела, приблизительно 10 мг/кг веса тела, приблизительно 50 мг/кг веса тела, приблизительно 100 мг/кг веса тела, приблизительно 200 мг/кг веса тела, приблизительно 350 мг/кг веса тела, приблизительно 500 мг/кг веса тела до приблизительно 1000 мг/кг веса тела или более на введение, и любой диапазон, получаемый из этих значений. Из примеров диапазонов, получаемых из значений, перечисленных в данном документе, можно вводить диапазон, составляющий от приблизительно 0,1 мг/кг веса тела до приблизительно 20 мг/кг веса тела, от приблизительно 5 мкг/кг веса тела до приблизительно 1 мг/кг веса тела и т.д., с учетом описанных выше значений. Таким образом, пациенту можно вводить одну или более доз, составляющих приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 5,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Такие дозы можно вводить с интервалами, например, раз в неделю или раз в три недели (например, чтобы пациент получал от приблизительно двух до приблизительно двадцати или, например, приблизительно шести доз антитела). В конкретном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR вводят каждые три недели. В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR вводят каждые две недели. Можно вводить начальную более высокую нагрузочную дозу, за которой следует одна или больше меньших доз. При этом можно применять другие схемы введения доз. Эффективность такой терапии легко контролировать с помощью традиционных методик и анализов.

Биспецифическое агонистическое антитело к LTBR обычно используют в количестве, эффективном для достижения намеченной цели. Для применения для лечения или профилактики патологического состояния биспецифическое агонистическое антитело к LTBR или его фармацевтические композиции вводят или применяют в терапевтически эффективном количестве. Определение

терапевтически эффективного количества вполне соответствует возможностям специалистов в данной области техники, особенно в свете подробного описания изобретения, приведенного в данном документе. В случае системного введения терапевтически эффективную дозу можно оценить изначально по *in vitro* анализу, такому как анализ клеточной культуры. После этого можно составить дозу для применения в животных моделях для достижения диапазона циркулирующей концентрации, который включает IC_{50} , определенную в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения доз, применимых для людей. Начальные дозировки также можно оценивать по *in vivo* данным, например, животных моделей, используя методики, хорошо известные в данной области техники. Специалист в данной области техники легко может оптимизировать введение для людей на основании данных по животным.

Количество и интервал дозировок можно корректировать индивидуально, чтобы обеспечить плазменные уровни биспецифической антигенсвязывающей молекулы по изобретению, которых достаточно для поддержания терапевтического эффекта. Обычные дозировки для пациентов в случае введения путем инъекции находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 до 50 мг/кг/день, как правило, от приблизительно 0,1 до 1 мг/кг/день. Терапевтически эффективные уровни в плазме крови можно обеспечить путем введения нескольких доз каждый день. Уровни в плазме крови можно измерять, например, с помощью ВЭЖХ. В случаях местного введения или селективного поглощения эффективная локальная концентрация биспецифического агонистического антитела к LTBR может не быть связана с концентрацией в плазме крови. Специалист в данной области техники сможет оптимизировать терапевтически эффективные местные дозировки без проведения необязательных экспериментов.

Терапевтически эффективная доза биспецифического агонистического антитела к LTBR, описанного в данном документе, обычно обеспечивает терапевтический эффект, не вызывая существенной токсичности. Токсичность и терапевтическую эффективность слитого белка можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур с клеточной культурой или экспериментальными животными. Анализы клеточных культур и исследования на животных можно использовать для определения LD_{50} (дозы, летальной для

50% популяции) и ED_{50} (дозы, терапевтически эффективной в 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс, который может быть выражен как соотношение LD_{50}/ED_{50} . Предпочтительными являются биспецифические агонистические антитела к LTBR, которые демонстрируют большие терапевтические индексы. В одном аспекте биспецифическое агонистическое антитело к LTBR демонстрирует высокий терапевтический индекс. Данные, полученные из анализов клеточных культур и исследований на животных, можно использовать при составлении диапазона дозировок, подходящего для применения человеком. Дозировка предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED_{50} , с небольшой или отсутствующей токсичностью. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от ряда факторов, например, применяемой дозированной формы, используемого пути введения, состояния субъекта и т.п.

15 Точные состав, путь введения и дозировку может выбирать лечащий врач индивидуума с учетом состояния пациента (см., например, Fingl et al., 1975, in: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1, включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Лечащий врач для пациентов, получающих лечение агонистическими антителами к LTBR, будет знать, как и когда прекращать, прерывать или корректировать введение вследствие токсичности, дисфункции органов и тому подобного. И наоборот, лечащий врач также должен знать, как скорректировать лечение до более высоких уровней, если клинический ответ был недостаточным (не допуская токсичности). Величина вводимой дозы при лечении представляющего интерес нарушения будет варьироваться в зависимости от тяжести состояния, подлежащего лечению, пути введения и т. п. Тяжесть состояния можно, например, оценить частично с помощью стандартных методов оценки. Кроме того, доза и, возможно, частота введения дозы также будут варьироваться в соответствии с возрастом, массой тела и ответом каждого отдельного пациента.

Другие средства и средства лечения

Биспецифическое агонистическое антитело к LTBR можно вводить в комбинации с одним или более другими средствами в терапии. Например, агонистическое антитело к LTBR или биспецифическое агонистическое антитело

к LTBR можно вводить совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством. Термин «терапевтическое средство» охватывает любое средство, которое можно вводить для лечения симптома или заболевания у индивидуума, нуждающегося в таком лечении. Такое дополнительное терапевтическое средство может содержать любые активные ингредиенты, подходящие для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно те, которые обладают дополняющими видами активности и не оказывают отрицательного влияния друг на друга. В определенных аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой другое противораковое средство, например, разрушитель микротрубочек, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, интеркалятор ДНК, алкилирующее средство, гормональную терапию, ингибитор киназы, антагонист рецептора, активатор апоптоза опухолевых клеток или антиангиогенное средство. В определенных аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой иммуномодулирующее средство, цитостатическое средство, ингибитор клеточной адгезии, цитотоксическое или цитостатическое средство, активатор клеточного апоптоза или средство, которое повышает чувствительность клеток к индукторам апоптоза.

Таким образом, представлены биспецифические агонистические антитела к LTBR или фармацевтические композиции, содержащие их, для применения в лечении рака, где биспецифическую антигенсвязывающую молекулу вводят в комбинации с химиотерапевтическим средством, лучевой терапией и/или другими средствами для применения в иммунотерапии рака.

Такие другие средства подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предполагаемой цели. Эффективное количество таких других средств зависит от количества используемого биспецифического агонистического антитела к LTBR, типа нарушения или лечения и других факторов, обсуждавшихся выше. Биспецифические агонистические антитела к LTBR обычно применяют в тех же дозировках и со способами введения, которые описаны в данном документе, или от приблизительно 1 до 99% дозировок, описанных в данном документе, или в любой дозировке и любым способом, который эмпирически/клинически определен как подходящий.

Такая комбинированная терапия, отмеченная выше, включает комбинированное введение (когда два или более терапевтических средств

включены в одну и ту же или отдельные композиции) и раздельное введение, и в этом случае введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы или антитела по изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта.

5 В дополнительном аспекте представлено биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, описанное в данном документе ранее, для применения в лечении рака, где биспецифическую антигенсвязывающую молекулу вводят в комбинации с другим иммуномодулятором.

10 Термин «иммуномодулятор» относится к любому веществу, включая моноклональное антитело, которое оказывает воздействие на иммунную систему. Молекулы, раскрытые в данном документе, могут считаться иммуномодуляторами. Иммуномодуляторы могут быть использованы в качестве противоопухолевых средств для лечения рака. В одном аспекте иммуномодуляторы включают без ограничения антитела к CTLA4 (например, ипилимумаб), антитела к PD1 (например, ниволумаб или пембролизумаб),
15 антитела к PD-L1 (например, атезолизумаб, авелумаб или дурвалумаб), антитела к OX-40, антитела к 4-1BB и антитела к GITR. В дополнительном аспекте представлена биспецифическая антигенсвязывающая молекула, описанная в данном документе выше, для применения в лечении рака, где биспецифическую антигенсвязывающую молекулу вводят в комбинации со средством,
20 блокирующим взаимодействие PD-L1/PD-1. В одном аспекте средство, блокирующее взаимодействие PD-L1/PD-1, представляет собой антитело к PD-L1 или антитело к PD1. Конкретнее, средство, блокирующее взаимодействие PD-L1/PD-1, представляет собой антитело к PD-L1, в частности, антитело к PD-L1,
25 выбранное из группы, состоящей из атезолизумаба, дурвалумаба, пембролизумаба и ниволумаба. В одном конкретном аспекте средство, блокирующее взаимодействие PD-L1/PD-1, представляет собой атезолизумаб (MPDL3280A, RG7446). В другом аспекте средство, блокирующее взаимодействие PD-L1/PD-1, представляет собой антитело к PD-L1, содержащее
30 переменный домен тяжелой цепи VH(PDL-1) с SEQ ID NO:313 и переменный домен легкой цепи VL(PDL-1) с SEQ ID NO:314. В другом аспекте средство, блокирующее взаимодействие PD-L1/PD-1, представляет собой антитело к PD-L1, содержащее переменный домен тяжелой цепи VH(PD-L1) с SEQ ID NO:315 и переменный домен легкой цепи VL(PD-L1) с SEQ ID NO:316. В другом

аспекте средство, блокирующее взаимодействие PD-L1/PD-1, представляет собой антитело к PD1, в частности, антитело к PD1, выбранное из пембролизумаба или ниволумаба. Такие другие средства подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предполагаемой цели.

5 Эффективное количество таких других средств зависит от количества используемого биспецифического агонистического антитела к LTBR, типа нарушения или лечения и других факторов, обсуждавшихся выше. Биспецифические агонистические антитела к LTBR, описанные выше в данном документе, обычно применяют в тех же дозировках и со способами введения,
10 которые описаны в данном документе, или от приблизительно 1 до 99% дозировок, описанных в данном документе, или в любой дозировке и любым способом, который эмпирически/клинически определен как подходящий.

Такие комбинированные средства терапии, отмеченные выше, включают комбинированное введение (когда два или более терапевтических средств
15 включены в одну и ту же или отдельные композиции) и отдельное введение, и в этом случае введение биспецифического агонистического антитела к LTBR может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта.

Готовые изделия

20 В другом аспекте представлено готовое изделие, содержащее материалы, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностики вышеуказанных нарушений. Готовое изделие содержит контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку, находящиеся на нем или связанные с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты для IV введения
25 раствора и т.д. Контейнеры могут быть выполнены из ряда материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией эффективна для лечения, предотвращения и/или диагностики патологического состояния, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой
30 пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой гиподермической иглой для инъекции). По меньшей мере одно активное средство в композиции представляет собой биспецифическое агонистическое антитело к LTBR, раскрытое в данном документе.

На этикетке или на вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного патологического состояния. Кроме того, изделие может содержать (а) первый контейнер с композицией, содержащейся в нем, где композиция содержит биспецифическое агонистическое антитело к LTBR; и (б) второй контейнер с композицией, содержащейся в нем, где композиция содержит дополнительное цитотоксическое или иное терапевтическое средство. Готовое изделие в этом варианте осуществления может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, на котором указано, что композиции можно применять для лечения конкретного патологического состояния.

В качестве альтернативы или в качестве дополнения готовое изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он также может содержать другие материалы, необходимые с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Таблица Б (последовательности):

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
1	hu LTBR	UniProt № P36941 MLLPWATSAP GLAWGPLVLG LFGLLAASQP QAVPPYASEN QTCRDQEKEY YEPQHRICCS RCPPGTYVSA KCSRIRDVC ATCAENSYNE HWNLYTICQL CRPCDPVMGL EEIAPCTSKR KTQCRCQPGM FCAAWALECT HCELLSDCPP GTEAELKDEV GKGNHCVPC KAGHFQNTSS PSARCQPHTR CENQGLVEAA PGTAQSDTTC KNPLEPLPPE MSGTMLMLAV LLPLAFFLLL ATVFSCIWKS HPSLCRKLGS LLKRRPQGEG PNPVAGSWEP PKAHPYFPDL VQPLLISGD VSPVSTGLPA APVLEAGVPQ QQSPLDLTRE PQLEPGEQSQ VAHGTNGIHV TGGSMITIGN IYIYNGPVLG GPPGPGDLPA TPEPPYPIPE EGDPGPPGLS TPHQEDGKAW HLAETEHC GA TPSNRGPRNQ FITHD
2	hu FAP	UniProt № Q12884, версия 168 MKTWVKIVFG VATSAVLALL VMCIVLRPSR VHNSEENTMR ALTLKDILNG TFSYKTFPPN WISGQEYLHQ SADNNIVLYN IETGQSYTIL SNRTMKSVNA SNYGLSPDRQ FVYLEDYSK LWRYSYTATY YIYDLSNGEF VRGNELPRPI QYLCWSPVGS KLAYVYQNNI YLKQRPGDPP FQITFNGREN KIFNGIPDWV YEEEMLATKY ALWWSPNGKF LAYAEFNDTD IPVIAYSYYG DEQYPRITINI PYPKAGAKNP VVRIFIIDTT

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		YPAVYVGPQEV PVPAMIASSD YYFSWLTWVT DERVCLQWLK RVQNVSVLSI CDFREDWQTW DCPKTQEHIE ESRTGWAGGF FVSTPVFSYD AISYYKIFSD KDGYKHIHYI KDTVENAIQI TSGKWEAINI FRVTQDSLFI SSNEFEEYPG RRNIYRISIG SYPPSKKCVT CHLRKERCQY YTASFSDYAK YYALVCYGGP IPISTLHDGR TDQEIKILEE NKELENALKN IQLPKKEIKK LEVDEITLWY KMILPPQFDR SKKYPLLIQV YGGPCSQSVR SVFAVNWISY LASKEGMVIA LVDGRGTAHQ GDKLLYAVYR KLGVEYVEDQ ITAVRKFIEM GFIDEKRIAI WGWSYGGYVS SLALASGTGL FKCGIAPVAVP SSWEYASVY TERFMGLPTK DDNLEHYKNS TVMARAEYFR NVDYLLIHGT ADDNVHFQNS AQIAKALVNA QVDFQAMWYS DQNHGLSGLS TNHLYTHMTH FLKQCFSLSD
3	CDR-H1 FAP(4B9)	SYAMS
4	CDR-H2 FAP(4B9)	AIIGSGASTYYADSVKG
5	CDR-H3 FAP(4B9)	GWFGGFNY
6	CDR-L1 FAP(4B9)	RASQSVTSSYLA
7	CDR-L2 FAP(4B9)	VGSRRAT
8	CDR-L3 FAP(4B9)	QQGIMLPPT
9	VH FAP(4B9)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNYWGQGTTLTVSS
10	VL FAP(4B9)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRTGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIK
11	CDR-H1 FAP(28H1)	SHAMS
12	CDR-H2 FAP(28H1)	AIWASGEQYYADSVKG
13	CDR-H3 FAP(28H1)	GWLGNFDY
14	CDR-L1 FAP(28H1)	RASQSVRSYLA
15	CDR-L2 FAP(28H1)	GASTRAT
16	CDR-L3 FAP(28H1)	QQGQVIPPT
17	VH FAP(28H1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHA MSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWLGNFDYWGQGTTLTVSS
18	VL FAP(28H1)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGT KVEIK
19	CDR-H1 FAP (1G1a)	DYNMD
20	CDR-H2 FAP (1G1a)	DIYPNTGGTIYNQKFKG
21	CDR-H3 FAP (1G1a)	FRGIHYAMDY
22	CDR-L1 FAP (1G1a)	RASEVDNYGLSFIN
23	CDR-L2 FAP (1G1a)	GTSNRGS
24	CDR-L3 FAP (1G1a)	QQSNEVPYT
25	VH FAP (1G1a)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDY NMDWVRQAPGQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKF KGRVTMTIDTSTSTVYMESSLRSEDFAVYYCT RFRGIHYAMDYWGQGTITVTVSS
26	VL FAP (1G1a)	EIVLTQSPATLSPGERATLSCRASEVDNYGLS FINWFQKPGQAPRLLIYGTSNRGSIPARFSGS

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGTKVEIK
27	CDR-H1 LTBR (9459)	SYTMN
28	CDR-H2 LTBR (9459)	GVAPSGDRTYTDSVKG
29	CDR-H3 LTBR (9459)	GFAFTN
30	CDR-L1 LTBR (9459)	RASQGISSALA
31	CDR-L2 LTBR (9459)	DASSLDS
32	CDR-L3 LTBR (9459)	QQYNNYPLT
33	VH LTBR (9459)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMNWVRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRTYTDSVKGRFTISRDNKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQGFAFTNWGQGTMTVSS
34	VL LTBR (9459)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWFQQKPGKAPKRLIFDASSLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKVEMK
35	CDR-H1 LTBR (9452)	SYPMT
36	CDR-H2 LTBR (9452)	LISPSGATTYYADSVKG
37	CDR-H3 LTBR (9452)	NHYPDDVIKNYYFYGVVDV
38	CDR-L1 LTBR (9452)	RASQDISNYLN
39	CDR-L2 LTBR (9452)	AASSLQS
40	CDR-L3 LTBR (9452)	QQTHTIPYS
41	VH LTBR (9452)	EVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYPMTWVRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNHYPDDVIKNYYFYGVVDVWGQGTITVSS
42	VL LTBR (9452)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFANYCQQTHTIPYSFGQGTNLEIK
43	CDR-H1 LTBR (0080)	YYAMT
44	CDR-H2 LTBR (0080)	VINSGGGTYTDSVKG
45	CDR-H3 LTBR (0080)	ASTADV
46	CDR-L1 LTBR (0080)	QASQGISNYLS
47	CDR-L2 LTBR (0080)	AASSLES
48	CDR-L3 LTBR (0080)	QQYNSYSLT
49	VH LTBR (0080)	EVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMTWVRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYTDSVKG RFTMSRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGTITVSS
50	VL LTBR (0080)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLSWYQQKPGKAPKRLIFAASSLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGTKLEIK
51	CDR-H1 LTBR (9450)	SYVMK
52	CDR-H2 LTBR (9450)	SISGSGGRPFYADSVKG
53	CDR-H3 LTBR (9450)	DMDV
54	CDR-L1 LTBR (9450)	RASQDISSFLK
55	CDR-L2 LTBR (9450)	AASALQS
56	CDR-L3 LTBR (9450)	QQYNTYPLT
57	VH LTBR (9450)	EVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYVMKWFRQAPGKGLEWVSSISGSGGRPFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAN DMDVWGQGTITVSS
58	VL LTBR (9450)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSFLKWYQQKPGKAPTLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTK

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		VDIK
59	CDR-H1 LTBR (0079)	SYAMS
60	CDR-H2 LTBR (0079)	VITGSSSSIDYADSVKG
61	CDR-H3 LTBR (0079)	GGSGVWSISTDFDY
62	CDR-L1 LTBR (0079)	QASQDISNYLN
63	CDR-L2 LTBR (0079)	AASSLHS
64	CDR-L3 LTBR (0079)	QQSHSTPPT
65	VH LTBR (0079)	EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSVITGSSSSIDYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGG GSGVWSISTDFDYWGQGTLTVSS
66	VL LTBR (0079)	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCQASQDISNYLN WYQQKPGKAPKHLIYAASSLHSGVPSRFSGSGS GAYFTLTITSLQPEDFATYYCQQSHSTPPTFGPGT KVDIK
67	CDR-H1 LTBR (9457)	NYAMT
68	CDR-H2 LTBR (9457)	EISGSGGSTYYADSVKG
69	CDR-H3 LTBR (9457)	DDDGAYGTMDV
70	CDR-L1 LTBR (9457)	RASQDISNYLN
71	CDR-L2 LTBR (9457)	AASALQS
72	CDR-L3 LTBR (9457)	QHYKSYPT
73	VH LTBR (9457)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MTWVRQAPGKGLEWVSEISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DDDGAYGDTMDVWGQGTITVSS
74	VL LTBR (9457)	DIQMTQSPSSLASIGDRVTITCRASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASALQSGVPSRFSGSGGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQHYKSYPTFGQGTK VEIR
75	CDR-H1 LTBR (0064)	NTYIH
76	CDR-H2 LTBR (0064)	RIDPTNGNTICTEKFN
77	CDR-H3 LTBR (0064)	TTLTTPDSFAY
78	CDR-L1 LTBR (0064)	KASQNIYKYLN
79	CDR-L2 LTBR (0064)	STNILQT
80	CDR-L3 LTBR (0064)	QKYYSGFT
81	VH LTBR (0064)	EVQLQQYGAELGKPGTSVKLSCKVSGYNIGNTY IHWVIQRPKGKLEWIGRIDPTNGNTICTEKFNK ATLTADLSSNTAYMQLSQLKSDDTAIYFCAPITL TTPDSFAYWGQGTLTVSS
82	VL LTBR (0064)	DIQMTQSPSQLSASVGDRVTLSCASQNIYKYLN WYQQKLGEAPRLLIYSTNILQTGIPSRFSGSGGT DYTLTISSLQPEDAATYFCQKYYSGFTFGSGTKL EMK
83	CDR-H1 LTBR (5929)	SYAIS
84	CDR-H2 LTBR (5929)	GIPIFGTANYAQKFQG
85	CDR-H3 LTBR (5929)	PSYYLDGWLDY
86	CDR-L1 LTBR (5929)	KSSQSVLYSSNNKNYLA
87	CDR-L2 LTBR (5929)	WASTRES
88	CDR-L3 LTBR (5929)	SQYYTTHYT
89	VH LTBR (5929)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQG RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARPS YLDGWLDYWGQGTITVSS
90	VL LTBR (5929)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYYTT HYTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
91	CDR-H1 LTBR (7213)	SYAIS
92	CDR-H2 LTBR (7213)	GIPIHGTANYAQKFQG
93	CDR-H3 LTBR (7213)	PSYLDGWLDY
94	CDR-L1 LTBR (7213)	KSSQSVLYSSNNKNYLA
95	CDR-L2 LTBR (7213)	WASTRES
96	CDR-L3 LTBR (7213)	SQYYTTHYT
97	VH LTBR (7213)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIPIHGTANYAQKFQG RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPS YYLDGWLDYWGQGTITVTVSS
98	VL LTBR (7213)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYYTT HYTFGQGTKVEIK
99	VH LTBR (CBE11)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MYWFRQAPGKGLEWVATISDGGSYTYPPDSVK GRFTISRDNKNSLYLQMSSLRAEDVAVYYCAR EENGNFYFDYWGQGTITVTVSS
100	VL LTBR (CBE11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAGQDIKS YLS WYQQKPGKAPKLLIYYATRLADGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGGG TKLEIK
101	CDR-H1 LTBR (CBE11)	DYYMY
102	CDR-H2 LTBR (CBE11)	TISDGGSYTYPPDSVKG
103	CDR-H3 LTBR (CBE11)	EENGNFYFDY
104	CDR-L1 LTBR (CBE11)	KAGQDIKS YLS
105	CDR-L2 LTBR (CBE11)	YATRLAD
106	CDR-L3 LTBR (CBE11)	LQHGESPWT
107	P1AF0532, выступ HC, LTBR, шитое	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYYTT HYTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSP
108	P1AF0532, LC, LTBR, шитое	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQG RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPS YYLDGWLDYWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADY EKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
109	P1AF0532, впадина HC, FAP с зарядами	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDVAVYYCAK GWFGGFNWYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTK VDEK VEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP
110	P1AF0532, LC, FAP с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
111	P1AF9728, выступ HC, LTBR	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIPIHGTANYAQKFQG RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPS YYLDGWLIDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSP
112	P1AF9728, LC, LTBR	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYYTT HYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
113	P1AF9728, впадина HC, FAP, сшитое	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNWYWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCV VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP
114	P1AF9728, LC, FAP, сшитое	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSC
115	P1AG7504, выступ HC, LTBR	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIPIHGTANYAQKFQG RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPS

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		<p>YYLDGWLDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFC SVM HEALHNHYTQKSLSPG</p>
116	P1AG7504, LC, LTBR	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYTT HYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
117	P1AG7504, впадина HC, FAP, считое	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNWYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL T KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSGDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSPG</p>
118	P1AG7504, LC, FAP, считое	<p>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCD</p>
119	P1AF0535, выступ HC, LTBR, считое	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSFLKW YQQKPGKAP TLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTK VDIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPETCVVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDGSFFL YSKL TVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSL S LSP</p>
120	P1AF0535, LC, LTBR, считое	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYV MKWFRQAPGKGLEWVSSISGSGGRPFYADSVK GRFTISRDN SKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCAN DMDVWGQGT VTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG</p>

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
121	P1AF0535, впадина HC, FAP с зарядами	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWF GGFNYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTK VDEK VEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP
122	P1AF0535, LC, FAP с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
123	P1AG7506, выступ HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSFLKW YQQKPGKAP TLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTK VDIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSPG
124	P1AG7506, LC, LTBR, сшитое	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTVSSYV MKWFRQAPGKGLEWVSSISGSGGRPFYADSVK GRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCAN DMDVWGQGT TTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
125	P1AG7506, впадина HC, FAP, с зарядами	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWF GGFNYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTK VDEK VEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
126	P1AG7506, LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
127	P1AF0534, выступ HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLN WYQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFANYCQQHTHTIPYSFGQGTN LEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SP
128	P1AF0534, LC, LTBR, сшитое	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYP MTWVRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSVK GRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK NHYPDDVIKNIYFYGVVDVWGQGTVTVSSASV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
129	P1AF0534, впадина HC, FAP с зарядами	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVVTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVEDEKVEPKSCDKTHTCPPCP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP
130	P1AF0534, LC, FAP с зарядами	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
131	P1AG7505, выступ HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLN WYQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFANYCQQHTHTIPYSFGQGTN LEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQD WLNKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
132	P1AG7505, LC, LTBR, сшитое	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYP MTWVRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSVK GRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK NHYPDDVIKNYYFYGV DVWVGQTTVTVSSASV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSS TLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
133	P1AG7505, впадина HC, FAP, с зарядами	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFN YWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVTV PSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTK VDEK VEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
134	P1AG7505, LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRA TGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSS TLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
135	P1AF5257, выступ HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLASIGDRVTITCRASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQHYKSYPTFGQGTK VEIRSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQD WLNKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SP
136	P1AF5257, LC, LTBR, сшитое	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MTWVRQAPGKGLEWVSEISGGSTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DDDGAYGDTMDVWGQGT TTVSSASVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSS TLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
137	P1AF5257, впадина HC, FAP, с зарядами	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP
138	P1AF5257, LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
139	P1AF0537, выступ HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALA WFQQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPVSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSP
140	P1AF0537, LC, LTBR, сшитое	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT MNWVRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRITYTDSV KGRFTISRDNKNTLQMTSLRAEDAAIYICAQ GFAFTNWGQGTMTVTSSASVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
141	P1AF0537, впадина HC, FAP с зарядами	EVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP
142	P1AF0537, LC, FAP с зарядами	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
143	P1AG7507, выступ HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQGISSALA WFQQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPVSRFSGSGG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEMKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSVSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSPG
144	P1AG7507, LC, LTBR, сшитое	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT MNWVRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRTYTDSV KGRFTISRDNKNTLDLQMTSLRAEDAAIYCAQ GFAFTNWGQGMVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
145	P1AG7507, впадина HC, FAP, с зарядами	EVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAK GWFGGFNWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVTPSSSLGTQTYI CENVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
146	P1AG7507, LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRTGIPDRFSGSGG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
147	P1AG0694, выступ HC, LTBR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNIGNT YIHWRQAPGKGLEWMGRIDPTNGNTIYAQKF QGRVTSTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTVVYYCA PTTLTPDSFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		VMHEALHNHYTQKSLSLSP
148	P1AG0694, LC, LTBR	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQNIYK YLN WYQQKPGKAPKLLIYSTNILQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYFCQKYYSGFTEFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
149	P1AG0694, впадина HC, FAP, шитое	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDEL T KNQVLSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP
150	P1AG0694, LC, FAP, шитое	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSC
151	P1AF9727, выступ HC, LTBR	EVQLQQYGAELGKPGTSVKLSCKVSGYNIGNTY IHWVIQRPKGLEWIGRIDPTNGNTISTEKFKNK ATLTADLSSNTAYMQLSQLKSDDTAIYFCAPTTL TTPDSFAFYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP
152	P1AF9727, LC, LTBR	DIQMTQSPSQLSASVGDRTLSCKASQNIYK YLN WYQQKLGAEAPRLLIYSTNILQTGIPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDAATYFCQKYYSGFTEFGSGTKL EMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
153	P1AF9727, впадина HC, FAP, шитое	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP
154	P1AF9727, LC, FAP, сшитое	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSC
155	P1AF5260, выступ HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCQASQDISNYLN WYQQKPGKAPKHLIYAASSLHSGVPSRFSGSGS GAYFTLTITSLQPEDFATYYCQQSHSTPPTFGPGT KVDIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSP
156	P1AF5260, LC, LTBR, сшитое	EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSITGSSSSIDYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKG GSGVWSISTDFDYWGQGLTVTSSASVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
157	P1AF5260, впадина HC, FAP, с зарядами	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNWYGQGLTVTSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CENVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP
158	P1AF5260, LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
159	P1AF5261, выступ HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQGISNYLS WYQQKPGKAPKRLIFAASSLESGVPSRFSGSGG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGT

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		KLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
160	P1AF5261, LC, LTBR, шитое	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMTWVRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYYTDSVKG RFTMSRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGTITVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
161	P1AF5261, впадина HC, FAP, с зарядами	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
162	P1AF5261, LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
163	P1AG7508, выступ HC, LTBR, шитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQGISNYLSWYQQKPGKAPKRLIFAAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGT KLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
164	P1AG7508, LC, LTBR, шитое	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMTWVRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYYTDSVKG RFTMSRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAKASTADVWGQGTITVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
170	P1AG5684(2+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
171	P1AG7576(2+1), выступ HC, LTBR - FAP	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYYTT HYTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKG WFGGFNYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD
172	P1AG7576(2+1), LC LTBR, (2x) сшитое	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIPIHGTANYAQKFGG RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPS YLDGWLDYWGQGTITVSSASVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYBREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
173	P1AG7576(2+1), впадина HC, LTBR, сшитое	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYYTT HYTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
174	P1AG7576(2+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
175	P1AG7509(2+1), выступ HC, LTBR - FAP	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYYTT HYTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKG WFGGFNYWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKEPKSCD
176	P1AG7509(2+1), LC LTBR, (2x) сшитое	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIPIHGTANYAQKFFG RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPS YYLDGWLWYWGQGLTVVSSASVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYBREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYE EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
177	P1AG7509(2+1), впадина HC, LTBR, сшитое	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYYTT HYTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
178	P1AG7509(2+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
179	P1AF0544(2+1), выступ HC, LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSFLKW YQQKPGKAPITLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTK VDIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		VKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNYW GQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVEDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPSN TKVDEKVEPKSCD
180	P1AF0544(2+1), LC LTBR, (2x) шпигое	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYV MKWFRQAPGKGLEWVSSISGSGGRPFYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAN DMDVWGQGTITVSSASVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
181	P1AF0544(2+1), впадина HC, LTBR, шпигое	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISFLKW YQQKPGKAPITLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTK VDIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
182	P1AF0544(2+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
183	P1AG7511(2+1), выступ HC, LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISFLKW YQQKPGKAPITLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTK VDIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		LSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGEVQLLESGG GLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDEKVEPKSCD
184	P1AG7511(2+1), LC LTBR, (2x) шитое	EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTVSSYV MKWFRQAPGKGLEWVSSISGSGGRPFYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAN DMDVWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVCLLNNFYPRQAVKVVQWVNDALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
185	P1AG7511(2+1), впадина HC, LTBR, шитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISFLKW YQQKPGKAPITLTIYAASALQSGVPSRFSGSGGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPLTFGGGTK VDIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNYHTQKSLSL SPG
186	P1AG7511(2+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLL NNFYPRQAVKVVQWVNDALQSGNSQESVTEQDS KSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
187	P1AF9729(2+1), выступ HC, LTBR (2x)	EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAAAGFTFSSYP MTWVRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSVK GRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK NHYPDDVIKNIYFYGVVDVWGQGTITVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVVFSCSVMHREALHNYHTQKSLSLSPGKGGG GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAAAG FTFSSYPMTWVRQAPGKGLEWVSLISPSGATTY YADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKNHYPDDVIKNIYFYGVVDVWGQGTITV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSC

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
188	P1AF9729(2+1), LC, LTBR, (2x)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLN WYQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFANYCQQTHTIPYSFGQGTN LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
189	P1AF9729(2+1), впадина HC, FAP, сшитое	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNYWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL T KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKLSLSP
190	P1AF9729(2+1), LC, FAP, сшитое	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSC
191	P1AG7510(2+1), выступ HC, LTBR (2x)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYP MTWVRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSVK GRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK NHYPDDVIKNYYFYGVVDVWGQGTLLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL P PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGGGGGS GGGGSGGGGGGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAAAGFTFSSYPMTWVRQAPGKGLEWVSLI SPSGATTYYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKNHYPDDVIKNYYFYGVVDV WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCD
192	P1AG7510(2+1), LC, LTBR, (2x)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLN WYQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFANYCQQTHTIPYSFGQGTN LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
193	P1AG7510(2+1), впадина HC,	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
	FAP, шитое	MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNYWGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKLSLSPG
194	P1AF7510(2+1), LC, FAP, шитое	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCD
195	P1AF0546(2+1), выступ HC, LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALA WFQQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPVSRFSGSGG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSL LSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDEKVEPKSCD
196	P1AF0546(2+1), LC LTBR, (2x) шитое	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT MNWVRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRYYTDSV KGRFTISRDNKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQ GFAFTNWGQGMVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
197	P1AF0546(2+1), впадина HC, LTBR, шитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALA WFQQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPVSRFSGSGG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		REPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSP
198	P1AF0546(2+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGEVQLLESGG GLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDEKVEPKSCD
199	P1AG7512(2+1), выступ HC, LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALA WFQQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPVSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGEVQLLESGG GLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDEKVEPKSCD
200	P1AG7512(2+1), LC LTBR, (2x) сшитое	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT MNWVRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRTYTDSV KGRFTISRDNKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQ GFAFTNWGQGMVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVECLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CQYNNYPLTFGGGT
201	P1AG7512(2+1), впадина HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALA WFQQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPVSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
202	P1AG7512(2+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		KDSTYLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
203	P1AG7513(2+1), выступ HC, LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLS WYQQKPGKAPKRLIFAAASSLESGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNYSYSLTFGGGT KLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSPGGGGSGGGSGGGSGGGGGEVQLLESGG GLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNW GQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDEKVEPKSCD
204	P1AG7513(2+1), LC LTBR, (2x) сшитое	EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSYYA MTWVRQAPGKLEWIGVINSGGGTYYTDSVKG RFTMSRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAK ASTADVWGQGTITVSSASVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLISKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
205	P1AG7513(2+1), впадина HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLS WYQQKPGKAPKRLIFAAASSLESGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNYSYSLTFGGGT KLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
206	P1AG7513(2+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLINVGSRRTGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
207	P1AG5683(2+1), выступ HC, LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLS WYQQKPGKAPKRLIFAAASSLESGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNYSYSLTFGGGT KLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNY WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDEKVEPKSCD
208	P1AG5683(2+1), LC LTBR, (2x) сшитое	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MTWVRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYYTDSVKG RFTMSRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAK ASTADVWGQGTITVSSASVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
209	P1AG5683(2+1), впадина HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLS WYQQKPGKAPKRLIFAAASLESGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGT KLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
210	P1AG5683(2+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
211	P1AG7575(2+1), выступ HC, LTBR - FAP	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLS WYQQKPGKAPKRLIFAAASLESGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGT KLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNK

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		NTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDEKVEPKSCD
212	P1AG7575(2+1), LC LTBR, (2x) сшитое	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYA MTWVRQAPGKGLEWVINSGGGTYYTDSVKG RFTMSRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAK ASTADVWGQGTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYBREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
213	P1AG7575(2+1), впадина HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLS WYQQKPGKAPKRLIFAASSLESGVPSRFSGSGS TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGT KLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
214	P1AG7575(2+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
215	P1AG1326, выступ HC, LTBR, сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAGQDIKSYLS WYQQKPGKAPKLLIYYATRLADGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGGG TKLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSP
216	P1AG1326, LC, LTBR, сшитое	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYA MYWFRQAPGKGLEWVATISDGGSYTYYPDSVK GRFTISRDNKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCAR EENGNYFYFDYWGQGTVTVSSASVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYBREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
217	P1AG1326, впадина HC, FAP, с зарядами	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFVGGFNYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CENVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP
218	P1AG1326, LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRTGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
219	P1AF4664, HC, KK+, LTBR, с зарядами (1+1 суррогат мыши)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYA MTWVRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYYTDSVKG RFTMSRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAK ASTADVWGQGTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSWPSQVTCN VAHPASSTKVDEKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV FIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGR PKAPQVYTIPTPKQMAKDKVSLTCMITNFFPED ITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYS KLNQVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKS LSHSPG
220	P1AF4664, LC, LTBR, с зарядами (1+1 суррогат мыши)	DIQMTQSPSSLSASVIGDRVTITCQASQGISNYLS WYQQKPGKAPKRLIFAAASSLESGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGT KLEIKRADAAPTVSIFPPSSRKLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCETHKTST PIVKSFNRNEC
221	P1AF4664, HC, DD-, FAP, сшитое (1+1 суррогат мыши)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGT KVEIKSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLG LVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTVPSSWPSQVTCNVVAHPASSTKVD KKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHT AQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFK CRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPTPK EQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPA ENYDNTQPIMDTDGSYFVYSDLNQKSNWEAG NTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG
222	P1AF4664, LC, FAP, сшитое (1+1 суррогат мыши)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHA MSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAK GWLGNFDYWGQGTITVTSRADAAPTVSIFPPS SEQLTSGGASVVCFLNNTFYPKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYE RHNSYTCETHKTSTSPIVKSFNRNEC

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
223	P1AF4674, HC, KK+ LTBR, с зарядами – FAP, сшитое (2+1 суррогат мыши)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSYYA MTWVRQAPGKGLEWIGVINS GG GTYYTDSVKG RFTMSRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAK ASTADVWGQGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSWPSQVTVCN VAHPASSTKVDEKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV FIFPPKPKDVL TITLTPK VTCVVVAISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAF GA PIEKTISKTKGR PKAPQVYTIPPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPED ITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYS KLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKS LSHSPGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSHAMSWVRQA PGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGLGNFDY WGQGT LVTSSRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGA SVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSW TDQDSKDYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTC EA THKTSTSPIVKSFN RNEC
224	P1AF4674, LC, LTBR, с зарядами (2+1 суррогат мыши)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQGISNYLS WYQQKPGKAPKRLIFAAASLESGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYSLTFGGGT KLEIKRADAAPTVSIFPPSRKLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSK DYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTC EATHKTST S PIVKSFN RNEC
225	P1AF4674, HC, DD-, LTBR, с зарядами (2+1 суррогат мыши)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSYYA MTWVRQAPGKGLEWIGVINS GG GTYYTDSVKG RFTMSRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAK ASTADVWGQGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSWPSQVTVCN VAHPASSTKVDEKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV FIFPPKPKDVL TITLTPK VTCVVVAISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAF GA PIEKTISKTKGR PKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPED ITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYS DLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKS LSHSPG
226	P1AF4674, LC, FAP, сшитое (2+1 суррогат мыши)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRSYLA WYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGT KVEIKSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLG LVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTPSSWPSQVTVCNVAHPASSTKVD KKIVPRDC
227	P1AE5929, HC (hu IgG1 PGLALA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYA ISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQG RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARPS YYLDGWL D YWGQGTVTVSSASTKGPSVFLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
228	P1AE5929, LC (hu IgG1 PG LALA)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNKYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
229	P1AF7213, HC (hu IgG1 PG LALA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIHGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPSYYLDGWLDFYWGQGTFTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
230	P1AF7213, LC (hu IgG1 PG LALA)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNKYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCSQYYTTHYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
231	P1AE9452, HC (hu IgG1 PG LALA)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFTFSSYPMTWVRQAPGKGLEWVSLISPSGATTYYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNHYPDDVIKNIYFYGVDFVWGQGTFTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
232	P1AE9452, LC (hu IgG1 PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFANYCQQTHTIPYSFGQGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
233	P1AE9450, HC (hu IgG1 PG LALA)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYVMKWFRQAPGKGLEWVSSISGSGGRPFYADSVKGRFTISRDNKSNALYLQMNSLRAEDTAVYYCANDMDVWGQGTFTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALH NHHTQKSLSLSP
234	P1AE9450, LC (hu IgG1 PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSFLKW YQQKPGKAPITLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGT DFLTITSSLPEDFATYYCQYNTYPLTFGGGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
235	P1AE9459, HC (hu IgG1 PG LALA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT MNWVRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRITYTDSV KGRFTISRDNKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQ GFAFTNWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL HNHTQKSLSLSP
236	P1AE9459, LC (hu IgG1 PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALA WFQQKPGKAPKRLIFDASSLDGVPSPRFSGSGSG TDFLTITSSLPEDFATYYCQYNNYPLTFGGGT KVMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
237	P1AF0080, HC (hu IgG1 PG LALA)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYA MTWVRQAPGKGLEWIGVINSGGGTYYTDSVKG RFTMSRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAK ASTADVWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL HNHTQKSLSLSP
238	P1AF0080, LC (hu IgG1 PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISNYLS WYQQKPGKAPKRLIFAAASSLESGVPSRFSGSGSG TDFLTITSSLPEDFATYYCQYNSYSLTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		SPVTKSFNRGEC
239	P1AF0064, HC (hu IgG1 PG LALA)	EVQLQQYGAELGKPGTSVKLSCKVSGYNIGNTY IHWVIQRPGLGLEWIGRIDPTNGNTICTEKFNK ATLTADLSSNTAYMQLSQLKSDDTAIYFCAPTTL TTPDSFAIYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSP
240	P1AF0064, LC (hu IgG1 PG LALA)	DIQMTQSPSQLSASVGDRVTLSCKASQNIYKYLN WYQQKLGAPRLLIYSTNILQTGIPSRFSGSGGT DYTLTISSLQPEDAATYFCQKYSGFTFGSGTKL EMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
241	P1AF0079, HC (hu IgG1 PG LALA)	EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSVITGSSSSIDYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKG GSGVWSISTDFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP
242	P1AF0079, LC (hu IgG1 PG LALA)	DIQMTQSPSFLSASVGDRVITTCQASQDISNYLN WYQQKPGKAPKHLIYAASSLHSGVPSRFSGSGS GAYFTLTITSLQPEDFATYCYCQSHSTPPTFGPGT KVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
243	P1AE9457, HC (hu IgG1 PG LALA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYA MTWVRQAPGKGLEWVSEISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DDDGA YGDTMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP
244	P1AE9457, LC (hu IgG1 PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASIGDRVITTCRASQDISNYLNW

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
	LALA)	YQQKPGKAPKLLIYAASALQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQHYKSYPTFTGQGTK VEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
245	P1AE1873 (CBE11), HC (hu IgG1 PG LALA)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MYWFRQAPGKGLEWVATISDGGSYTYYPDSVK GRFTISRDNANKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCAR EENGNFYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKLSLSP
246	P1AE1873 (CBE11), LC (hu IgG1 PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAGQDIKSYLS WYQQKPGKAPKLLIYYATRLADGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
247	Fc-деплегирующий компонент, kh NC avi B (P1AA0981) (цепь выступа)	GLNDIFEAQKIEWHEDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYT QKLSLSPGK
248	Fc-деплегирующий компонент, kh NC avi B (P1AA0981) (цепь впадины)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSPGKSGGLN DIFEAQKIEWHE
249	одноцепочечный лимфотоксин $\alpha 1\beta 2$ человека avi his (P1AE1235)	KPAAHLIGDPSKQNSLLWRANTDRAFLQDGFSL SNNSLLVPTSGIYFVYSQVVFSGKAYSPKATSSP LYLAHEVQLFSSQYPFHVPLLSQKMOVYPGLQE PWLHSMYHGAAFQLTQGDQLSTHTDGIPHLVLS PSTVFFGAFALGGGLPAAHLIGAPLKGQGLGW ETTKEQAFLTSGTQFSDAEGALPQDGLYYLYC LVGYRGRAPPGGDPQGRSVTLRSSLYRAGGAY GPGTPELLLEGAETVTPVLDPARRQGYGPLWYT SVGFGGLVQLRRGERVYVNISHPDMVDFARGKT FFGAVMVGSGGLPAAHLIGAPLKGQGLGWETT KEQAFLTSGTQFSDAEGALPQDGLYYLYCLVG YRGRAPPGGDPQGRSVTLRSSLYRAGGAYGPG TPELLLEGAETVTPVLDPARRQGYGPLWYTSVG FGGLVQLRRGERVYVNISHPDMVDFARGKTFFG AVMVGSGGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHHH

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
250	одноцепочечный лимфотоксин $\alpha 1\beta 2$ мыши avi his (P1AE1236)	KPAAHLVGYPKQNSLLWRASTDRAFLRHGFSLSNNSLLIPTSGLYFVYSQVVFSGESCSPRAIPTPIYLAHEVQLFSSQYPFHVPLL SAQKSVYPGLQGPWVRSMYQGA VFLLSKGDQLSTHTDGHSHLHFSPSSVFFGAFALGGSGLPAAHLIGAWMSGQGLSWEASQEEAFLRSGAQFSPTHGLALPQDGVYYLYCHVGYRGRTPPAGRSRARSLLRSAL YRAGGAYGRGSPPELLLEGAETVTPVVDPIGYGSLWYTSVGFGGLAQLRSGERVYVNISHPDMVDYRRGKTFFGAVMVGGSGLPAAHLIGAWMSGQGLSWEASQEEAFLRSGAQFSPTHGLALPQDGVYYLYCHVGYRGRTPPAGRSRARSLLRSAL YRAGGAYGRGSPPELLLEGAETVTPVVDPIGYGSLWYTSVGFGGLAQLRSGERVYVNISHPDMVDYRRGKTFFGAVMVGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHH
251	мономерное, huLTBR, ECD (S28-M227), Fc-слитое, avi, биотинилированное (P1AE2835) (цепь выступа)	SQPQAVPPYASENQTCRDQEKEYYEPQHRICCSR CPPGTIVSAKCSRIRDTVCATCAENSYNEHWNYLTICQLCRPCDPVMGLEEIAPCTSKRKTQCRCQPGMFCAAWALECTHCELLSDCPPGTEAELKDEVGKGNHCVCKAGHFQNTSSPSARCQPHTRCENQGLVEAAPGTAQSDTTCKNPLEPLPEMSGTMLMASGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
252	мономерное, huLTBR, ECD (S28-M227), Fc-слитое, avi, биотинилированное (P1AE2835) (цепь впадины)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
253	мономерное, muLTBR, ECD (S28-L223), Fc-слитое, avi, биотинилированное (P1AE4410) (цепь выступа)	SQPQLVPPYRIENQTCWDQDKEYYEPMDHVCCSR CPPGEFVFAVCSRSQDTCVCKTCPHNSYNEHWNYHLSTCQLCRPCDIVLGFEVAPCTSDRKAECRCQPGMSCVYLDNECVHCEEERL VLCQPGTEAEVTD EIMD TDVNCVPCKPGHFQNTSSPRARCQPHTRC EIQGLVEAAPGTSYSDTICKNPPEPGAMLLASGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
254	мономерное, muLTBR, ECD (S28-L223), Fc-слитое, avi, биотинилированное (P1AE4410) (цепь впадины)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
255	мономерное, эктодомен	SQPQVPPYGSSENQTCRDQEKEYYEPHRRICCSR

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
	супоLTBR (S28-M227), Fc, слитое, avi, биотинилированное (P1AE4411) (цепь выступа)	CPPGT YVSAKCSRSRDTVCATCAENSYNEHWNY LTICQLCRPCDPVMGLEEIAPCTSKRKTQCRCQP GMFCAAWALECTHCELLSDCPPGTEAELKDEVG KGNNHCVPCKAGHFQNTSSPSARCQPHTRCEDQ GLVEAAPGTAQSDTTCRNPSESLPPEMSGTMLM ASGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNACTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKS GGLNDIFEAQKIEWHE
256	мономерное, эктодомен супоLTBR (S28-M227), Fc, слитое, avi, биотинилированное (P1AE4411) (цепь впадины)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
257	мономерное, N-концевой LTBR человека (полноразмерный ECD), hu Fc-слитое, IgG1 kih HRYF, avi (P1AE1217) (цепь выступа)	QTCRDQEKEYYEPQHRICCSRPCPGTYVSAKCSR IRDTVCATCAENSYNEHWNYLTICQLCRPCDPV MGLEEIAPCTSKRKTQCRCQPGMFCAAWALECT HCELLSDCPPGTEAELKDEVGKGNNHCVPCKAG HFQNTSSPSARCQPHTRCENQGLVEAAPGTAQS DTTCASGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNACTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
258	мономерное, N-концевой LTBR человека (полноразмерный ECD), hu Fc-слитое, IgG1 kih HRYF, avi (P1AE1217) (цепь впадины)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK
259	Avi-метка	GLNDIFEAQKIEWHE
260	ECD LTBR человека (S28-M227), N- и C-концевое удлиненное - Fc-слитое wt kih HRYF - Avi - His биотинилированное 261(P1AE7979)(цепь выступа)	SQPQAVPPYASENQTCRDQEKEYYEPQHRICCSR CPPGT YVSAKCSRIRDVCATCAENSYNEHWNY LTICQLCRPCDPVMGLEEIAPCTSKRKTQCRCQP GMFCAAWALECTHCELLSDCPPGTEAELKDEVG KGNNHCVPCKAGHFQNTSSPSARCQPHTRCENQ GLVEAAPGTAQSDTTCKNPLEPLPPEMSGTMLM ASGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNACTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKS GGLNDIFEAQKIEWHEGGHHHHHH
261	ECD LTBR человека (S28-M227) N- и C-концевое удлиненное - Fc-слитое wt	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
	kih HRYF - Avi - His биотинилированное (P1AE7979) (цепь впадины)	KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
262	мономерное, N-концевой LTBR яванского макака (полноразмерный ECD), hu Fc-слитое, IgG1 kih HRYF, avi биотинилированное (P1AE2656) (цепь выступа)	QTCRDQEKEYEPRHRICCSRCPPGTYVSAKCSR SRDTVCAATCAENSYNEHWNLYLTICQLCRPCDPV MGLEEIAPCTSKRKTQCRCQPGMFCAAWALECT HCELLSDCPPGTEAELKDEVGKGNHCVPCAG HFQNTSSPSARCQPHTRCEDQGLVEAAPGTAQS DTTCRASGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
263	мономерное, N-концевой LTBR яванского макака (полноразмерный ECD), hu Fc-слитое, IgG1 kih HRYF, avi биотинилированное (P1AE2656) (цепь впадины)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
264	FAP человека - Avi - His биотинилированное (P1AA5347)	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFPPN WISGQEYLHQADNNIVLYNIETGQSYTILSNRT MKSVDNASNYGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSY TATYYIYDLNGEFVRGNELPRPIQYLCWSPVGS KLAYVYQNNIYLKQRPDPPFQITFNGRENKIFN GIPDWWYEEEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEF NDTDIPVIAYSYYGDEQYPRNTINIPYKAGAKNP VVRIFIIDTTYPAYVGPQEVVPAMIASSDYFYS WLTWVTDERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFRED WQTDWCPKTQEHIEESRTGWAGGFFVSTPVFSY DAISYKIFSDKDGYPKHIHYIKDTVENAIQITSGK WEAINIFRVTQDSLFISSNEFEEYPGRRNIYRISIG SYPPSKKCVTCHLRKERCQYTFASFSDYAKYYA LVCYGPPISTLHDGRDQEIKEENKELENAL KNIQLPKEEIKKLEVDEITLWYKMILPPQFDRSK KYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEG MVIALVDGRGTAQFQGDKLLYAVYRKLGVYEVE DQITAVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWYGGYVSSL ALASGTGLFKCGIAPVSSWEYYASVYTERFM GLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIH GTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYS DQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSVDEQ LYFQGGSGGLNDIFEAQKIEWHEARAHHHHHH
265	FAP мыши - Avi - His биотинилированное (P1AD9907)	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTYFPN WISEQEYLHQSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTM KSVNATDYGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYTA TYIYIDLQNGEFVRGYELPRPIQYLCWSPVGSKL AYVYQNNIYLKQRPDPPFQITYTGRENRIFNIGIP DWVYEEEMLATKYALWWSPDGKFLAYVEFNDS DIPIIAYSYYGDGQYPRNTINIPYKAGAKNPVVRV FIVDTTYPHHVGPMEVPVPEMIASSDYFYSWLT WVSSERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWHA WECPKNQEHEVESRTGWAGGFFVSTPAFSQDAT SYKIFSDKDGYPKHIHYIKDTVENAIQITSGKWE

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		AIYIFRVTQDSLFIYSSNEFEGYPGRRNIYRISIGNS PPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFYSYKAKYYALV CYGPGLPISTLHDGRITDQEIQVLEENKELENSLR NIQLPKVEIKKLDGGLTFWYKMLPPQFDRSKK YPLLIQVYGGPCSQSVKSVFVFNWITYLASKEGI VIALVDGRGTAFAQGDKFLHAVYRKLGVYEVED QLTAVRKFIEMGFIDEERIAIWGWSYGGYVSSLA LASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASIYSERFMGL PTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIHGT ADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSYD QNHGILSGRSQNHLYTHMTHFLKQCFSLSDVDE QLYFQGGSGLNDIFEAQKIEWHEARAHHHHHH
266	участок CDR-H2 LTBR (5929)	IPIFG
267	HUJH5.HFc-DO3	CTT GGG CCC TTG GTA CTT GCT GAG GAG ACG GTG ACC AGG G
268	HUJH6.HFc-Do3	CTT GGG CCC TTG GTA CTT GCT GAG GAG ACG GTG ACC GTG G
269	BcPCR_FHLC_leader.fw (TG)	ACA GAG GAA GCT TGC CGC CAC CAT GGA CAT GAG GGT CCC CGC
270	HuCK.Do.2AA	TGA AGA CAG ATG GTG CAG CCA CAG
271	WTRat.VH.FW11	SAR GTV MAG CTG VWG SAG TCW GGR SS
272	WTRat.VH.FW12	SAG GTG MAG CTS SWG SAR WCW GGR SS
273	WTRat.VH.FW13	SAR GTK MAR CTG SWG SAG TCW GGR SS
274	WTRat.VH.FW14	SMG GTG MAG CTK SWK SAG TCW GGW SS
275	WTRat.VH.FW15	AGG TKM MKC TGA WRS ART CWG GMS ST
276	WTRat.VH.FW16	SAG GTR MAG CTG VWR SAG TCW GGR SV
277	WTRat.VH.FW17	AGG TGC AGC TDV WRS AGW CWG GRS SW
278	682.rev do	GGGAAGATGAAGACAGATG
279	WTRat.VK.FW1	GRYRTYSWGWGTGACMCARDCTCCDB
280	WTRat.VK.FW2	GMTRTTGKMTSAMNCARDCWCCAB
281	WTRat.CKappa.Do2	gacgggtgaggatgatgtcttatgaacaa
282	FAР мыши	UniProt no. P97321
283	Домен CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV
284	C-терминальный конец соединителя CH1	EPKSC
285	D-вариант C-терминального конца соединителя CH1	EPKSCD
286	S-вариант C-терминального конца соединителя CH1	EPKSCS
287	Полная шарнирная область	DKTHTCPXCP with X being S or P
288	Средняя шарнирная область	HTCPXCP with X being S or P
289	Короткая шарнирная область	CPXCP with X being S or P
290	Домен CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQES TYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAK
291	Домен CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
292	Fc IgG1, европеоидный аллотип	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
293	Fc IgG1, афроамериканский аллотип	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
294	Fc IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKTV CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPE NYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
295	Fc IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVELK TPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCD TPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSV LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF KWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFQKSL LSLSPGK
296	Fc IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNVNHNKPSNTKVDKRVESK YGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
297	LTBR мышцы Mus musculus	Uniprot Acc. NO. B2RRV3 MRLPRASSPC GLAWGPLLLG LSGLLVASQP QLVPPYRIEN QTCWDQDKEY YEPMHDVCCS RCPPGEFVFA VCSRSQDTCV KTCPHNSYNE HWNHLSTCQL CRPCDIVLGF EEVAPCTSDR KAECRCQPGM SCVYLDNECV HCEEERLVLC QPGTEAEVTD EIMDTDVNCV PCKPGHFQNT SSPRARCQPH TRCEIQGLVE AAPGTSYSYSDT ICKNPPEPGA MLLLAILLSL VLFLLFTTVL ACAWMRHPSL CRKLGTLKLR HPEGEESPPC

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		PAPRADPHFP DLAEPLLPMS GDLSPPAGP PTAPSLLEEVV LQQQSPLVQA RELEAEPGEH GQVAHGANGI HVTGGSVTVT GNIYIYNGPV LGGTRGPGDP PAPPEPPYPT PEEGAPGPSE LSTPYQEDGK AWHLAETETL GCQDL
298	Пептидный линкер (G4S)	GGGGS
299	Пептидный линкер (G4S) ₂	GGGGSGGGGS
300	Пептидный линкер (SG4) ₂	SGGGGSGGGG
301	Пептидный линкер G4(SG4) ₂	GGGGSGGGGSGGGG
302	пептидный линкер	GSPGSSSSGS
303	Пептидный линкер (G4S) ₃	GGGGSGGGGSGGGGS
304	пептидный линкер (G4S) ₄	GGGGSGGGGSGGGGS
305	пептидный линкер	GSGSGSGS
306	пептидный линкер	GSGSGNGS
307	пептидный линкер	GGSGSGSG
308	пептидный линкер	GGSGSG
309	пептидный линкер	GGSG
310	пептидный линкер	GGSGNGSG
311	пептидный линкер	GGNGSGSG
312	пептидный линкер	GGNGSG
313	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWI HWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVK RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARR HWPGGFDYWGQGLTVTVSS
314	VL (PD-L1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLHPATFGQGT KVEIK
315	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW MSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSV KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSS
316	VL (PD-L1)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGLPWFQGT KVEIK
317	rbHC.up	AAG CTT GCC ACC ATG GAG ACT GGG CTG CGC TGG CTT C
318	P1AG5459, HC, KK+ LTBR, с зарядами – FAP, сшитое (суррогат 2+1 мыши)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT MNWVRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRTYTDSV KGRFTISRDNKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQ GFAFTNWGQGTMTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCN VAHPASSTKVDEKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV FIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTRFVSSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAFVAPIEKTIKTKGR PKAPQVYTIPTPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPED ITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYS KLNQVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKS LSHSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQA PGKLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQWLNFDY WGQGLTVTVSSRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGA SVVCFLLNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSW

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		TDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTC EATHKTSPIVKSFNRNEC
319	P1AG5459, LC, LTBR, с зарядами (суррогат 2+1 мыши)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALA WFQQKPGKAPKRLIFDASSLDSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEMKRADAAPTVSIFPPSSRKLTSGGASVVCFL NNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTC EATHKTSPIVKSFNRNEC
320	P1AG5459, HC, DD-, LTBR, с зарядами (суррогат 2+1 мыши)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT MNWVRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRITYYTDV KGRFTISRDNNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQ GFAFTNWGQGTMTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQVTVCN VAHPASSTKVDEKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV FIFPPKPKDVLITLTPKVTCCVVAISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTRFSVSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKISKTKGR PKAPQVYTIPTPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPED ITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYS DLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKS LSHSPG
321	P1AG5459, LC, FAP, сшитое (суррогат 2+1 мыши)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGT KVEIKSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCL LVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTPSSTWPSQVTVCNVAHPASSTKVD KKIVPRDC
322	P1AG5461, HC, KK+ LTBR с зарядами – DP47, сшитое (нецелевой суррогат 2+1 мыши)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT MNWVRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRITYYTDV KGRFTISRDNNAKNTLDLQMTSLRAEDAAIYICAQ GFAFTNWGQGTMTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQVTVCN VAHPASSTKVDEKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV FIFPPKPKDVLITLTPKVTCCVVAISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTRFSVSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKISKTKGR PKAPQVYTIPTPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPED ITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYS KLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKS LSHSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGSQFDYWG QGTLVTVSSRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTD QDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTC EATHKTSPIVKSFNRNEC
323	P1AG5461, LC, LTBR с зарядами (нецелевой суррогат 2+1 мыши)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALA WFQQKPGKAPKRLIFDASSLDSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEMKRADAAPTVSIFPPSSRKLTSGGASVVCFL NNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTC EATHKTSPIVKSFNRNEC

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGG GGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRTGIP DRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIM LPPTFGQGTKVEIK
329	P1AH5884 (1+1), выступ HC, LTBR, (BHA10), сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVA WYQQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPPTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL LSPG
330	P1AH5884 (1+1), впадина HC, FAP с зарядами	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWFGGFNWYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
331	P1AH5884(1+1), LC LTBR, (BHA10), сшитое	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTYY LHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKF KGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RSWEGFPYWGQGTITVSSASVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
332	P1AH5884(1+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
333	P1AH5885 (2+1), выступ HC, LTBR, (BHA10), сшитое, FAP с зарядами	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVA WYQQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPPTFGQGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGEVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDEKVEPKSCD
334	P1AH5885 (2+1), впадина НС, LTBR, (BHA10), сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVA WYQQKPGKAPKSLISSASYRYSRVSRFSGSGG TDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
335	P1AH5885(2+1), LC LTBR, (BHA10)(2x) сшитое	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTY LHWVRQAPGQGLEWMGWYIPGNVHAQYNEKF KGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RSWEGFPYWGQGTITVSSASVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
336	P1AH5885(2+1), LC, FAP, с зарядами	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRAATGIPDRFSGSGG TDFTLTISRLEPEDFATVYYCQQGIMLPPTFGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
337	P1AH5886 (2+1), выступ НС, LTBR (9459), сшитое, FAP (212) с зарядами	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALA WFQQKPGKAPKRLIFDASSLDSGVPSRFSGSGG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGQVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYNMDWVRQAP GQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKFKGRVTMTIDTS TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRFRGIHYAMDY WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDEKVEPKSCD
338	P1AH5886 (2+1), впадина HC, LTBR (9459), сшитое	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALA WFQQKPGKAPKRLIFDASSLDSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGT KVEMKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
339	P1AH5886 (2+1), LC, LTBR, (9459)(2x), сшитое	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT MNWVRQAPGKGLEWVSGVAPSGDRITYTDSV KGRFTISRDNKNTLDLQMTSLRAEDAAIYCAQ GFAFTNWGQGTMTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
340	P1AH5886 (2+1) LC FAP (212) с зарядами	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASEVDNYGLS FINWFQQKPGQAPRLLIYGTSNRGSIGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
341	P1AH0119 HC (LTBR BHA10 hu IgG1 PG LALA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYY LHWVRQAPGQGLEWMGWYIPGNVHAQYNEKF KGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCA RSWEGFPYWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
342	P1AH0119 LC (LTBR BHA10 hu IgG1 PG LALA)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVA WYQQKPGKAPKSLISSASYRYSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
343	CDR-H1 LTBR (BHA10)	TYYLH
344	CDR-H2 LTBR (BHA10)	WIYPGNVHAQYNEKFKG
345	CDR-H3 LTBR (BHA10)	SWEGFPY
346	CDR-L1 LTBR (BHA10)	KASQNVGINVA
347	CDR-L2 LTBR (BHA10)	SASYRYS
348	CDR-L3 LTBR (BHA10)	QQYDTYPFT
349	VH LTBR (BHA10)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYY

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
		LHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKF KGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCA RSWEGFPYWGQGTТVTVSS
350	VL LTBR (BHA10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVA WYQQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTYPFTFGQGT KVEIK
351	Область эпитопа (P1AE9459)	QCRCQPGMFCAAWALEC
352	Область эпитопа (P1AH0119)	AWALECTHCELL
353	Область эпитопа (P1AE1873)	1 QTCRDQEKEYYEPQHR
354	Область эпитопа (P1AE1873)	2 SRIRDТVC
355	Область эпитопа (P1AE1235)	1 SYNEHWNYLTICQL
356	Область эпитопа (P1AE1235)	2 WALECTHCELLSDCPPGT
357	Light человека (UniProt, № доступа O43557)	MEESVVRPSVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCS VARVGLGLLLLLMGAGLAVQGWFLQLHWRLG EMVTRLPDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AHLT GANSSTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGA LVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPLGLASTITHG LYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWW DSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVLDERL VRLRDGT RSYFGAFMV
358	Light человека (74-240)	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AHLT GANSST GSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKA GYYYIYSKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTP RYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWW DSSFLG GVVHLEAGEKVVVRVLDERL VRLRDGTRSYFG AFMV
359	ECD LTBR человека (S28-M227)	SQPQAVPPYASENQTCRDQEKEYYEPQHRRICCSR CPPGT YVSAKCSRIDТVCATCAENSYNEHWNY LTICQLCRPCDPVMGLEEIAPCTSKRKTQCRCQP GMFCAAWALECTHCELLSDCPPGTAEELKDEVG KGNNHCVPCKAGHFQNTSSPSARCQPHTRCENQ GLVEAAPGTAQSDTTCKNPPELPPPEMSGTMLM
360	ECD LTBR человека (S28-L223)	SQPQLVPPYRIENQTCWDQDKEYYEPMH DVCCS RCPGFEVFVAVCSRSQDTVCKTCPHNSYNEHWN HLSTCQLCRPCDIVLGFEVAPCTSDRKAECRCQ PGMSCVYLDNECVHCEEERLVLCQPGTEAEVTD EIMDTDVNCVPCKPGHFQNTSSPRARCQPHTRC EIQGLVEAAPGTSYSDTICKNPPEPGAMLL
361	ECD LTBR яванского макака (S28-M227)	SQPQVPPYGSNQTCRDQEKEYYEPHRRICCSR CPPGT YVSAKCSRSRDTVCATCAENSYNEHWNY LTICQLCRPCDPVMGLEEIAPCTSKRKTQCRCQP GMFCAAWALECTHCELLSDCPPGTAEELKDEVG KGNNHCVPCKAGHFQNTSSPSARCQPHTRCEDQ GLVEAAPGTAQSDTTCRNPSESLPPPEMSGTMLM

Следующие пронумерованные абзацы (абз.) представляют собой аспекты настоящего изобретения.

1. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

5 (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP);

(б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с рецептором лимфотоксина-бета (LTBR); и

10 (в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

2. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по абз. 1, причем биспецифическая антигенсвязывающая молекула активирует LTBR при связывании с FAP.

15 3. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по абз. 1 или 2, причем биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит третий антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с LTBR.

20 4. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по абз. 3, в которой третий антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, идентичен второму антигенсвязывающему домену, который специфично связывается с LTBR.

5. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-4, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, представляет собой Fab-фрагмент.

25 6. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-5, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит:

30 (i) переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

7. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-6, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, или содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:25, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:26.

8. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-7, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, или он содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, и

вариабельную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26.

9. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-8, в которой второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40; или

(iii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

(iv) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, и CDR-H3,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и
вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54, CDR-L2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, и CDR-L3,
5 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:56; или

(v) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:59, CDR-H2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:60, и CDR-H3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, и
10 вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, CDR-L2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63, и CDR-L3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; или

(vi) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-
15 H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67, CDR-H2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:68, и CDR-H3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69, и
вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70, CDR-L2,
20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и CDR-L3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72; или

(vii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-
H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3,
25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и
вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или

(viii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-
30 H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и CDR-H3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и
вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.

10. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-9, в которой второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит:
- 5 (i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или
- 10 (ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или
- 15 (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или
- 20 (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58; или
- 25 (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66;
- 30 (vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74;
- (vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или

(viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или

5 (ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98.

10 11. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-10, в которой второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или

20 (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50.

25 12. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-11, содержащая:

(а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10; и

(б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и

вариабельную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

13. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-12, в которой Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, представляет собой Fc-домен IgG, в частности, Fc-домен IgG1 или Fc-домен IgG4, и где Fc-домен содержит одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антитела с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

14. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-13, в которой Fc-домен представляет собой подкласс IgG1 человека с аминокислотными мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

15. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-14, содержащая:

(а) первый Fab-фрагмент, который специфично связывается с FAP,

(б) второй Fab-фрагмент, который специфично связывается с LTBR, и

(в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

16. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по абз. 15, в которой второй Fab-фрагмент, который специфично связывается с LTBR, представляет собой фрагмент crossFab.

17. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-14, содержащая:

(а) первый Fab-фрагмент, который специфично связывается с FAP,

(б) второй и третий Fab-фрагменты, которые специфично связываются с LTBR, и

(в) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц и содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию,

где первый Fab-фрагмент, который специфично связывается с FAP, слит на своем N-конце с C-концом одной из субъединиц Fc-домена, а каждый из

второго и третьего Fab-фрагментов, которые специфично связываются с LTBR, слит на своем С-конце с N-концом одной из субъединиц Fc-домена.

18. Антитело, которое специфично связывается с LTBR, причем указанное антитело содержит:

- 5 (i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и
- 10 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или
- 15 (ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и
- 20 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:39, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:40; или
- (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и
- 25 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или
- 30 (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.

19. Антитело по абз. 18, причем указанное антитело содержит:

- 5 (i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или
- 10 (ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или
- 15 (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или
- (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58;
- 20 (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66;
- 25 (vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74;
- 30 (vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или
- (viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ

ID NO:90; или

(ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98.

20. Один или более выделенных полинуклеотидов, кодирующих биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из абз. 1-17 или антитело по абз. 18 или 19.

21. Вектор экспрессии, содержащий один или более выделенных полинуклеотидов по абз. 20.

22. Прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин, содержащая один или более выделенных полинуклеотидов по абз. 20 или вектор экспрессии по абз. 21.

23. Способ получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы, включающий шаги а) культивирования прокариотической или эукариотической клетки-хозяина по абз. 22 в условиях, подходящих для экспрессии биспецифической антигенсвязывающей молекулы, и б) необязательного выделения биспецифической антигенсвязывающей молекулы.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из абз. 1-17 или антитело по абз. 18 или 19, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

25. Фармацевтическая композиция по абз. 24, дополнительно содержащая дополнительное терапевтическое средство.

26. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-17 или фармацевтическая композиция по абз. 24 для применения в качестве лекарственного препарата.

27. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-17 или фармацевтическая композиция по абз. 24 для применения в (а) индуцировании активации ICAM на эндотелиальных клетках или фибробластах, ассоциированных с раком, или (б) усилении адгезии Т-клеток.

28. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-17 или фармацевтическая композиция по абз. 24 для применения в лечении рака.

29. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-17 или фармацевтическая композиция по абз. 24 для применения в лечении рака,

причем биспецифическая антигенсвязывающая молекула или фармацевтическая композиция предназначены для введения в комбинации с химиотерапевтическим средством, лучевой терапией и/или другими средствами для применения в иммунотерапии рака.

5 30. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из абз. 1-17 или фармацевтическая композиция по абз. 24 для применения в лечении рака, причем биспецифическая антигенсвязывающая молекула предназначена для введения в комбинации со средством, блокирующим взаимодействие PD-L1/PD-1.

10 31. Применение биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из абз. 1-17 или фармацевтической композиции по абз. 24 в производстве лекарственного препарата для лечения рака.

15 32. Способ лечения индивидуума, у которого имеется рак, включающий введение индивидууму эффективного количества биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из абз. 1-17 или фармацевтической композиции по абз. 24.

ПРИМЕРЫ

20 Ниже приведены примеры способов и композиций по настоящему изобретению. Следует понимать, что на практике можно реализовать ряд других вариантов осуществления с учетом общего описания, приведенного выше.

Технологии рекомбинантных ДНК

25 Для манипуляций с ДНК применяли стандартные способы, описанные в Sambrook et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Молекулярные биологические реагенты использовали в соответствии с инструкциями производителя. Общая информация в отношении нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческого иммуноглобулина приведена в: Kabat, E.A. et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Ed., NIH Publication No 91-3242.

Секвенирование ДНК

30 Последовательности ДНК определяли с помощью двонитевого секвенирования.

Синтез генов

Требуемые сегменты генов либо получали посредством ПЦР с использованием соответствующих матриц, либо синтезировали из синтетических олигонуклеотидов и продуктов ПЦР посредством автоматического синтеза генов. В случаях, когда точная генная последовательность была недоступна, олигонуклеотидные праймеры конструировали на основании последовательностей самых близких гомологов и выделяли гены посредством RT-PCR из РНК из соответствующей ткани. Генные сегменты, фланкируемые сингулярными сайтами расщепления рестрикционной эндонуклеазой, клонировали в стандартные векторы для клонирования/секвенирования. Плазмидную ДНК очищали из трансформированных бактерий, а концентрацию определяли с помощью УФ-спектроскопии. Последовательность ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали посредством секвенирования ДНК. Генные сегменты конструировали с подходящими рестрикционными сайтами, чтобы обеспечить возможность субклонирования в соответствующие векторы экспрессии. Все конструкции конструировали с 5'-концевой последовательностью ДНК, кодирующей лидерный пептид, который направляет белки для секреции в эукариотических клетках.

Очистка белка

Белки очищали из профильтрованных клеточных культуральных супернатантов согласно стандартным протоколам. Вкратце, антитела наносили на колонку с сефарозой белка А (MabSelect™ SuRe™, Cytiva) и промывали PBS. Элюирование антител проводили при рН 2,8 с последующей немедленной нейтрализацией образца. Агрегированный белок отделяли от мономерных антител с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) (HiLoad® 16/600 Superdex® S200, Cytiva) в PBS или в 20 мМ гистидине, 150 мМ NaCl рН 6,0. Фракции мономерных антител объединяли, концентрировали (при необходимости), используя, например, центробежный концентратор MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), замораживали и хранили при -20°C или -80°C. Часть образцов предоставляли для последующего анализа белка и аналитической характеристики, например, с помощью SDS-PAGE, CE-SDS, аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC) или масс-спектрометрии.

SDS-PAGE

Гель-систему NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) использовали в соответствии с инструкцией производителя. В частности, использовали 10% или 4-12% гелей NuPAGE® Novex® Bis-TRIS (pH 6,4) и NuPAGE® MES (восстановленные гели с добавкой подвижного буфера с антиоксидантом NuPAGE®) или MOPS (невосстановленные гели).

CE-SDS

Чистоту, целостность антител и молекулярную массу биспецифических и контрольных антител анализировали с помощью CE-SDS с использованием микрожидкостной технологии LabChip® (Caliper Life Science, США). 5 мкл раствора белка готовили для анализа CE-SDS с использованием набора реагентов HT Protein Express в соответствии с инструкциями производителя и анализировали на системе определения характеристик белка LabChip® GXII Touch™ с использованием чипа HT Protein Express. Данные анализировали с использованием программного обеспечения LabChip® GX версии 3.0.618.0.

Аналитическая эксклюзионная хроматография

Эксклюзионную хроматографию (SEC) для определения агрегации и олигомерного состояния антител проводили с помощью ВЭЖХ-хроматографии. Вкратце, очищенные антитела к белку А применяли к колонке Tosoh (например, TSKgel® G3000 SW_{XL}) в 300 мМ NaCl, 50 мМ КН₂РО₄/К₂НРО₄, pH 7,5 на системе Agilent HPLC 1100 или к колонке Superdex 200 (GE Healthcare) в 2 x PBS на системе Dionex HPLC. Количественную оценку элюированного белка проводили по УФ-поглощению и интеграции площадей пиков. Стандартом служил стандарт гель-фильтрации BioRad 151–1901.

Пример 1

Создание антител к LTBR

1.1. Белки, используемые для фагового дисплея и иммунизации для получения антител к LTBR

Для создания антител к LTBR посредством фагового дисплея и иммунизации, β-рецепторы лимфотоксина и лимфотоксин αβ2 различных видов, а также инструментальные белки получали в виде растворимых рекомбинантных белков. Это были биотинилированные и Fc-меченые β-рецепторы лимфотоксина, используемые в качестве антигенов в фаговом дисплее, и иммуноген для иммунизации, биотинилированный Fc-фрагмент (Fc-

деплетирующий компонент), используемый в качестве средства предварительной очистки, чтобы избежать Fc-связывающих веществ в фаговом дисплее, и биотинилированные и His-меченые одноцепочечные лимфотоксиновые $\alpha 1\beta 2$ лиганды, используемые для конкуренции во время фагового дисплея и дальнейшей характеристики. В **таблице 1** представлен обзор этих белков и их соответствующих идентификаторов, их структуры схематически показаны на **фиг. 1A-1G**.

Таблица 1. Рекомбинантные растворимые рецепторы, лиганды и инструментальные белки, используемые для фагового дисплея и иммунизации

Идентификатор	SEQ ID NO.	Рекомбинантный растворимый белок
P1AA0981	247, 248 (цепь выступа и впадины)	Fc-деплетирующий компонент kh NC avi, биотинилированное
P1AE1235	249	одноцепочечный лимфотоксин $\alpha 1\beta 2$ человека avi his
P1AE1236	250	одноцепочечный лимфотоксин $\alpha 1\beta 2$ мыши avi his
P1AE2835	251, 252 (цепь выступа и впадины)	мономерное huLTBR ECD (S28-M227), Fc-слитое avi, биотинилированное
P1AE4410	253, 254 (цепь выступа и впадины)	мономерный ECD LTBR мыши (S28-L223) Fc-слитый, avi, биотинилированное
P1AE4411	255, 256 (цепь выступа и впадины)	мономерный ECD LTBR яванского макака (S28-M227), Fc-слитый, avi, биотинилированное
P1AE1217	257, 258 (цепь выступа и впадины)	мономерный N-концевой LTBR человека (полноразмерный ECD), hu Fc-слитый IgG1 kih HRYF avi

Все рекомбинантные растворимые белки, перечисленные в **таблице 1**, получали с помощью Evitria с использованием их запатентованной векторной

системы с использованием обычных (не основанных на ПЦР) методов клонирования и с использованием адаптированных к суспензии клеток CHO K1 (первоначально полученных от ATCC и адаптированных к бессывороточному росту в суспензионной культуре в Evitria). Для получения Evitria использовала свои запатентованные, не содержащие животных компонентов и не содержащие сыворотки среды (eviGrow и eviMake2) и свой запатентованный реагент для трансфекции (eviFect). Для биотинилирования *in vivo* avi-метку (GLNDIFEAQKIEWNE, SEQ ID NO:259) сливали с C-концами этих конструкций (для P1AA0981 также с N-концом тяжелой цепи выступа), что позволяло специфическое биотинилирование при коэкспрессии с биотиновой лигазой BirA. Супернатанты собирали центрифугированием и последующей фильтрацией (фильтр 0,2 мкм), а белки очищали от собранного супернатанта стандартными способами.

Fc-меченые белки очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А (Protein А MabSelectTM SuReTM, Cytiva) и препаративной эксклюзионной хроматографии (SEC) (HiLoad® 16/600 Superdex® S200, Cytiva), тогда как His-меченые белки очищали с помощью аффинной хроматографии с Omplete His-Tag с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией (SEC) (HiLoad® 26/60 S200), все в соответствии со стандартными процедурами и инструкциями производителей. Чистоту очищенных белков определяли с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (например, TSKgel® G3000 SW_{XL}) и CE-SDS (например, Caliper LabChip® GXII).

1.2. Дополнительные белки, используемые для скрининга и характеристики антител IgG к LTBR и биспецифических антител к FAP/LTBR

Для скрининга и характеристики антител, полученных путем фагового дисплея и иммунизации, экспрессировали и очищали или приобретали на коммерческой основе дополнительные рекомбинантные растворимые рецепторы лимфотоксина-бета, лиганды (LIGHT человека) и мишени стромы опухоли (FAP человека и мыши). Кроме того, коммерческие рецепторы лимфотоксина β приобретали и биотинилировали *in vitro*. В **таблице 2** и на **фигурах 2А-2F** представлен обзор этих белков и их соответствующих идентификаторов.

Таблица 2. Дополнительные рекомбинантные растворимые рецепторы, лиганды и мишени стромы опухоли

Идентификатор	SEQ NO:	ID	Рекомбинантный растворимый белок
P1AE2401	-		димерный LTBR-Fc человека, биотинилированный (приобретено у R&D Systems (7538-LR) и впоследствии биотинилировано)
P1AE7979	260, 261		ECD LTBR человека (S28-M227) N- и C-концевое удлиненное - Fc-слитое wt kih HRYF - Avi - His биотинилированное
P1AE2656	262, 263		мономерный N-концевой LTBR яванского макака (полноразмерный ECD), hu Fc-слитый IgG1 kih HRYF avi, биотинилированное
P1AE2655	-		димерный LTBR-Fc мыши, дисульфид-связанный гомодимер, биотинилированный (приобретено у R&D Systems (1008-LR) и впоследствии биотинилировано)
-	-		LIGHT человека (приобретено у R&D Systems (664-Li))
P1AA5347	264		FAP человека – Avi – His, биотинилированное
P1AD9907	265		FAP мыши – Avi – His биотинилированное

1.3. Создание Fab (антигенсвязывающий фрагмент), направленных против LTBR, с помощью фагового дисплея

1.3.1. Отбор и скрининг Fab, направленных против LTBR

Fab, направленные против LTBR, выбирали с помощью фагового дисплея из синтетических библиотек Fab на основе полностью человеческих каркасов с

разнообразием последовательностей в CDR3 доменов VL (3 разных длины) и VH (6 разных длин).

Циклы отбора (биопэннинг) проводили в растворе в соответствии со следующим протоколом: 1. предварительная очистка $\sim 10^{12}$ частиц фагида на библиотечный пул на 96-луночных планшетах, покрытых нейтравидином, покрытых 500 нМ неродственного биотинилированного Fc-фрагмента человека, 2. инкубация частиц фагида, связывающих Fc-фрагмент отличного от человеческого происхождения, в супернатанте с лигандом лимфотоксина и биотинилированным рецептором LTBR (см. **таблицу 3**) в течение 0,5 ч в общем объеме 0,8 мл, 3. захват биотинилированного рецептора LTBR и специфическое связывание фага путем добавления 80 мкл магнитных частиц, покрытых стрептавидином, в течение 20 мин, 4. промывка соответствующих магнитных частиц 5-10x 0,8 мл PBS/Tween 20 и 5-10x 0,8 мл PBS с использованием магнитного сепаратора частиц, 5. элюирование фаговых частиц путем добавления 0,8 мл 10 мМ глицина pH 2 в течение 5 мин. с последующим добавлением 0,8 мл 100 мМ триэтиламина (TEA) в течение 5 мин. и последующей нейтрализацией путем добавления 1/2 объема 1 М Tris/HCl pH 7,4, 6. повторное инфицирование log-фазы клеток *E. coli* TG1 элюированными фаговыми частицами, инфицирование хелперным фагом VCSM13, инкубация на встряхивателе при 30 °C в течение ночи и последующее осаждение частиц фагида PEG/NaCl для использования в следующем раунде отбора.

Отбор проводили в течение 4 циклов с использованием снижения концентрации антигена. Лиганды и рецепторы лимфотоксина человека и мыши чередовали между циклами отбора для получения перекрестно-реактивных антител к LTBR человека и мыши, которые не конкурируют с природными лигандами. Вследствие высокой гомологии последовательностей между эктодоменами LTBR человека и яванского макака предполагалось, что они также образуют перекрестно-реактивные антитела к LTBR человека и яванского макака. В **таблице 3** обобщено, какие белки использовали для предварительного очищения, конкуренции лигандов и отбора во время кампании по отбору фагового дисплея для LTBR для получения нелигандных конкурирующих LTBR-специфических антител человека и мыши.

Таблица 3. Кампания по отбору фагового дисплея для отбора нелигандных конкурирующих LTBR-специфических антител человека и мыши

Отборочный тур	Предварительно очищающийся белок	Лиганд лимфотоксина для конкуренции	LTBR-рецептор для отбора
Раунд 1	500 нМ биотинилированного Fc-деплетирующего компонента человека kh NC avi B (P1AA0981)	300 нМ одноцепочечного лимфотоксина $\alpha 1\beta 2$ человека avi his (P1AE1235)	100 нМ мономерного LTBR ECD человека (S28-M227), Fc-слитое avi биотинилированное (P1AE2835)
раунд 2	500 нМ биотинилированного Fc-деплетирующего компонента человека kh NC avi B (P1AA0981)	300 нМ одноцепочечного лимфотоксина $\alpha 1\beta 2$ мыши avi his (P1AE1236)	50 нМ мономерного LTBR ECD мыши (S28-L223), Fc-слитое avi биотинилированное (P1AE4410)
раунд 3	500 нМ биотинилированного Fc-деплетирующего компонента человека kh NC avi B (P1AA0981)	300 нМ одноцепочечного лимфотоксина $\alpha 1\beta 2$ человека avi his (P1AE1235)	25 нМ мономерного LTBR ECD человека (S28-M227), Fc-слитое avi биотинилированное (P1AE2835)
раунд 4	500 нМ биотинилированного Fc-деплетирующего компонента человека kh NC avi B (P1AA0981)	300 нМ одноцепочечного лимфотоксина $\alpha 1\beta 2$ мыши avi his (P1AE1236)	10 нМ мономерного LTBR ECD мыши (S28-L223), Fc-слитое avi биотинилированное (P1AE4410)

5 1.3.2. Сэндвич-ELISA для идентификации перекрестно-реактивных Fab, направленных против LTBR человека и мыши, полученных с помощью фагового дисплея

Индивидуальные клоны экспрессировали в бактериях в виде 1 мл культур в 96-луночном формате, а супернатанты подвергали скринингу с помощью 10 ELISA. Специфические связующие вещества определяли как имеющие сигналы, превышающие в 5 раз исходный сигнал для мономерного huLTBR ECD (S28-M227) Fc-слитого avi биотинилированного (P1AE2835), а также muLTBR ECD

(S28-L223) Fc-слитого avi биотинилированного (P1AE4410), и не имеющие значимых сигналов для Fc-деплетирующего компонента kh NC avi B (P1AA0981).

Точнее, 96-луночные планшеты с нейтравидином (Thermo Fisher) покрывали 100 нМ биотинилированных белков при 37 °С в течение 30 мин. с последующим блокированием планшета 2% MPBS (фосфатно-солевым буферным раствором молочного порошка) (200 мкл/лунка) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали 3 раза PBS, затем добавляли Fab-содержащие бактериальные супернатанты и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После еще 3 шагов промывки PBS добавляли вторичное антитело к FLAG-HRP (1:4000) (Sigma) и планшет инкубировали на шейкере в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет 3 раза промывали PBS и проявляли путем добавления 100 мкл/лунка BM Blue POD (Roche). Ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл/лунка 1 М H₂SO₄. OD считывали при 450 нм (эталон при 900 нм) для окончательного считывания OD₄₅₀₋₉₀₀. ELISA-специфические связывающие вещества подвергали преобразованию в формат IgG для дополнительной характеристики с помощью SPR, как описано ниже.

Выбранный клон Fab FAPltbr.P218.076 соответствовал критериям специфического связывания с LTBR человека и мыши (**фиг. 3**). Затем его преобразовывали в формат IgG1 человека для дополнительной характеристики (P1AE5929 после преобразования IgG). Несмотря на стратегию отбора, он конкурирует с природными лигандами лимфотоксином $\alpha 1\beta 2$ и LIGHT (см. **таблицу 5** и **фиг. 4** и **5** соответственно). Вследствие его высокой аффинности 2 нМ возможно, что это антитело вытесняло лиганд во время отбора.

25 **1.4. Создание антител путем иммунизации кроликов и крыс белком**

Для иммунизации использовали CD крыс, полученных от Charles River Laboratories International, Inc., а также запатентованных Roche трансгенных кроликов, содержащих локус иммуноглобулина человека, как указано в WO 2000/46251, WO 2002/12437, WO 2005/007696, WO 2006/047367, US 30 2007/0033661 и WO 2008/027986. Животных содержали в соответствии с Приложением А «Руководство по размещению и уходу за животными» в аккредитованном AAALAC учреждении для содержания животных. Все протоколы и эксперименты по иммунизации животных одобряли правительством Верхней Баварии (номер разрешения 55.2-1-54-2531-66-16 и 55.2-1-54-2532-90-

14) и проводили в соответствии с Законом Германии о благополучии животных и Директивой 2010/63 Европейского парламента и Совета.

5 Рекомбинантный мономерный N-концевой LTBR человека (полноразмерный ECD), hu Fc-слитое IgG1 kih HRYF avi (P1AE1217) использовали для иммунизации 3 трансгенных кроликов. Каждого кролика первоначально иммунизировали внутрикожно 400 мкг белка с последующим чередованием внутримышечных и подкожных инъекций 200 мкг белка в дни 7, 14, 42, 70 и 98. Смесь агонистов TLR использовали в качестве адъюванта для каждой иммунизации. Образцы крови отбирали после третьей, четвертой, пятой 10 и шестой иммунизации (через 5-7 дней после иммунизации) и использовали в качестве источника антигенспецифических В-клеток. Антигенспецифические титры контролировали в течение периода иммунизации с помощью анализа образцов сыворотки крови на основе ELISA.

15 CD крыс (n=4) иммунизировали тем же иммуногеном, т.е. рекомбинантным мономерным N-концевым LTBR человека (полноразмерным ECD) hu Fc-слитым IgG1 kih HRYF avi (P1AE1217). Для первоначальной иммунизации 40 мкг иммуногена эмульгировали неполным адъювантом Фрейнда (IFA) и агонистом TLR, и одну половину смеси вводили подкожно (распределяли по нескольким местам инъекции), а другую половину вводили 20 внутрибрюшинно. Через шесть недель проводили бустерную иммунизацию таким же образом, за исключением использования IFA, который заменяли PBS. Через четыре дня после второй иммунизации брали кровь и использовали в качестве источника антигенспецифических В-клеток.

1.4.1. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC)

25 EDTA, содержащую цельную кровь, разбавляли в два раза 1x PBS (Pan Biotech, Айденбах, Германия) перед центрифугированием с плотностью с использованием лимфолита млекопитающего (Cedarlane Laboratories, Берлингтон, Онтарио, Канада) в соответствии с описаниями производителя. PBMC дважды промывали 1x PBS.

30 1.4.2. Процедура клонирования В-клеток кролика

Деплеция клеток. Стерильные 6-луночные планшеты (для культивирования клеток), покрытые сливающимся монослоем клеток CHO, или непокрытые, использовали для деплеции неспецифично связывающихся лимфоцитов, а также макрофагов/моноцитов посредством неспецифической

адгезии к пластику. Каждую лунку заполняли максимум 4 мл среды и до 6×10^6 РВМС и оставляли связываться в течение 1 часа при 37 °С в инкубаторе. Клетки в супернатанте (лимфоциты периферической крови (PBL)) использовали для шага пэннинга антигена.

5 Обогащение В-клеток LTBR человека и яванского макака. 6-Луночные
планшеты для культивирования тканей, покрытые монослоем LTBR-
положительных клеток СНО человека или яванского макака или покрытые
рекомбинантным слитым белком LTBR-Fc человека, высевали до 6×10^6 PBL на
4 мл среды и оставляли связываться в течение 1 ч при 37 °С в инкубаторе.
10 Неадгезивные клетки удаляли путем осторожной промывки лунок 1-2 раза 1x
PBS. Оставшиеся прикрепленные клетки отделяли трипсином в течение 10 мин.
при 37 °С в инкубаторе. Трипсинацию останавливали средой EL-4 B5. Клетки
выдерживали на льду до окрашивания иммунной флуоресценцией.

Иммунофлуоресцентное окрашивание и проточная цитометрия. Для
15 сортировки отдельных клеток использовали FITC к IgG (Abcam, Кембридж,
Великобритания). Для окрашивания поверхности клетки с шага деплеции и
обогащения инкубировали с антителом к FITC к IgG в PBS и инкубировали в
течение 45 минут в темноте при 4 °С. После окрашивания РВМС дважды
промывали ледяным PBS. Наконец, РВМС ресуспендировали в ледяном PBS и
20 немедленно подвергали анализу FACS. Перед анализами FACS добавляли йодид
пропидия в концентрации 5 мкг/мл (BD Pharmingen, Сан-Диего, Калифорния,
США) для различения мертвых и живых клеток. Для сортировки отдельных
клеток использовали FACSAria Becton Dickinson, оснащенную компьютером и
программным обеспечением FACSDiva (BD Biosciences, США).

25 Культивирование В-клеток. Культивирование В-клеток получали
способом, аналогичным описанному Lightwood et al. (J Immunol Methods, 2006,
316: 133-143). Вкратце, отдельные отсортированные В-клетки кролика
инкубировали в 96-луночных планшетах с 200 мкл/лунку среды EL-4 B5,
содержащей клетки Pansorbin (1:100000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt,
30 Deutschland), смесь цитокинов (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) в
комбинации с PMA (Sigma, Darmstadt, Germany) в соответствии с
WO/2018/122147 и гамма-облученными клетками тимомы мыши EL-4-B5 ($5 \times$
 10^4 /лунка) в течение 7 дней при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в инкубаторе.
Супернатанты культивирования В-клеток удаляли для скрининга, а оставшиеся

клетки незамедлительно собирали и замораживали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в 100 мкл буфера RLT (Qiagen, Hilden, Германия).

Среда EL-4 B5 состоит из RPMI 1640 (Pan Biotech, Айденбах, Германия) с добавлением 10% FCS, 10 mM HEPES (PAN Biotech, Айденбах, Германия), 2 mM глутамина, 1% раствора пенициллина/стрептомицина (РАА, Пашинг, Австрия), 2
5 mM пирувата натрия и 0,05 mM β -меркаптоэтанола (Gibco, Пейсли, Шотландия).

ПЦР-амплификация V-доменов кролика. Общую РНК получали из В-клеточного лизата (ресуспендированного в буфере RLT - Qiagen - № в кат. 79216) с использованием набора РНК NucleoSpin 8/96 (Macherey&Nagel; 740709.4, 740698) в соответствии с протоколом производителя. РНК элюировали 60 мкл свободной от РНКазы воды. 6 мкл РНК использовали для получения кДНК посредством реакции обратной транскриптазы с использованием Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 18080-400) и олиго-dT-праймера в соответствии с инструкциями производителя. Все шаги выполняли
15 на системе Hamilton ML Star. 4 мкл кДНК использовали для амплификации переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина (VH и VL) с помощью AccuPrime Supermix (Invitrogen 12344-040) в конечном объеме 50 мкл с использованием праймеров gbHC.up (SEQ ID NO:317), HUIH5.HFc-DO3 (SEQ ID NO:267) и HUIH6.HFc-DO3 (SEQ ID NO:268) для тяжелой цепи и VcPCR_FHLC_leader.fw (TG) (SEQ ID NO:269) и HuCK.Do.2AA (SEQ ID NO: для легкой цепи трансгенных В-клеток кролика. Все прямые праймеры были специфичны для сигнального пептида (VH и VL соответственно), тогда как обратные праймеры были специфичны для каркасных или константных областей (VH и VL соответственно). Условия ПЦР для VH и VL были следующими:
25 Горячий старт при $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин.; 35 циклов по 20 с при $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 с при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 45 с при $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ и окончательное удлинение при $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 7 мин. 8 мкл 50 мкл раствора для ПЦР загружали на 48 E-Gel 2 % (Invitrogen G8008-02). Положительные в отношении ПЦР реакционные смеси очищали с использованием набора NucleoSpin Extract II (Macherey&Nagel; 740609250) в
30 соответствии с протоколом производителя и элюировали 75 мкл элюирующего буфера. Все шаги очистки выполняли на системе Hamilton ML Starlet.

1.4.3. Процедура клонирования В-клеток крысы

Деплеция клеток. На первом шаге использовали стерильные 6-луночные планшеты (для культивирования клеток) для деплеции неспецифично

связывающихся лимфоцитов, а также макрофагов/моноцитов посредством неспецифической адгезии к пластику. Каждую лунку заполняли максимум 4 мл среды и до 6×10^6 РВМС и оставляли связываться в течение 1 часа при 37 °С в инкубаторе. Клетки в супернатанте (лимфоциты периферической крови (PBL))
 5 использовали для второго шага деплеции. Для этого 6-луночные планшеты, покрытые антителом к CD4 крысы (BD Biosciences, Сан-Хосе, США) и антителом к IgM крысы (Biorad, Hercules, США), использовали для деплеции адгезивных клеток, как описано выше.

Иммунофлуоресцентное окрашивание и проточная цитометрия. Для
 10 окрашивания поверхности клетки из шагов деплеции инкубировали с антителами к IgG1 крысы, антителами к IgG2a крысы, антителами к IgG2b крысы (все FITC), антителами к легкой цепи каппа (PE) и антителами к CD8a крысы (Alexa Fluor 647) (все BD Bioscience, Сан-Хосе, США) в PBS и инкубировали в течение 45 мин. в темноте при 4 °С. Затем РВМС дважды промывали ледяным PBS. Наконец
 15 РВМС ресуспендировали в ледяном PBS и немедленно подвергали анализу FACS. Перед анализами FACS добавляли йодид пропидия в концентрации 5 мкг/мл (BD Pharmingen, Сан-Диего, Калифорния, США) для различения мертвых и живых клеток. После отрицательного гейтирования CD8a⁺ клеток сортировали двойные положительные клетки для легкой цепи IgG и каппа. Для сортировки
 20 использовали FACSAria Vecton Dickinson, оснащенную компьютером и программным обеспечением FACSDiva (BD Biosciences, США).

Культивирование В-клеток. Культивирование В-клеток получали способом, аналогичным описанному Lightwood et al. (J Immunol Methods, 2006, 316: 133-143). Вкратце, отдельные отсортированные В-клетки крыс
 25 инкубировали в 96-луночных планшетах с 200 мкл/лунка среды EL-4 B5, содержащей клетки Pansorbin (1:100000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland), смесь цитокинов, объединенную с PMA в соответствии с WO 2018/122147 в адаптированных концентрациях, и гамма-облученные клетки тимомы мыши EL-4-B5 (5×10^4 /лунка) в течение 12 дней при 37 °С в атмосфере
 30 5% CO₂ в инкубаторе. Супернатанты культивирования В-клеток удаляли для скрининга, а оставшиеся клетки незамедлительно собирали и замораживали при -80 °С в 100 мкл буфера RLT (Qiagen, Hilden, Германия).

ПЦР-амплификация V-доменов крысы. Общую РНК получали из В-клеточного лизата (ресуспендированного в буфере RLT - Qiagen - № в кат.

79216) с использованием набора РНК NucleoSpin 8/96 (Macherey&Nagel; 740709.4, 740698) в соответствии с протоколом производителя. РНК элюировали 60 мкл свободной от РНКазы воды. 6 мкл РНК использовали для получения кДНК посредством реакции обратной транскриптазы с использованием Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 18080-400) и олиго-dT-праймера в соответствии с инструкциями производителя. Все шаги выполняли на системе Hamilton ML Star. 4 мкл кДНК использовали для амплификации переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина (VH и VL) с помощью AccuPrime Supermix (Invitrogen 12344-040) в конечном объеме 50 мкл с использованием смеси прямых праймеров, состоящей из WTRat.VH.FW11 по WTRat.VH.FW17 (SEQ ID NO:271-277) с 682.rev do (SEQ ID NO:278) в качестве обратного праймера для амплификации доменов VH и WTRat.VK.FW1 (SEQ ID NO:279) и WTRat.VK.FW2 (SEQ ID NO:280) с WTRat.CKappa.Do2 (SEQ ID NO:281) в качестве обратного праймера для амплификации доменов VL. Условия ПЦР для амплификации доменов VH были следующими: Горячий старт при 94 °С в течение 4 мин.; 35 циклов по 20 с при 94 °С, 20 с при 57 °С, 45 с при 68 °С и окончательное удлинение при 68 °С в течение 5 мин. Условия ПЦР для амплификации доменов VL были следующими: Горячий старт при 94 °С в течение 4 мин.; 35 циклов по 20 с при 94 °С, 20 с при 56 °С, 45 с при 68 °С и окончательное удлинение при 68 °С в течение 5 мин. Положительные в отношении ПЦР реакционные смеси очищали с использованием набора NucleoSpin Extract II (Macherey&Nagel; 740609250) в соответствии с протоколом производителя и элюировали 75 мкл элюирующего буфера.

1.4.4. Экспрессия моноклональных антител к LTBR

Создание рекомбинантных векторов для экспрессии моноклональных антител. Для рекомбинантной экспрессии моноклональных бивалентных антител кролика ПЦР-продукты, кодирующие VH или VL, клонировали в виде кДНК в векторы экспрессии методом сверхвысокого клонирования (RS Haun et al., Biotechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li et al., Nature Methods (2007) 4, 251-256). Векторы экспрессии содержали кассету экспрессии, состоящую из 5'-промотора CMV, включая интрон А, и 3' последовательности полиаденилирования BGH. В дополнение к кассете экспрессии плазмиды содержали происхождение репликации, полученное из pUC18, и ген бета-лактамазы, придающий устойчивость к ампициллину для амплификации плазмиды в *E. coli*.

Использовали три варианта основной плазмиды: одна плазида, содержащая константную область IgG кролика, предназначенную для приема области VH от иммунизированных ДНК кроликов, одна плазида, содержащая константную область IgG человека с мутацией PG LALA, предназначенной для приема областей VH от иммунизированных белком кроликов, и одна плазида, содержащая константную область LC каппа человека, для приема областей VL.

Линеаризованные плазмиды экспрессии, кодирующие константную область каппа или гамма и вставки VL/VH, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием перекрывающихся праймеров. Очищенные продукты ПЦР инкубировали с ДНК-полимеразой T4, которая приводила к образованию односторонних свисающих концов. Реакцию останавливали добавлением dCTP. На следующем шаге плазмиду и вставку объединяли и инкубировали с *recA*, которая индуцировала сайт-специфическую рекомбинацию. Рекомбинированные плазмиды трансформировали в *E. coli*. На следующий день выращенные колонии отбирали и тестировали в отношении правильности рекомбинированной плазмиды путем приготовления плазмиды и секвенирования ДНК. В отличие от плазмид, кодирующих последовательности антител кролика, гены для последовательностей антител крысы синтезировали в TWIST Bioscience.

Для экспрессии антител выделенные плазмиды HC и LC временно котрансфицировали в клетки HEK293, а супернатанты собирали через 1 неделю.

Временная экспрессия IgG. Антитела получали в временно трансфицированных клетках Expi293F (эмбриональная клеточная линия 293 почек человека), культивируемых в среде Expi293 (Invitrogen Corp.). Для трансфекции использовали реагент для трансфекции ExpiFectamine 293 на основе липидов (Invitrogen Corp). Антитела экспрессировали из отдельных плазмид экспрессии для легкой и тяжелой цепей IgG. Трансфекции проводили так, как указано в инструкциях производителя. Супернатанты клеточной культуры, содержащие рекомбинантный белок, собирали через шесть дней после трансфекции. Супернатанты хранили при пониженной температуре (например, -80°C) до очистки. Общая информация в отношении рекомбинантной экспрессии человеческих иммуноглобулинов, например в клетках HEK293, приведена в: Meissner, P. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203. IgG, полученные в результате иммунизации кроликов, которые отбирали для дополнительной характеристики, представляли собой P1AE9452, P1AE9450, P1AE9459,

P1AF0080, P1AF0079 и P1AE9457, а также P1AE5929 из фагового дисплея. IgG, полученный в результате иммунизации крыс, который выбирали для дополнительной характеристики, представлял собой P1AF0064.

5 **1.5. Связывание антител IgG с LTBR человека, яванского макака и мыши, как измеряется с помощью ELISA**

10 Планшеты, покрытые стрептавидином Nunc (MicroCoat № 11974998001), покрывали 25 мкл/лунка биотинилированного внеклеточного домена LTBR человека, мыши или яванского макака (P1AE2401, P1AE2655 и P1AE2656, соответственно), слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека в концентрации 125 нг/мл, и инкубировали в течение ночи при 4 °С. После промывки 3x90 мкл/лунка буфером PBST (10x PBS, Roche № 11666789001 + 0,1% Tween 20) добавляли 25 мкл антител к LTBR в разведениях 1:3, начиная с концентрации 15 мкг/мл, и инкубировали 1 ч при к.т. После промывки (3x90 мкл/лунка буфером PBST) добавляли 25 мкл/лунка антитела к hu каппа POD (Millipore, AP502P, 1:2000) и 15 инкубировали при к.т. в течение 1 ч. После промывки (6x90 мкл/лунка буфером PBST) добавляли 25 мкл/лунка субстрата TMB (Roche, 11835033001). Измерение проводили при 370/492 нм.

Бивалентное связывание IgG к LTBR с внеклеточным доменом LTBR человека, яванского макака и мыши тестировали с помощью прямого ELISA. Все 20 IgG демонстрируют сильное связывание с LTBR человека со значением EC₅₀ в диапазоне 3 пМ - 3 нМ. Связывание с LTBR яванского макака сопоставимо для большинства IgG. Исключениями являются P1AE9452 (~2-кратное более сильное связывание с LTBR яванского макака), P1AF0079 (~ 1,7-кратное более сильное связывание с LTBR яванского макака), а связывания с LTBR яванского макака не 25 наблюдали для P1AE1873, т.е. CBE11. Связывание с LTBR мыши обнаружено для P1AE9459, P1AF0080, P1AF0064 и P1AE5929, все с сопоставимым связыванием с LTBR человека.

В **таблице 4** обобщено ELISA связывания IgG к LTBR с LTBR человека, яванского макака и мыши. В отличие от P1AE1873 (CBE11), все IgG являются 30 перекрестно-реактивными в отношении LTBR яванского макака, а подгруппа также перекрестно реагирует с LTBR мыши.

Таблица 4. Связывание IgG к LTBR с LTBR человека, яванского макака и мыши.

ID образца	ECD LTBR человека		ECD LTBR яванского макака		ECD LTBR мыши	
	отн. EC ₅₀ (нМ)	макс. связывание (OD)	отн. EC ₅₀ (нМ)	макс. связывание (OD)	отн. EC ₅₀ (нМ)	макс. связывание (OD)
P1AE9452 ¹	0,238	3,2998	0,1299	3,4837		0,3956
P1AE9450 ²	3,8008	2,7733	4,0175	3,1757		0,2347
P1AE9459 ³	0,0600	3,0003	0,0367	3,5118	0,0497	2,9969
P1AF0080 ⁴	0,0885	2,8776	0,0937	3,2141	0,0715	3,0746
P1AF0064	0,0620	3,0795	0,0339	3,3973	0,0649	3,0542
P1AF0079	0,1396	2,9868	0,3084	2,9696		0,0971
P1AE9457	0,1345	2,7515	0,1397	3,234		0,167
P1AE5929	0,0864	3,1347	0,0624	3,7559	0,1005	2,8561
P1AE1873	0,0028	3,2104		0,1258		0,1118

¹⁻⁴указывают на антитела к LTBR, которые являются частью биспецифических антител в таблице 12.

1.6. ELISA измеряет конкуренцию лиганда для антитела IgG к LTBR с лимфотоксином $\alpha 1\beta 2$ человека и LIGHT человека

Планшеты, покрытые стрептавидином Nunc (MicroCoat № 11974998001) покрывали 25 мкл/лунка биотинилированного внеклеточного домена LTBR человека (P1AE2401), слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека в концентрации 125 нг/мл (500 нг/мл для взаимодействия с LIGHT) в течение ночи при 4 °С. После промывки 3x90 мкл/лунка буфером PBST (10x PBS, Roche №11666789001 + 0,1% Tween 20) добавляли 25 мкл антител к LTBR в разведениях 1:3, начиная с концентрации 15 мкг/мл, и инкубировали 1 ч при к.т. После промывки 3x90 мкл/лунка буфером PBST (10x PBS, Roche № 11666789001 + 0,1% Tween 20) добавляли 25 мкл лиганда (лимфотоксина $\alpha 1\beta 2$ человека (P1AE1235) или His6-меченого LIGHT человека (R&D systems, 664-Li) в концентрации 250 нг/мл и 1000 нг/мл для LIGHT и инкубировали 1 ч при к.т. После промывки (3x90

мкл/лунка буфером PBST) добавляли 25 мкл/лунку антитела к His6-POD (Bethyl #A190-114P, 1:10000) и инкубировали при к.т. в течение 1 ч. После промывки (6х 90 мкл/лунка буфером PBST) добавляли 25 мкл/лунка субстрата ТМВ (Roche, 11835033001). Измерение проводили при 370/492 нм.

5 Ингибирование белок-белкового взаимодействия между LTBR человека и человеческими лигандами лимфотоксином $\alpha 1\beta 2$ и LIGHT тестировали в многошаговом анализе ELISA. Следующие IgG к LTBR демонстрируют сильное ингибирование взаимодействия $\alpha 1\beta 2$ LTBR-лимфотоксина со значениями IC_{50} от ~20 пМ до ~0,9 нМ: P1AE9452, P1AE9459, P1AF0064, P1AF0079, P1AE5929 и 10 P1AE1873. P1AE9450 и P1AE9457 демонстрируют обнаружимое, но более слабое ингибирование взаимодействия (IC_{50} не рассчитана, см. **фиг. 4**). P1AF0080 демонстрирует увеличение сигнала анализа с повышением концентраций, что указывает на стабилизацию взаимодействия LTBR-лимфотоксин $\alpha 1\beta 2$. В **таблице 5** перечислены относительные значения IC_{50} (нМ), а также верхняя и 15 нижняя OD.

Таблица 5. Ингибирование взаимодействий LTBR-лимфотоксин $\alpha 1\beta 2$ и LTBR-LIGHT антителами IgG к LTBR

ID образца	Взаимодействие лимфотоксина $\alpha 1\beta 2$ человека			Взаимодействие LIGHT человека		
	отн. IC_{50} (нМ)	отн. подгонка сверху (OD)	отн. подгонка снизу (OD)	отн. IC_{50} (нМ)	отн. подгонка сверху (OD)	отн. подгонка снизу (OD)
P1AE9452 ¹	0,4741	1,4	0,5		1,2	0,9
P1AE9450 ²			0,5			0,4
P1AE9459 ³	0,1145	1,5	0,1		1,3	0,4
P1AF0080 ⁴	0,9371	2,56	1,6	0,8857	1,2	0,8
P1AF0064	0,0815	1,7	0,1	0,6711	1,3	0,1
P1AF0079	0,4828	1,6	0,3	1,6063	1,3	0,3
P1AE9457		1,4	1,0	0,3672	1,30	0,9
P1AE5929	0,0770	1,7	0,1	0,8415	1,3	0,1
P1AE1873	0,0160	1,5	0,4	0,0597	1,2	0,1

1-4 указывают на антитела к LTBR, которые являются частью биспецифических антител в **таблице 13**.

Взаимодействие LTBR-LIGHT тестировали в аналогичном многошаговом анализе ELISA. Все тестируемые IgG к LTBR демонстрируют обнаруживаемое ингибирование взаимодействия, в целом с более высокими значениями IC₅₀ по сравнению с ингибированием LTBR-лимфотоксина $\alpha 1\beta 2$ тем же соединением (см. **фиг. 5**). P1AF0080 демонстрирует обнаруживаемое ингибирование взаимодействия LTBR-LIGHT в отличие от взаимодействия LTBR-лимфотоксина $\alpha 1\beta 2$, соединение которого, по-видимому, оказывает стабилизирующее действие.

1.7. Репортерный анализ HeLa NF κ B luc

Для идентификации агонистических антител к LTBR использовали репортерные клетки HeLa NF κ B для обнаружения активации NF κ B, которая находится ниже многих рецепторов, включая TNFR и LTBR, которые эндогенно экспрессируются клетками HeLa. Репортерные клетки с люциферазой HeLa NF κ B выращивали в DMEM Gibco 42430 + 1% глутамакс + 10% FBS + 1% P/S + 100 мкг/мл гигромицина В. Их инкубировали с антителами IgG к LTBR в серии титрования, начиная с 15 мкг/мл в течение 6 ч, и использовали набор для обнаружения люциферазы (ONE-glow, Promega, E6110) в соответствии с инструкциями производителя. Люминесценцию определяли как меру активности NF κ B с помощью ридера Spectra Max (Molecular Devices). В качестве положительного контроля использовали антитело IgG к СВЕ11 (P1AE1873). Антитела тестировали в отсутствие или в присутствии сшивающего Fc человека средства (Fab, направленного к козьему антителу к Fc человека (Jackson immunoresearch 109-006-008)), применяемого в фиксированной концентрации 88 мкг/мл.

В частности, 25000 клеток высевали на лунку в 96-луночный планшет с плоским дном, обработанный тканевой культурой, в полной среде HeLa в день 1. В день 2 среду удаляли и антитела IgG к LTBR (+/- перекрестно-сшивающее антитело) добавляли в 100 мкл полной среды и инкубировали в течение 6 ч. Планшеты извлекали из инкубатора и уравнивали при к.т., как это было сделано для реагента ONE-glow. Добавляли 100 мкл/лунка реагента ONE-glow и переносили тестируемые растворы на планшет белого цвета перед считыванием люминесценции с помощью планшет-ридера Spectra Max (Molecular Devices). Результаты представляли на графике на **фиг. 6**, а данные сводили в таблицу в **таблице 6**.

Таблица 6. Данные репортерного анализа HeLa NFκB luc для IgG к LTBR с перекрестным связыванием и без него

С [нг/мл]	15000	3750	937,5	234,4	58,59	14,64	3,66	0,91
СВЕ11 без линкера x	25901	30977	27885	29034	29317	26626	20642	18570
СВЕ11 с линкером x	68553	69859	67201	67656	63207	56572	50895	38962
Р1АЕ9452 без линкера x	17504	17252	15683	13938	10694	10179	10083	9332
Р1АЕ9452 с линкером x	25358	28296	30272	28120	24179	23085	20849	16928
Р1АЕ9450 без линкера x	19101	17297	17911	18126	16888	14741	14400	14135
Р1АЕ9450 с линкером x	23835	28860	30148	30492	24133	24593	20089	16643
Р1АЕ9459 без x линкера	27720	25156	24148	23522	24689	25919	19887	17664
Р1АЕ9459 с линкером x	50329	45112	41638	40741	33930	30540	24921	21385
Р1АF0080 без линкера x	17813	18480	18060	18288	16663	15484	16580	14018
Р1АF0080 с линкером x	45046	47133	38220	34097	32263	30047	25184	19864
Р1АF0064 без линкера x	25975	25543	24517	26942	24355	23562	22036	17825
Р1АF0064 с линкером x	57689	53292	54818	53932	46693	43298	38697	33528
Р1АF0079 без линкера x	13574	14751	15766	13106	11598	10825	10722	10671
Р1АF0079 с линкером x	22486	23125	24863	18169	16378	12515	12210	10613
Р1АЕ9457 без линкера x	15640	15286	14923	14796	14054	13207	12283	13195
Р1АЕ9457 с линкером x	21506	23039	25444	21857	20872	17446	15264	13710
Р1АЕ5929 без линкера x	23006	23358	21339	22069	21342	19073	17525	16105
Р1АЕ5929 с линкером x	47441	48500	44811	43164	37697	31712	27081	23537

1.8. Клеточное связывание (FACS в отношении рекомбинантных клеток CHO LTBR человека)

Связывание с LTBR человека на клеточной поверхности определяли с помощью анализа FACS на рекомбинантных клетках LTBR CHO человека при 4 °С. Клетки отделяли от колб для культивирования клеток с использованием обработки аккутазой и центрифугировали при 500 g в течение 5 мин. с последующей ресуспендированием в среде для культивирования клеток. Затем клетки переносили на планшеты PP с U-образным дном и инкубировали с антителами IgG к LTBR в течение 1 ч при 4 °С в 1% BSA/PBS. После дополнительных промывок клеточносвязанные антитела к LTBR обнаруживали с использованием поликлональных антител к IgG человека, соединенных с

конъюгированным с Alexa Fluor 488 (вторичное козье антитело (F(ab')₂ к Fc IgG человека, Alexa Fluor 488, № в кат. 10120, Life Technologies). Клеточносвязанную флуоресценцию измеряли в клеточном анализаторе BD FACSCanto™ II с использованием соответствующих настроек фильтра.

5 Результаты представлены на графиках на **фиг. 7** в виде медианы значений флуоресценции, а данные обобщены в **таблице 7**. IgG к LTBR использовали в титровании с 3-кратными шагами разведения, начиная с 20 мкг/мл.

Таблица 7. Оценка связывания LTBR клеточной поверхности с IgG к LTBR (представление на графике медианы интенсивности флуоресценции)

C [мкг/мл]	СВЕ11	P1AE9459	P1AF0080	P1AF0079	P1AE9457	P1AE5929
20	49925	62004	106578	63573	87016	51024
6,6	50905	81630	67392	54718	102798	60490
2,2	40762	86534	50343	64284	101098	56505
0,73	27172	83465	55483	55329	80728	32800
0,24	11809	43572	33559	22809	27937	30450
0,08	6517	22000	17181	9044	18163	16535
0,03	6233	6756	8969	8275	7162	14926
0,01	3964	3749	5425	3383	3383	10483
0,003	2345	1319	5440	1503	2444	9034
0,001	1025	1323	4064	853	2075	7095
0,0003	1323	1334	1816	689	1145	4811
0,0001	1086	841	1013	710	1262	4821
ЕС50 [мкг/мл]	0,682	0,147	0,672	0,321	0,336	0,206

10

1.9. Связывание эпитопа антител IgG к LTBR

Группы эпитопов антител IgG к LTBR характеризовали с помощью конкурентного анализа связывания с использованием биослойной интерферометрии (BLI) на системе Octet (Molecular Devices LLC, США).

15 Вкратце, мономерный ECD LTBR (S28-M227), Fc-слитое avi биотинилированное (P1AE2835) захватывали на датчиках стрептавидина в концентрации 1 мкг/мл в буфере HBSP. В первом шаге измеряли прямое связывание антител с захваченным антигеном и определяли ассоциированный сигнал для каждого антитела («ассоциированное прямое связывание»). В качестве первичных

20 антител выбирали только стабильные связующие вещества с низкой скоростью диссоциации. Во втором шаге анализировали конкурентное связывание антител IgG к LTBR с тем же набором «первичных» антител IgG к LTBR. Вкратце, биотинилированный ECD человека в концентрации 1 мкг/мл в буфере HBSP захватывали на датчиках стрептавидина с последующим промыванием

кратковременным погружением. Первичное антитело связывали с антигеном в концентрации 10 мкг/мл в буфере HBSP для насыщения и блокирования его связывающего эпитопа («ассоциированное антитело 1»). В последующем шаге анализировали связывание второго антитела (10 мкг/мл, в буфере HBSP) с комплексом антиген/первичное антитело («ассоциированное антитело 2»). Относительное значение связывания для связывания второго антитела получали путем деления сигнала связывания (точка отчета через 120 с от стадии «ассоциированное антитело 2») второго антитела на сигнал связывания (точка отчета через 120 с от стадии «ассоциированное прямое связывание») от прямого связывания. Оцениваемые антитела группировали в различные группы эпитопов с использованием относительных значений связывания и внутреннего инструмента кластеризации, в котором используются различные алгоритмы кластеризации (например, UPGMA, WPGMA или метод Уорда). Полученная тепловая карта связывания эпитопа изображена на **фиг. 8** с соответствующими значениями связывания в процентах, показанными в **таблице 8**. Данные для 8 выбранных IgG к LTBR, подвергнутых связыванию эпитопа, приводили к назначению четырех различных групп эпитопа 1, 3, 4 и 5 (см. **таблицу 9**). P1AE9452 попадает в ту же группу эпитопа 1, что и CBE11 (P1AE1873).

Таблица 8. Связывание вторичных антител в процентах, как показано в матрице связывания эпитопов антител IgG к LTBR

	Первичное антитело				Вторичное антитело			
	P1AE18 73	P1AE94 52	P1AE59 29	P1AF00 64	P1AE94 57	P1AE94 59	P1AF00 80	P1AF00 79
P1AE18 73	2,13	93,02	94,15	100,00	91,19	71,29	100,00	6,47
P1AE94 52	81,52	4,28	82,05	99,93	69,73	67,30	100,00	6,41
P1AE94 57	88,15	96,74	93,33	100,00	5,80	5,86	35,63	5,57
P1AF00 80	79,63	97,07	89,55	2,25	1,87	1,83	14,66	1,22
P1AE59 29	83,96	93,77	2,70	3,13	100,00	58,06	100,00	3,72
P1AF00 79	83,78	96,42	7,72	8,15	88,26	8,76	47,53	3,64
P1AF00 64	93,72	100,00	3,88	2,44	94,12	2,83	15,91	3,00

Таблица 9. Группы эпитопов антител IgG к LTBR

Антитело IgG к LTBR	Группа эпитопа
P1AE1873	1
P1AE5929	4
P1AE9452	1
P1AE9457	5
P1AE9459	5
P1AF0064	4
P1AF0079	3
P1AF0080	5

1.10. Характеристика SPR антител IgG к LTBRКинетика связывания с LTBR человека, яванского макака и мыши.

5 Связывание IgG к LTBR с LTBR человека, яванского макака и мыши исследовали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore T200 или Biacore 8K (Cytiva). Все эксперименты проводили при 25 °C с использованием HBS-P (Cytiva № BR-1006-71) в качестве подвижного буфера и буфера для разведения. Специфическое

10 антитело к IgG PG LALA человека иммобилизовали на сенсорном чипе серии S CM5 (GE Healthcare № 29104988) с использованием стандартной химии связывания аминов. IgG к LTBR захватывали на поверхности, что приводило к уровням захвата от 10 до 100 RU. LTBR человека, яванского макака или мыши (P1AE7979, P1AE4411 или P1AE4410 соответственно) вводили в течение 120 с в

15 концентрациях от 3,7 до 300 нМ (серия разведений 1:3) на поверхность (фаза ассоциации) со скоростью потока 30 мкл/мин. Фазу диссоциации контролировали в течение 600 с путем промывки проточным буфером. Поверхность регенерировали путем введения 10 mM NaOH в течение 60 с при скорости потока 5 мкл/мин. Объемные различия в показателях преломления

20 корректировали путем вычитания отклика, полученного от эталонной поверхности. Холостые инъекции вычитали (двойной эталон). Записанные сенсограммы подгонял к модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения BIAevaluation. Константы скорости ассоциации и

диссоциации, а также соответствующие аффинности (равновесная константа диссоциации K_D) приведены в таблице 10 ниже.

Таблица 10. Кинетика связывания антител IgG к LTBR с LTBR человека, яванского макака и мыши, как определено с помощью SPR

Антитело IgG к LTBR	Антиген	K_a (1/мс)	K_d (1/с)	K_D (нМ)	$T_{1/2}$ (мин.)
P1AE9452	hu LTBR	1,73E+05	5,26E-05	0,3	220
	LTBR яванского макака	1,60E+05	5,92E-05	0,4	195
	mu LTBR	отсутствует/очень слабое связывание			
P1AE9450	hu LTBR	низкая активность/отсутствие связывания 1:1			
	LTBR яванского макака	низкая активность/отсутствие связывания 1:1			
	mu LTBR	отсутствие связывания			
P1AE9459	hu LTBR	7,95E+05	2,17E-04	0,3	53
	LTBR яванского макака	6,41E+05	1,91E-04	0,3	61
	mu LTBR	7,48E+05	7,95E-03	10,6	1
P1AF0080	hu LTBR	6,46E+05	1,94E-03	3,0	6
	LTBR яванского макака	5,31E+05	1,88E-03	3,5	6
	mu LTBR	6,33E+05	1,88E-02	29,7	1
P1AF0064	hu LTBR	1,45E+06	6,75E-05	0,05	171
	LTBR яванского макака	1,19E+06	5,19E-05	0,04	223
	mu LTBR	8,84E+05	3,67E-02	41,6	0,3
P1AF0079	hu LTBR	7,94E+04	2,49E-03	31	5
	LTBR яванского макака	6,76E+04	2,47E-03	37	5
	mu LTBR	отсутствие связывания			
P1AE9457	hu LTBR	6,85E+04	6,36E-04	9	18
	LTBR яванского макака	6,79E+04	6,51E-04	10	18
	mu LTBR	отсутствие связывания			
P1AE5929	hu LTBR	2,55E+05	5,22E-04	2	22
	LTBR яванского макака	1,87E+05	5,97E-04	3	19
	mu LTBR	3,82E+04	2,96E-03	77	19
P1AF7213	hu LTBR	2,99E+05	1,76E-03	5,9	7
	LTBR яванского макака	2,42E+05	2,03E-03	8,4	6
	mu LTBR	4,98E+04	7,39E-03	148,3	2
P1AE1873 (CBE11)	hu LTBR	4,89E+06	5,43E-03	1	2
	LTBR яванского макака	отсутствие связывания			
	mu LTBR	отсутствие связывания			

1.11. Снижение гидрофобности антитела к LTBR P1AE5929

Поскольку антитело IgG к LTBR P1AE5929 проявляло некоторую степень гидрофобности, предпринимали попытку получить его более гидрофильный вариант. Таким образом, создавали 3D модель V-доменов в P1AE5929, и поверхность анализировали в отношении наличия гидрофобных пятен. Одно такое пятно четко идентифицировали на кончике CDR2 домена VH, центрированного вокруг изолейцина, изображенного жирным шрифтом: IPIFG (SEQ ID NO:266). Поскольку некоторые гидрофобные остатки в этой петле могут быть существенными для связывания антигена, консервативная замена считалась существенной, и была введена мутация фенилаланина (F) в гистидин (H) для сохранения ароматического фрагмента, но при этом она была более полярная с гистидином по сравнению с фенилаланином. Эта мутация устраняла гидрофобное пятно путем введения экспонированного гистидина рядом с двумя изолейцинами и приводила к восстановлению гидрофобности антитела к LTBR P1AF7213. Кажущуюся гидрофобность P1AE5929, оцененную с помощью хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC), можно снижать с 0,733 до 0,321 (относительное время удерживания по сравнению со стандартами гидрофобности), а фактическое время удерживания уменьшалось с 41,1 мин. до 29,7 мин. при 55-минутном градиенте HIC для P1AF7213 при сохранении сопоставимой аффинности с LTBR человека, яванского макака и мыши.

Пример 2

Создание биспецифических антител к FAP/LTBR

2.1. Создание и получение биспецифических антител к FAP/LTBR

После создания и характеристики моноспецифических IgG к LTBR (фиг. 9А) несколько предпочтительных агонистических IgG к LTBR преобразовывали в 1+1 (моновалентные для LTBR) и 2+1 (бивалентные для LTBR) нацеленные на строму опухоли (т.е. нацеленные на FAP) биспецифические антитела. Создание и получение клона 4B9 антител к FAP раскрыто в WO 2012/020006 A2, который включен в данный документ посредством ссылки.

Схематические иллюстрации различных полученных биспецифических структур антител показаны на **фиг. 9Б-9Д**, а также на **фиг. 37Б-37Д**. В **таблице 11** приведены идентификаторы IgG к LTBR, а также 1+1 и 2+1 биспецифических

антител к FAP/LTBR, которые получали на основе последовательностей домена V соответствующих IgG и их полученных биспецифических производных.

Таблица 11. Идентификаторы антител к LTBR и их полученных биспецифических производных

Идентификатор IgG	Идентификатор 1+1 биспецифического антитела	Идентификатор 2+1 биспецифического антитела
P1AE1873 (CBE11)	P1AG1326	P1AE1079
P1AH0119 (BHA10)	P1AH5884	P1AH5885
P1AF5929	P1AF0532	-
P1AF7213	P1AF9728 (P1AG7504)	P1AG5684, P1AG7576, P1AG7509
P1AE9450	P1AF0535 (P1AG7506)	P1AF0544, P1AG7511
P1AE9452	P1AF0534 (P1AG7505)	P1AF9729 (P1AG7510)
P1AE9457	P1AF5257	-
P1AE9459	P1AF0537 (P1AG7507), P1AG0694	P1AF0546, P1AG7512, P1AH5886
P1AF0064	P1AF9727	-
P1AF0079	P1AF5260	
P1AF0080	P1AF5261 (P1AG7508)	P1AG7513, P1AG5683, P1AG7575

5

Биспецифические антитела к FAP/LTBR конструировали как IgG с «выступами-во-впадины» Fc с помощью технологии CrossMab. Это означает, что для получения несимметричных биспецифических антител субъединицы Fc-домена содержали мутации «выступа» или «впадины», чтобы избежать

10 неправильного спаривания тяжелых цепей. Во избежание неправильного спаривания легких цепей в биспецифических антителах, в один связывающий фрагмент вносили обмен доменов VH/VL или CH1/Скарпа (технология CrossFab). Для P1AF9727, P1AF9728, P1AF9729 и P1AG0694 домены CH1 и Скарпа плеча Fab с FAP-специфичностью сшивали. Для P1AG1326, P1AF0532,

15 P1AF0534, P1AF5257, P1AF 5260, P1AF0535, P1AF0537, P1AF5261, P1AH5884, P1AH5885 и P1AH5886 домены VH и VL плеча Fab со специфичностью к LTBR сшивали, и домены CH1 и Скарпа плеча Fab со специфичностью к FAP оснащали дополнительными зарядами, двумя отрицательно заряженными глутаматами в CH1 и положительно заряженными аргинином и лизином в Скарпа. Мутации

Pro329Gly, Leu234Ala и Leu235Ala (PG-LALA) вводили в константную область тяжелых цепей IgG1 человека для отмены связывания с Fc-гамма-рецепторами.

Биспецифические антитела к FAP/LTBR экспрессировали либо в клетках Expi293 (HEK) в Roche (P1AG1326, P1AF9728, P1AF0534, P1AF0535, P1AF0537, P1AF9727 и P1AE107), либо в клетках CHO K1 в Evitria (P1AF9729 и P1AF5261). Все биспецифические антитела к FAP/LTBR очищали в Roche с использованием комбинированной аффинной хроматографии с использованием белка А (белок А (MabSelect™ SuRe™, Cytiva) и катионообменной хроматографии (POROS™ XS) с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией (HiLoad® 16/600 Superdex® S200, Cytiva). Чистоту очищенных биспецифических антител определяли с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (например, TSK G3000 SWXL) и CE-SDS (например, Caliper LabChip GXII). Идентичность биспецифических антител подтверждали с помощью ЖХ-МС, обнаруживающей теоретические массы восстановленных и невосстановленных антител. Уровни эндотоксина определяли и они были ниже 0,33 ЕЭ/мг. Биспецифические антитела к FAP/LTBR P1AH5884, P1AH5885 и P1AH5886 получали в WuXi Biologics в CHO и очищали с помощью аффинной хроматографии с использованием белка А MabSelectSuRe LX, катионообменной хроматографии HiTrap SP HP и эксклюзионной хроматографии Superdex200.

20 **2.2. Связывание антител к FAP/LTBR с LTBR человека, яванского макака и мыши, как измеряется с помощью ELISA**

Планшеты, покрытые стрептавидином Nunc (MicroCoat № 11974998001), покрывали 25 мкл/лунка биотинилированного внеклеточного домена LTBR человека, мыши или яванского макака (P1AE2401, P1AE2655 и P1AE2656, соответственно), слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека в концентрации 125 нг/мл, и инкубировали в течение ночи при 4 °С. После промывки 3x90 мкл/лунка буфером PBST (10x PBS, Roche № 11666789001 + 0,1% Tween 20) добавляли 25 мкл биспецифических антител к FAP/LTBR в разведениях 1:3, начиная с концентрации 15 мкг/мл, и инкубировали 1 ч при к.т. После промывки (3x90 мкл/лунка буфером PBST) добавляли 25 мкл/лунка антитела к hu каппа POD (Millipore, AP502P, 1:2000) и инкубировали при к.т. в течение 1 ч. После промывки (6x90 мкл/лунка буфером PBST) добавляли 25 мкл/лунка субстрата ТМВ (Roche, 11835033001). Измерения проводили при 370/492 нм.

Связывание биспецифических антител к FAP/LTBR (моновалентное связывание для FAP и LTBR, за исключением P1AF9729, которое является моновалентным для FAP и бивалентным для LTBR) с внеклеточным доменом LTBR человека, яванского макака и мыши тестировали с помощью прямого ELISA (таблица 12). Все биспецифические антитела к FAP/LTBR демонстрируют сильное моновалентное связывание с LTBR человека со значениями EC_{50} в диапазоне 100 пМ - 1,5 нМ. P1AF9729, который является бивалентным для LTBR, связывается с EC_{50} , составляющей ~50 пМ. Связывание с LTBR человека, яванского макака и мыши этих биспецифических антител сопоставимо со связыванием моноспецифических IgG (см. таблицу 4), которые содержат одно и то же связующее LTBR вещество (обозначено ¹⁻⁴ в таблице 12). Как и их предшественники IgG, все биспецифические антитела перекрестно реагируют в LTBR яванского макака, а подгруппа также перекрестно реагирует с LTBR мыши. Бивалентные IgG к LTBR (см. таблицу 4) не демонстрируют сдвига в целом к более низким значениям EC_{50} по сравнению с их моновалентными аналогами LTBR в таблице 12. Таким образом, для бивалентных IgG в этом анализе не наблюдается связывания посредством авидности. В отличие от этого, P1AF9729 содержит то же агонистическое антитело к LTBR, что и P1AF0534, но с дополнительным LTBR-связывающим Fab-фрагментом, поэтому переход к более низкой EC_{50} , вероятно, обусловлен авидностью.

Таблица 12. Связывание на основе ELISA биспецифических антител к FAP/LTBR с LTBR человека, яванского макака и мыши

ID образца	ECD LTBR человека		ECD LTBR яванского макака		ECD LTBR мыши	
	отн. EC_{50} (нМ)	макс. связывание (OD)	отн. EC_{50} (нМ)	макс. связывание (OD)	отн. EC_{50} (нМ)	макс. связывание (OD)
P1AF9728	0,1340	3,4275	0,2011	3,435	4,1998	2,7609
P1AF0534 ¹	0,1031	3,297	0,1011	3,5524		2,1379
P1AF0535 ²	1,4189	3,0459	1,3617	3,1665		0,3013
P1AF0537 ³	0,0940	3,2212	0,1154	3,6737	0,3589	3,7791
P1AF5261 ⁴	0,1826	3,1277	0,1836	3,4246	0,3158	3,097
P1AF9727	0,1329	3,7425	0,0788	3,7563		3,207

P1AF9729 ¹	0,0457	3,6227	0,0233	3,7498	3,3701	3,1997
-----------------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

¹⁻⁴ относятся к IgG к LTBR в таблице 4.

2.3. ELISA измеряет конкуренцию лиганда для биспецифических антител к FAP/LTBR с лимфотоксином $\alpha 1\beta 2$ человека и LIGHT человека

5 Планшеты, покрытые стрептавидином Nunc (MicroCoat № 11974998001) покрывали 25 мкл/лунка биотинилированного внеклеточного домена LTBR человека (P1AE2401), слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека в концентрации 125 нг/мл (500 нг/мл для взаимодействия с LIGHT) в течение ночи при 4 °С. После промывки 3x90 мкл/лунка буфером PBST (10x PBS, Roche №11666789001 + 0,1% Tween 20) добавляли 25 мкл антител к FAP/LTBR в разведениях 1:3, начиная с концентрации 15 мкг/мл, и инкубировали 1 ч при к.т. После промывки 3x90 мкл/лунка буфером PBST (10x PBS, Roche № 11666789001 + 0,1% Tween 20) добавляли 25 мкл лиганда (лимфотоксина $\alpha 1\beta 2$ человека (P1AE1235) или His6-меченого LIGHT человека (R&D systems, 664-Li) в концентрации 250 нг/мл для лимфотоксина $\alpha 1\beta 2$ и 1000 нг/мл для LIGHT и инкубировали 1 ч при к.т. После промывки (3x 90 мкл/лунка буфером PBST) добавляли 25 мкл/лунку антитела к His6-POD (Bethyl #A190-114P, 1:10000) и инкубировали при к.т. в течение 1 ч. После промывки (6x 90 мкл/лунка буфером PBST) добавляли 25 мкл/лунка субстрата ТМВ (Roche, 11835033001). Измерения проводили при 20 370/492 нм и обобщали в таблице 13. Перечислены относительные значения IC₅₀ (нМ), а также верхняя и нижняя OD.

Таблица 13. Ингибирование взаимодействий LTBR-лимфотоксин $\alpha 1\beta 2$ и LTBR-LIGHT биспецифическими антителами к FAP/LTBR

ID образца	Взаимодействие лимфотоксина $\alpha 1\beta 2$ человека			Взаимодействие LIGHT человека		
	отн. IC ₅₀ (нМ)	отн. подгонка сверху (OD)	отн. подгонка снизу (OD)	отн. IC ₅₀ (нМ)	отн. подгонка сверху (OD)	отн. подгонка снизу (OD)
P1AF9728	0,2455	1,7	0,9	3,4803	1,5	0,9
P1AF0534 ¹		1,7	1,3			1,4
P1AF0535 ²						
P1AF0537 ³	0,5332	1,6	0,4		1,4	1,2
P1AF5261 ⁴	0,8733	2,56	1,7			1,4
P1AF9727	0,1375	1,7	0,1		1,5	0,2

P1AF9729 ¹	0,1404	1,6	0,6		1,4	1,4
-----------------------	--------	-----	-----	--	-----	-----

¹⁻⁴ относятся к LTBR к IgG в **таблице 5**.

Ингибирование белок-белкового взаимодействия между LTBR человека и человеческими лигандами лимфотоксином $\alpha 1\beta 2$ и LIGHT тестировали в многошаговом анализе ELISA. Следующие биспецифические антитела к FAP/LTBR демонстрируют ингибирование взаимодействия LTBR-лимфотоксин $\alpha 1\beta 2$ со значениями IC₅₀ от ~140 пМ до ~ 0,8 нМ: P1AF9728, P1AF0537, P1AF9727 и P1AF9729. P1AF0534 и P1AF0535 демонстрируют более слабое ингибирование взаимодействия или его отсутствие (**фиг. 10**). P1AF5261 (которое содержит антитело к LTBR из P1AF0080) снова демонстрирует увеличение сигнала анализа с повышением концентраций, как уже обнаружено для этого антитела к LTBR в формате бивалентного IgG.

Взаимодействие LTBR-LIGHT также можно ингибировать биспецифическими антителами к FAP/LTBR в этом биохимическом анализе, хотя и в меньшей степени, чем взаимодействие LTBR-лимфотоксин $\alpha 1\beta 2$. В то время как P1AF9727 и P1AF9728 демонстрируют значительное ингибирование, только слабое ингибирование при более высоких концентрациях антител обнаруживали для P1AF0535, и отсутствие ингибирования обнаруживали для P1AF9729 и для P1AF0537. P1AF5261 демонстрирует слабое увеличение сигнала при более высоких концентрациях антител в отличие от поведения бивалентного IgG P1AF0080. P1AF0534 также демонстрирует увеличение сигнала при более высоких концентрациях (**фиг. 11**).

2.4. Характеристика SPR биспецифических антител к FAP/LTBR

Кинетика связывания с LTBR человека, яванского макака и мыши.

Связывание биспецифических антител к FAP/LTBR с LTBR человека, яванского макака и мыши исследовали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore T200 или Biacore 8K (Cytiva). Все эксперименты проводили при 25 °C с использованием HBS-P (Cytiva № BR-1006-71) в качестве подвижного буфера и буфера для разведения. Специфическое антитело к IgG PG LALA человека иммобилизовали на сенсорном чипе серии S CM5 (GE Healthcare № 29104988) с использованием стандартной химии связывания аминов. Биспецифические антитела захватывали на поверхности, что приводило к уровням захвата от 10 до 100 RU. LTBR человека, яванского макака

и мыши (P1AE7979, P1AE4411 или P1AE4410 соответственно) вводили в течение 120 с в концентрациях от 3,7 до 300 нМ (серия разведений 1:3) на поверхность (фаза ассоциации) со скоростью потока 30 мкл/мин. Фазу диссоциации контролировали в течение 600 с путем промывки проточным буфером.

5 Поверхность регенерировали путем введения 10 мМ NaOH в течение 60 с скорости потока 5 мкл/мин. Объемные различия в показателях преломления корректировали путем вычитания отклика, полученного от эталонной поверхности. Холостые инъекции вычитали (двойной эталон). Полученные кривые подгоняли к модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения BIAevaluation. Константы скорости ассоциации и диссоциации, а также соответствующие аффинности (равновесная константа диссоциации KD) приведены в **таблице 14**.

10

Таблица 14. Кинетика связывания биспецифических антител к FAP/LTBR с LTBR человека, яванского макака и мыши, как определено с помощью SPR

15

Биспецифические антитела к FAP/LTBR	Антиген	Ka (1/мс)	Kd (1/с)	KD (нМ)	T1/2 (мин.)
P1AF0534	hu LTBR	2,21E+05	5,18E-05	0,2	223
	LTBR яванского макака	1,95E+05	9,57E-05	0,5	121
	mu LTBR	отсутствует/очень слабое связывание			
P1AF0535	hu LTBR	низкая активность/отсутствие связывания 1:1			
	LTBR яванского макака	низкая активность/отсутствие связывания 1:1			
	mu LTBR	отсутствие связывания			
P1AF0537	hu LTBR	7,84E+05	2,63E-04	0,3	44
	LTBR яванского макака	6,67E+05	2,05E-04	0,3	56
	mu LTBR	6,46E+05	7,52E-03	12,0	2
P1AF0546	Hu LTBR	9,99E+05	2,25E-04	0,2	51
P1AF5261	hu LTBR	9,22E+05	1,36E-03	1,5	8
	LTBR яванского макака	8,59E+05	1,27E-03	1,5	9
	mu LTBR	1,13E+06	1,62E-02	14,0	1
P1AF9727	hu LTBR	1,19E+06	1,63E-04	0,1	71
	LTBR яванского макака	1,11E+06	1,46E-04	0,1	79
	mu LTBR	9,25E+05	9,40E-02	102,0	0,1
P1AF9728	hu LTBR	2,51E+05	1,79E-03	7,1	6
	LTBR яванского макака	2,10E+05	2,09E-03	9,9	6

Биспецифические антитела к FAP/LTBR	Антиген	Ka (1/мс)	Kd (1/с)	KD (нМ)	T1/2 (мин.)
P1AE9729	mu LTBR	6,86E+04	8,91E-03	130,0	1
	hu LTBR	2,16E+05	8,60E-05	0,4	134
	LTBR яванского макака	1,86E+05	9,89E-05	0,5	117
	mu LTBR	отсутствует/очень слабое связывание			

Для выбранных 1+1 и 2+1 биспецифических антител (P1AF0534, P1AF0537, P1AF5261 и P1AF0546, P1AG5683 соответственно) моновалентное связывание (аффинность) и бивалентное связывание (авидность) с LTBR человека дополнительно характеризовали с помощью SPR. Для измерения аффинности биспецифические антитела захватывали специфическим антителом к IgG PG LALA человека, которое иммобилизовали на сенсорном чипе серии S CM3 (GE Healthcare) с использованием стандартной химии связывания аминов, и в качестве анализа использовали LTBR человека (P1AE7979). В отличие от этого, для измерения авидности 2+1 биспецифических конструкций, которые являются бивалентными для LTBR, биотинилированный LTBR человека (P1AE7979) захватывали на чипе стрептавидина SA, и биспецифические антитела использовали в качестве анализов. Результаты обобщены в **таблице 15А** и **таблице 15Б**. Показаны скорость ассоциации и диссоциации, аффинность или кажущаяся аффинность (биспецифических антител, бивалентных для LTBR) и период полужизни комплексов антитело:рецептор.

Как и ожидалось, для биспецифических антител, которые являются бивалентными для LTBR (P1AF0546 и P1AG5683 соответственно), может наблюдаться эффект авидности. Для P1AF0546 константа скорости диссоциации k_d $2,25E-04$ (1/с) и аффинность $0,2$ нМ, соответственно (**таблица 15А**), уменьшается до значений, не соответствующих спецификациям прибора (**таблица 15Б**), тогда как для P1AG5683 константа скорости диссоциации $1,23E-03$ kd (1/с) и аффинность $1,1$ нМ соответственно (**таблица 15А**), уменьшается до k_d $4,33E-05$ (1/с) и кажущаяся аффинность (авидность) $0,01$ нМ (**таблица 15Б**).

Таблица 15А. Кинетика связывания биспецифических антител к FAP/LTBR с LTBR человека, как определено с помощью SPR в условиях анализа «аффинности»

Биспецифические антитела к FAP/LTBR	k_a (1/мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)	$t_{1/2}$ (мин.)
P1AF0534	2,41E+05	8,08E-05	0,3	143
P1AF0537	8,85E+05	2,20E-04	0,2	53
P1AF0546	9,99E+05	2,25E-04	0,2	51
P1AF5261	9.86E+05	1,28E-03	1,3	9
P1AG5683	1,14E+06	1,23E-03	1,1	9

5 **Таблица 15Б. Кинетика связывания биспецифических антител к FAP/LTBR с LTBR человека, как определено с помощью SPR в условиях анализа «авидности»**

Биспецифические антитела к FAP/LTBR	k_a (1/мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)	$t_{1/2}$ (мин.)
P1AF0534	3,05E+05	4,12E-05	0,1	280
P1AF0537	9,20E+05	1,15E-04	0,1	100
P1AF0546	2,03E+06	оос*	оос*	оос*
P1AF5261	2,45E+06	1,35E-03	0,6	9
P1AG5683	3,92E+06	4,33E-05	0,01	267

*не соответствует спецификации

10 **2.5. Кинетика связывания с FAP человека**

Связывание FAP-связывающего домена биспецифических антител к FAP/LTBR исследовали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием Biacore T200 (Cytiva). Специфическое антитело IgG к His (Cytiva, №28995056) иммобилизовали на сенсорном чипе серии S CM5 (GE

Healthcare #29104988) с использованием стандартной химии связывания аминов. Антитела захватывали на поверхности, что приводило к уровням захвата от 20 до 30 RU. FAP человека (P1AA5347) вводили в течение 180 с в концентрациях от 0,37 до 30 нМ (серия разведений 1:3) на поверхность (фаза ассоциации) со скоростью потока 30 мкл/мин. Фазу диссоциации контролировали в течение 600 с путем промывки проточным буфером. Поверхность регенерировали путем инъекции 10 мМ глицина pH 1,5 в течение 60 с при скорости потока 5 мкл/мин. Объемные различия в показателях преломления корректировали путем вычитания отклика, полученного от эталонной поверхности. Холостые инъекции вычитали (двойной эталон). Полученные кривые подгоняли к модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения VIAevaluation. Константы скорости ассоциации и диссоциации, а также соответствующие аффинности (равновесная константа диссоциации K_D) приведены в **таблице 16**. Показаны скорость ассоциации и диссоциации, аффинность и период полужизни комплексов антитело:FAP.

Таблица 16. Кинетика связывания биспецифических антител к FAP/LTBR с FAP человека, как определено с помощью SPR

Биспецифические антитела к FAP/LTBR	k_a (1/мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)	$t_{1/2}$ (мин.)
P1AF0534	2,25E+06	4,70E-04	209	25
P1AF0535	1,78E+06	4,66E-04	262	25
P1AF0537	2,09E+06	4,46E-04	213	26
P1AF5261	2,08E+06	4,73E-04	228	24
P1AF9727	2,35E+06	5,72E-04	243	20
P1AF9728	2,54E+06	5,21E-04	205	22
P1AF9729	2,05E+06	5,30E-04	259	22
P1AG0694	2,77E+06	4,81E-04	174	24

Пример 3

Создание биспецифических суррогатных антител мыши

3.1. Создание биспецифических суррогатных антител мыши к FAP/LTBR

5 Тройное перекрестно-реактивное агонистическое антитело к LTBR человека, яванского макака и мыши P1AF0080 использовали для получения биспецифического 1+1 и биспецифического 2+1 (бивалентного для LTBR) суррогатного антитела мыши для исследований *in vivo* на мышах. Эти биспецифические суррогатные антитела мыши к FAP/LTBR, P1AF4664 и 10 P1AF4674 соответственно изображены на **фиг. 12А** и **12Б**. В то время как их домены V оставались человеческими, все константные домены антител являются мышинными. Fc IgG1 мыши гетеродимеризовали с помощью комплементарных зарядов в CH3 (KK+ и DD- цепи), и сайленсинг эффекторных функций Fc достигали путем введения мутаций DA PG в CH2.

15 P1AF4664 и P1AF4674 получали в Evitria с использованием их собственной векторной системы с помощью стандартных (не на основе ПЦР) методик клонирования и использованием адаптированных к суспензии клеток СНО К1 (изначально полученных от ATCC и адаптированных для бессывороточного роста в суспензионной культуре в Evitria). Для получения 20 Evitria использовала свои запатентованные, не содержащие животных компонентов и не содержащие сыворотки среды (eviGrow и eviMake2) и свой запатентованный реагент для трансфекции (eviFect). Супернатанты собирали центрифугированием и последующей фильтрацией (фильтр 0,2 мкм), а белки очищали от собранного супернатанта стандартными способами.

25 Вкратце, их очищали с помощью аффинной хроматографии с использованием белка А (Protein A MabSelectSure) и препаративной эксклюзионной хроматографии (SEC) (HiLoad 50/600 S200) в соответствии со стандартными процедурами и инструкциями производителей. Чистоту очищенных белков определяли с помощью аналитической эксклюзионной 30 хроматографии (например, TSK G3000 SWXL) и CE-SDS (например, Caliper LabChip GXII). Определяли уровни эндотоксина, которые составляли $\leq 0,11$ ЕЭ/мг и 0,07 ЕЭ/мг соответственно.

Тройное перекрестно-реактивное агонистическое антитело к LTBR человека, яванского макака и мыши P1AE9459 использовали для получения

биспецифических 2+1 (бивалентных для LTBR) нацеленных или ненацеленных на FAP (DP47) суррогатных антител мыши для исследований *in vivo* на мышах. Эти биспецифические суррогатные антитела мыши к FAP/LTBR или нацеленные или ненацеленные на LTBR, P1AG5459 и P1AG5461, соответственно являются такими, как изображено на **фиг. 12Б** и **12В**. В то время как их домены V оставались человеческими, все константные домены антител являются мышинными. Fc IgG1 мыши гетеродимеризовали с помощью комплементарных зарядов в CH3 (KK+ и DD- цепи), и сайленсинг эффекторных функций Fc достигали путем введения мутаций D265A P329G в CH2.

P1AG5459 и P1AG5461 получали и очищали в WuXi Biologics. Вкратце, их получали в CHO и очищали с помощью аффинной хроматографии с использованием белка A MabSelectSuRe LX и эксклюзионной хроматографии Superdex200 (P1AG5459) или аффинной хроматографии с использованием белка A MabSelectSuRe LX, гидрофобной хроматографии на основе взаимодействия HiTrap Butyl HP и эксклюзионной хроматографии Superdex200 (P1AG5461).

3.2. Характеристика SPR биспецифических суррогатных антител мыши к FAP/LTBR

Аффинность и авидность связывания с LTBR мыши и FAP мыши.

Поскольку P1AF4664 является моновалентным для LTBR, а P1AF4674 является бивалентным для LTBR, аффинность связывания и авидность определяли на приборе Biacore T200 (Cytiva). Все эксперименты проводили при 25 °C с использованием HBS-P (Cytiva № BR-1006-71) в качестве подвижного буфера и буфера для разведения. Чтобы определить аффинность этих биспецифических суррогатных антител мыши, козье специфическое антитело к Fc γ мыши (JacksonImmunoResearch № 115-005-071) иммобилизовали на сенсорном чипе серии S CM3, используя стандартную химию связывания аминов. Биспецифические мышинные суррогатные антитела захватывали на поверхности и вводили LTBR мыши (P1AE4410) в одноцикловом кинетическом цикле со временем ассоциации 120 с при концентрациях от 3,7 до 300 нМ (серия разведений 1:3) при скорости потока 30 мкл/мин. Аффинность к FAP мыши определяли с использованием того же сенсорного чипа путем инъекции FAP мыши (P1AD9907) с одной концентрацией 100 нМ на поверхность со временем ассоциации и скоростью потока, как описано выше. Конечную фазу диссоциации контролировали в течение 600 с путем промывки проточным буфером. Затем

поверхность регенерировали путем введения 10 мМ глицина рН 2,0 с последующим введением 10 мМ NaOH в течение 60 с каждый при скорости потока 5 мкл/мин. Объемные различия в показателях преломления корректировали путем вычитания отклика, полученного от эталонной поверхности. Холостые инъекции вычитали (двойной эталон). Полученные кривые подгоняли к модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения BIAevaluation.

Для определения avidности 2+1 биспецифического суррогатного антитела мыши P1AF4674 приблизительно 100 RU биотинилированного LTBR мыши (P1AE4410) иммобилизовали на сенсорном чипе серии S. Биспецифические суррогатные антитела мыши вводили в виде аналитов и тестировали в одноцикловом кинетическом цикле со временем ассоциации 120 с при концентрациях от 11,1 до 100 нМ (серия разведений 1:3) при скорости потока 30 мкл/мин. Конечную фазу диссоциации контролировали в течение 1800 с путем промывки проточным буфером. Затем поверхность регенерировали путем инъекции 10 мМ глицина рН 2,0 в течение 60 секунд каждая со скоростью потока 5 мкл/мин. Объемные различия в показателях преломления корректировали путем вычитания отклика, полученного от эталонной поверхности. Холостые инъекции вычитали (двойной эталон). Полученные кривые подгоняли к модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения BIAevaluation. В этой схеме анализа P1AF4674 показал явную avidность (каж. KD 0,2 нМ) в отличие от 1+1 биспецифического суррогатного антитела мыши P1AF4664 (каж. KD 5 нМ). Равновесные константы диссоциации (KD), а также периоды полужизни комплексов ($t_{1/2}$) для моновалентных (1+1) и бивалентных (2+1) биспецифических суррогатных антител мыши к FAP/LTBR, связывающихся с LTBR мыши или FAP мыши, приведены в **таблице 17**.

Таблица 17. Равновесные константы диссоциации (KD) и периоды полужизни комплексов (t1/2) для биспецифических суррогатных антител мыши к FAP/LTBR

Биспецифические антитела к mu FAP/LTBR	Условия аффинности для LTBR мыши		Условия avidности для LTBR мыши		Условия аффинности для FAP мыши
	K _D (нМ)	t1/2 (с)	каж. K _D (нМ)	t1/2 (с)	K _D (нМ)
P1AF4664 (1+1)	13	75	5	45	<0,1
P1AF4674 (2+1)	13	71	0,2	413	<0,1

5

Пример 4

Функциональная характеристика антител к LTBR

Активация LTBR приводит к активации стромальными клетками генов воспаления и развития, таких как молекула адгезии ICAM. Характеризовали биологическую активность новых агонистов LTBR путем измерения их способности активировать ICAM в эндотелиальных клетках человека и фибробластах, ассоциированных с раком (CAF), *in vitro*.

4.1. Влияние антител человека к LTBR на эндотелиальные клетки

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) обрабатывали антителами к LTBR в присутствии или в отсутствие сшивающего Fc средства, и уровни молекулы адгезии ICAM измеряли с помощью анализа FACS.

Вкратце, HUVEC (15000 клеток/лунка, кат. № C2517AS, Lonza) высевали в 96-луночный планшет, покрытый желатином, в полной среде EGM-2 (кат. № CC3162, Lonza) и давали образоваться монослою в течение ночи. Монослой HUVEC обрабатывали в течение ночи антителами к LTBR, предварительно инкубированными в течение 30 минут со сшивающим средством на основе F(ab)₂ к Fc человека или без него (кат. № 109-006-008, Jackson ImmunoResearch, молярное соотношение антитела к сшивающему средству 1:2) в среде для анализа (среда EBM-2, дополненная 2% FBS, аскорбиновая кислота, гепарин, GA-1000 и гепарин, кат. № CC3156 и CC4176, Lonza). Обработанный HUVEC отделяли аккутазой (Gibco) и окрашивали красителем live/dead (набор для определения жизнеспособности при фиксации Zombie Aqua, кат. № 423102 Biolegend) и антителом, меченым ICAM-BV421 человека (BD, кат. № 564077, разбавленное 1:100). Образцы получали на проточном цитометре (BD Fortessa).

Медиану интенсивности флуоресценции экспрессии ICAM анализировали в FlowJo и нормализовали данные по отношению к CBE11, используя следующую формулу: нормализованная MFI = (MFI - MFI_{min}) / (MFI_{max} - MFI_{min}), где MFI_{max} рассчитывали как медиану значений MFI, измеренных при верхних концентрациях CBE11 (PAE1873) с помощью сшивающего средства, и MFI_{min} рассчитывали как медиану значений MFI, измеренных при наиболее низких концентрациях CBE11 (P1AE1873) без сшивающего средства.

Новые антитела к LTBR человека индуцируют активацию ICAM на HUVEC дозозависимым и сшивающим образом (фиг. 13А-13Г).

10 **4.2. Влияние антител человека к LTBR на фибробласты, ассоциированные с раком**

Кроме того, авторы настоящего изобретения характеризовали способность новых антител к LTBR индуцировать активацию молекул адгезии во втором типе стромальных клеток *in vitro*, а именно в фибробластах, ассоциированных с раком. С этой целью культуры CAF обрабатывали антителами в присутствии или в отсутствие сшивающего Fc средства, а уровни молекулы адгезии ICAM измеряли с помощью анализа FACS.

Вкратце, иммортализованные раковые фибробласты из предстательной железы (12000 клеток/лунка, hTERT PF179T CAF, ATCC CRL-3290) высевали в 20 96-луночный планшет в полной среде (EMEM с добавлением 10% FBS, 0,075% бикарбоната натрия, 1 мкг/мл пурамицина). CAF обрабатывали в течение ночи антителами к LTBR, предварительно инкубированными в течение 30 минут со сшивающим средством на основе F(ab)₂ к Fc человека или без него (кат. № 109-006-008, Jackson ImmunoResearch, молярное соотношение антитела к сшивающему средству 1:2) в полной среде. Обработанные CAF отделяли аккутазой (Gibco) и окрашивали красителем live/dead NIR (набор для окрашивания мертвых клеток при фиксации в ближней ИК-области, Thermo Fischer Scientific, кат. № L34975) и меченым ICAM-BV421 человека антителом (BD кат. № 564077, разбавленное 1:100). Образцы получали на проточном цитометре (BD Fortessa). Медиану интенсивности флуоресценции экспрессии ICAM анализировали в FlowJo и нормализовали данные по отношению к CBE11, используя следующую формулу: нормализованная MFI = (MFI - MFI_{min}) / (MFI_{max} - MFI_{min}), где MFI_{max} рассчитывали как медиану значений MFI, измеренных при верхних концентрациях CBE11 (PAE1873) с помощью

сшивающего средства, и MFImin рассчитывали как медиану значений MFI, измеренных при наиболее низких концентрациях СВЕ11 (P1AE1873) без сшивающего средства.

5 Антитела к LTBR человека индуцируют активацию ICAM на CAF дозозависимым и сшивающим образом (фиг. 14А-14Г).

В совокупности эти примеры показывают, что новые агонистические антитела к LTBR человека способны активировать молекулу адгезии ICAM в различных стромальных клетках, и их активность строго зависит от перекрестного сшивания. Затем получали биспецифические молекулы, 10 содержащие предпочтительные новые агонисты LTBR и антигенсвязывающий домен FAP, для получения биспецифических антител к FAP/LTBR.

Пример 5

Функциональная характеристика биспецифических антител к FAP/LTBR

15 5.1. Биспецифические антитела к FAP/LTBR связывают LTBR человека, яванского макака и мыши на клетках

Для проверки способности биспецифических антител к FAP/LTBR связывать LTBR человека, яванского макака (яв.мак.) и мыши на клетках, биспецифические антитела к FAP/LTBR инкубировали с клетками, 20 сконструированными для экспрессии LTBR человека, яванского макака или мыши, и их связывание измеряли с помощью проточной цитометрии.

Вкратце, клетки CHO-K1, сконструированные для сверхэкспрессии LTBR человека, яванского макака или мыши, отделяли с помощью аккутазы (Gibco), и 100000 клеток/лунка высевали в 96-луночный планшет и инкубировали с 25 биспецифическими антителами к FAP/LTBR в среде для культивирования (DMEM/F12, 10% FBS) в течение 1 ч при 4°C. После промывки связанные с клеткой молекулы обнаруживали с использованием меченого PE антитела к Fc человека (AffiniPure F(ab')₂, фрагмент козьего антитела к IgG человека, Fcγ, Jackson Immunoresearch, кат. № 109-116-098). Клеточносвязанную 30 флуоресценцию измеряли на проточном цитометре iQue (Sartorius). Медиану интенсивности флуоресценции PE анализировали в FlowJo и данные нормализовали к необработанным контролям (MFI/MFI на исходном уровне).

Все биспецифические молекулы связывают LTBR человека и яванского макака, за исключением P1AG1326, который связывает LTBR человека, но не

связывает LTBR яванского макака (фиг. 15А и фиг. 15Б, а также на фиг. 15Г и 15Д). Эти данные соответствуют данным SPR, описанным в примере 2.4.

5 Перекрестная реактивность в отношении яванского макака является важным преимуществом новых биспецифических молекул, поскольку это позволит исследовать профиль токсичности у соответствующего вида. Поскольку LTBR является широко выраженной мишенью, снижение риска потенциальных токсикологических эффектов *in vivo* имеет большое значение.

10 P1AF0537, P1AF5261, P1AF0546, P1AG5683 и, в меньшей степени, P1AF9728 и P1AF9727 дополнительно связывают LTBR мыши на клетках (фиг. 15В и 15Е), что позволяет тестировать эффективность и фармакодинамику в мышинных сингенных моделях.

5.2. Характеристика FAP-зависимой активности биспецифических антител к FAP/LTBR *in vitro*

15 Биспецифические антитела к FAP/LTBR предназначены для ограничения активации LTBR к строме опухоли путем нацеливания на FAP. Активация LTBR приводит к активации стромальными клетками генов воспаления и развития, таких как молекулы адгезии (ICAM и VCAM) и хемоаттрактанты (CXCL9, CXCL10 и CXCL11). Авторы настоящего изобретения охарактеризовали биологическую активность биспецифических антител к FAP/LTBR путем
20 измерения их способности активировать молекулы адгезии и хемоаттрактанты FAP-зависимым образом в эндотелиальных клетках человека и фибробластах, ассоциированных с раком, *in vitro*.

5.2.1. Влияние биспецифических антител к FAP/LTBR на фибробласты, ассоциированные с раком

25 Чтобы проверить способность биспецифических антител к FAP/LTBR активировать фибробласты, ассоциированные с раком, FAP-зависимым образом *in vitro*, культуры CAF, экспрессирующие эндогенный FAP, и CAF, удаленные из экспрессии FAP, обрабатывали биспецифическими молекулами, а уровни молекулы адгезии ICAM измеряли с помощью анализа FACS.

30 Вкратце, экспрессию FAP иммортализованными раковыми фибробластами из предстательной железы (hTERT PF179T CAF, ATCC CRL-3290) нокаутировали с помощью технологии CRISPR. Исходные CAF hTERT и CAF с нокаутом FAP (hTERT CAF_delFAP) высевали в 96-луночный планшет в полной среде (EMEM, 10% FBS, 0,075% бикарбоната натрия, 1 мкг/мл пуромицина) при

плотности 12000 клеток на лунку. Клетки обрабатывали в течение ночи биспецифическими антителами к FAP/LTBR в полной среде. Обработанные клетки отделяли аккутазой (Gibco) и окрашивали красителем live/dead NIR (набор для окрашивания мертвых клеток при фиксации в ближней ИК-области, Thermo Fischer Scientific, кат. № L34975) и меченным ICAM-BV421 человека антителом (BD кат. № 564077, разбавленное 1:100). Образцы получали на проточном цитометре (BD Fortessa). Медиану интенсивности флуоресценции экспрессии ICAM анализировали в FlowJo, и данные нормализовали к исходным необработанным контролям и выражали как кратное изменение по сравнению с исходным уровнем.

Биспецифические молекулы FAP-LTBR индуцировали активацию ICAM на CAF hTERT дозозависимым и FAP-зависимым образом (фиг.16А-16Г).

5.2.2. Влияние биспецифических антител к FAP/LTBR на эндотелиальные клетки

Чтобы проверить способность биспецифических антител к FAP/LTBR активировать FAP-зависимые эндотелиальные клетки человека *in vitro*, кокультуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и клеток NIH-3T3, сверхэкспрессирующих FAP человека, обрабатывали биспецифическими молекулами. Уровни молекулы адгезии ICAM на HUVEC измеряли с помощью анализа FACS, а количества хемоаттрактантов CXCL9, CXCL10 и CXCL11, секретируемых в супернатанте, измеряли с помощью анализа Bio-plex.

Вкратце, HUVEC (13000 клеток/лунка, кат. № C2517AS, Lonza) высевали FAP, сверхэкспрессирующим NIH-3T3 или NIH-3T3 (2000 клеток/лунка), в 96-луночный планшет, покрытый желатином, в полной среде EGM-2 (кат.№ CC3162, Lonza) и давали образоваться монослою в течение ночи. Кокультуры обрабатывали биспецифическими антителами к FAP/LTBR в среде для анализа (среда EBM-2 с добавлением 2% FBS, аскорбиновой кислоты, гепарина, GA-1000 и гепарина, кат.№ CC3156 и CC4176, Lonza). Через 24 часа кокультуры отделяли с помощью аккутазы (Gibco) и окрашивали красителем live/dead NIR в PBS (набор для окрашивания мертвых клеток при фиксации в ближней ИК-области, Thermo Fischer Scientific, кат. № L34975) и антителом к ICAM-BV421 человека (BD, кат. № 564077, разбавленным в соотношении 1:100) и меченым антителом к CD31-APC/Cy7 человека (Biolegend, №кат. 303120, разбавленное 1:300).

Образцы получали на проточном цитометре (BD Fortessa). Медиану интенсивности флуоресценции экспрессии ICAM в популяции CD31+ анализировали в FlowJo, и данные нормализовали по отношению к исходным необработанным контролям и выражали как кратное изменение по сравнению с исходным уровнем. Кондиционированную среду собирали через 48 часов, а концентрацию CXCL9, CXCL10 и CXCL11 измеряли с использованием специального набора для мультиплексного анализа хемокинов Bio-plex (Biorad) в соответствии с инструкциями производителя.

Биспецифические антитела к FAP/LTBR индуцируют активацию ICAM на эндотелиальных клетках человека дозозависимым и FAP-зависимым образом (фиг. 17А-17Г). Бивалентные биспецифические молекулы P1AF0546 и P1AG5683 имеют наиболее низкие значения EC_{50} , что свидетельствует о более высокой эффективности этого 2+1 формата. Биспецифические антитела к FAP/LTBR также демонстрируют дозозависимую и FAP-зависимую индукцию CXCL9, CXCL10 и CXCL11 в супернатанте (фиг. 18А-18Е). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что биспецифические антитела к FAP/LTBR могут модулировать эндотелий для увеличения молекул адгезии и хемоаттрактантов, важных для увеличения иммунной инфильтрации в опухоли. Важно отметить, что эффект зависит от наличия FAP, что доказывает, что агонизм LTBR может быть ограничен микроокружением опухоли посредством нацеливания на FAP.

5.2.3. Влияние биспецифических антител к FAP/LTBR на адгезию Т-клеток

Предыдущий пример показал, что биспецифические антитела к FAP/LTBR модулируют эндотелий человека для усиления молекул адгезии и хемоаттрактантов, которые имеют решающее значение для каскада иммунной инфильтрации. Чтобы проверить, приводят ли эти эффекты к повышенной инфильтрации Т-клеток, авторы настоящего изобретения измеряли первый шаг каскада иммунной инфильтрации, а именно адгезию иммунных клеток к эндотелию, стимулированному биспецифическими антителами к FAP/LTBR.

Вкратце, HUVEC засеивали FAP, сверхэкспрессирующим NIH-3Т3 или NIH-3Т3, и стимулировали биспецифическими молекулами FAP-LTBR (2 нМ), как описано в предыдущем примере, или TNF α (0,5 нг/мл, Peprotech). PBMC выделяли из лейкоцитарных пленок здоровых доноров центрифугированием в

градиенте плотности с помощью Histopaque-1077 и замораживали до использования. Все виды Т-клеток очищали от замороженных аликвот РВМС с использованием набора для выделения всех видов Т-клеток (Miltenyi Biotec, кат. № 130-096-535) и следуя инструкциям производителя. Очищенные Т-клетки помещали в течение ночи в среду для Т-клеток (среда для оптимизации Т-клеток, Gibco, кат. № A1048501). Остальные Т-клетки собирали, промывали в DPBS⁺⁺ (Gibco, кат. № 14040182) с добавлением 0,2% BSA и метили кальцеином АМ (Invitrogen, кат. № C3100MP) в течение 20 мин. при 37°C. После обширной промывки меченые Т-клетки ресуспендировали в DPBS⁺⁺ 0,2% BSA и добавляли 100000 клеток/лунка к обработанным кокультурам, которые предварительно промывали средой для анализа. Т-клетки оставляли прикрепляться в течение 1 часа при 37 °С, а неприкрепленные клетки удаляли путем инверсионной промывки DPBS⁺⁺ 0,2% BSA. Фазовые и флуоресцентные изображения зеленого цвета (5 на лунку) получали с использованием системы анализа живых клеток Incucyte S3 (Sartorius), а адгезивные Т-клетки количественно определяли как площадь, покрытую флуоресцентными Т-клетками зеленого цвета, с использованием программного обеспечения для анализа изображений Incucyte.

Стимуляция TNF α □ индуцирует адгезию Т-клеток независимо от FAP и выступает в качестве положительного контроля. Т-клеточная адгезия повышалась на эндотелии, обработанном биспецифическими антителами к FAP/LTBR, и эффект зависит от наличия FAP в системе кокультивирования (фиг. 19).

В совокупности эти данные показывают, что агонизм LTBR может быть индуцирован нацеленным на FAP образом и активирует воспалительную программу с помощью эндотелия человека, что приводит к индукции адгезии Т-клеток, что является первым шагом в каскаде иммунной инфильтрации. Таким образом, биспецифические антитела к FAP/LTBR могут выступать в качестве модуляторов микроокружения опухоли для увеличения рекрутинга иммунных клеток в опухоль.

5.3. Характеристика суррогатов биспецифических антител к FAP/LTBR *in vitro* и *in vivo*

Подгруппа новых биспецифических молекул к FAP-LTBR обладает перекрестной реактивностью к LTBR мыши. Авторы настоящего изобретения

создали суррогатные молекулы мыши на остове IgG мыши, как описано в предыдущих примерах, и тестировали их активность *in vitro* и *in vivo*.

5.3.1. Активность *in vitro* суррогатов биспецифических антител к FAP/LTBR на фибробластах мыши

5 Чтобы проверить способность суррогатных молекул, направленных против FAP/LTBR активировать стромальные клетки мыши *in vitro* FAP-зависимым образом, биспецифические молекулы, направленные против FAP-LTBR, инкубировали со сверхэкспрессирующими FAP клетками NIH-3T3 или NIH-3T3, а активацию VCAM измеряли с помощью анализа FACS.

10 Вкратце, сверхэкспрессирующие FAP клетки NIH-3T3 или NIH-3T3 высевали в 96-луночный планшет в полной среде. Суррогатные молекулы, направленные против FAP/LTBR, или антитело 5G11 (агонистическое антитело к LTBR мыши, Hycult Biotech, кат. № hm1079) разбавляли в среде с низким содержанием сыворотки (DMEM, 1% FBS) и стимулировали клетки в течение
15 ночи. Обработанные клетки отделяли аккутазой (Gibco) и окрашивали красителем live/dead NIR (набор для окрашивания мертвых клеток при фиксации в ближней ИК-области, Thermo Fischer Scientific, кат. № L34975) и окрашенным Pacific Blue меченым антителом к VCAM мыши (Biolegend, кат. № 105722). Образцы получали на проточном цитометре (BD Fortessa). Медиану
20 интенсивности флуоресценции экспрессии VCAM анализировали в FlowJo, и данные нормализовали к исходным необработанным контролям и выражали как кратное изменение по сравнению с исходным уровнем.

Агонистическое антитело к LTBR мыши 5G11 индуцирует активацию VCAM на обоих типах клеток, тогда как P1AF4664 и в меньшей степени
25 P1AF4674 неактивны на клетках NIH-3T3 и индуцируют VCAM только в присутствии экспрессии FAP (**фиг. 20А и 20Б**).

5.3.2. Активность *in vitro* суррогатов биспецифических антител к FAP/LTBR на эндотелиальных клетках

30 Чтобы проверить способность суррогатных молекул, направленных против FAP/LTBR, активировать эндотелиальные клетки FAP-зависимым образом *in vitro*, культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и клеток NIH-3T3, сверхэкспрессирующих FAP человека, обрабатывали биспецифическими молекулами и измеряли уровни молекулы адгезии ICAM на HUVEC с помощью анализа FACS.

Вкратце, HUVEC (15000 клеток/лунка, Lonza кат. № C2517AS) высевали вместе с исходными сверхэкспрессирующими клетками FAP NIH-3T3 или NIH-3T3 (2000 клеток/лунку) в 96-луночный планшет с желатиновым покрытием в полной среде EGM-2 (кат. № CC3162, Lonza). Кокультуры обрабатывали в течение ночи биспецифическими молекулами, направленными против FAP-LTBR, в среде для анализа (среда EBM-2 с добавлением 2% FBS, аскорбиновой кислоты, гепарина, GA-1000 и гепарина, кат. № CC3156 и CC4176, Lonza). Обработанные кокультуры отделяли с помощью аккутазы (Gibco) и окрашивали красителем live/dead NIR в PBS (набор для окрашивания мертвых клеток при фиксации в ближней ИК-области, Thermo Fischer Scientific, кат. № L34975) и антителом к ICAM-BV421 человека (BD, кат. № 564077, разбавленным в соотношении 1:100) и меченым антителом к CD31-APC/Cy7 человека (Biolegend, №кат. 303120, разбавленное 1:300). Образцы получали на проточном цитометре (BD Fortessa). Медиану интенсивности флуоресценции экспрессии ICAM в популяции CD31+ анализировали в FlowJo.

Суррогатные молекулы, направленные против FAP/LTBR, индуцируют активацию ICAM на эндотелиальных клетках человека дозозависимым и FAP-зависимым образом (фиг. 21А и 21Б).

Взяты вместе, эти данные показывают, что суррогатные молекулы активны *in vitro* и индуцируют FAP-зависимый агонизм LTBR на стромальных клетках, аналогично эффекту молекул на основе остова человека. Затем тестировали активность суррогатных молекул *in vivo* на сингенных моделях опухолей мышей.

5.3.3. Исследование эффективности и фармакодинамики *in vivo* суррогатных молекул, направленных против FAP-LTBR, при колоректальном раке и раке поджелудочной железы, в подкожных моделях опухолей

Эффективность и фармакодинамический эффект на эндотелиальную активацию суррогатных молекул, направленных против FAP-LTBR, оценивали у мышей с подкожными колоректальными опухолями (MC38-huCEA), экспрессирующими карциноэмбриональный антиген (CEA) человека, и опухолями поджелудочной железы, экспрессирующими CEA человека (KPC4662-huCEA). Последняя модель характеризуется обильной стромой, экспрессирующей FAP⁺, и дефицитным иммунным инфильтратом на исходном уровне, в то время как опухолевая модель MC38-huCEA характеризуется

умеренной экспрессией FAP в строме и более обильным иммунным инфильтратом на исходном уровне.

Клетки KPC4662 получали из Университета Пенсильвании и конструировали собственными силами для экспрессии СЕА человека. Клетки культивировали в DMEM + FBS 10% + гигромицин 500 мкг/мл. Клетки MC38, экспрессирующие СЕА человека, получали в Научно-исследовательском институте Бекмана города Хоуп. Клетки культивировали в DMEM + FBS 10% + генетицин 500 мкг/мл. Перед введением клетки подсчитывали и 500000 клеток (MC38-huCEA) или 300000 клеток (KPC4662-huCEA) вводили в общем объеме 100 мкл в смеси 1:1 с RPMI и Matrigel подкожно в бок мышей, экспрессирующих СЕА человека. Рост опухоли измеряли по меньшей мере два раза в неделю с использованием штангенциркуля, а объем опухоли рассчитывали следующим образом: Объем опухоли = $(W^2/2) \times L$ (W: ширина, L: длина).

В исследовании MC38-huCEA (фиг. 22) мышей рандомизировали через 21 день после введения клеток, когда размеры опухоли достигали в среднем примерно 195 мм³. Всем мышам вводили i.v. 200 мкл соответствующего раствора несущей среды, P1AF4664, P1AF4674, aPD-L1 (клон 6E11), aPD-L1 + P1AF4664 и aPD-L1 + P1AF4674 (P1AF4664, P1AF4674 3 раза в неделю, 5 мг/кг и aPD-L1 два раза в неделю 5 мг/кг, для aPD-L1 первую инъекцию вводили i.p. в дозе 10 мг/кг). Для получения надлежащего количества соединений на 200 мкл исходные растворы разбавляли гистидиновым буфером (20 mM гистидин, 140 mM NaCl, pH 6,0). В дни 9 и 16 после начала обработки пять мышей, или количество выживших мышей, умерщвляли. Опухоли этих мышей обрабатывали для последующего анализа.

Опухолевые суспензии отдельных клеток для анализа посредством проточной цитометрии получали путем расщепления образцов опухоли либеразой и ДНКазой. Затем окрашивали отдельные клеточные суспензии, в частности, для CD45 мыши, СЕА PerCP-Cy5.5 человека, подопланина PE-Cy7 мыши, CD31 APC/Cy7 и ICAM APC мыши. Образцы получали на проточном цитометре BD Fortessa, а данные анализировали в FlowJo.

В исследовании KPC4662-huCEA (фиг. 25) через 16 дней первоначального роста опухоли у мышей, когда размеры опухоли достигали примерно 140 мм³, мышей рандомизировали и обрабатывали три раза в неделю либо гистидиновым буфером (несущая среда), либо P1AF4664 или P1AF4674 (10 мг/кг). Всем мышам

вводили i.v. 200 мкл соответствующего раствора. Для получения надлежащего количества соединений на 200 мкл исходные растворы разбавляли гистидиновым буфером (20 mM гистидин, 140 mM NaCl, pH 6,0). В день 6 после начала обработки по пять мышей из каждой группы умерщвляли. Опухоли этих мышей обрабатывали для последующего гистологического анализа.

Для гистологического анализа иммунофлуоресцентным методом (трехмерная обработка изображений, 3DIP) опухоли фиксировали в растворе BD Cytofix, разведенном в соотношении 1:4 в PBS, в течение примерно 20 часов. После промывки и переноса в PBS опухоли помещали в 4% легкоплавкий гель агарозы. Срезы опухолей (толщиной 70 мкм) вырезали из этих блоков с использованием Leica VT1200s Vibratome, оснащенного обычными бритвенными лезвиями. Затем срезы пермеабилizировали (TBS + 0,3% Triton-X) и блокировали с использованием BSA и сыворотки мыши (каждая 1%) в течение двух часов перед окрашиванием в течение ночи (около 15 часов) при комнатной температуре с использованием, среди прочего, следующих антител: PNAд/Меса79 (AF647) и CD31 (AF594). Изображение получали на инвертированном конфокальном микроскопе Leica SP8. Количественное определение изображения проводили в Imaris 9.6 (Bitplane).

Представление на графике данных о росте опухоли, проточной цитометрии, а также анализа 3DIP проводили в тестах GraphPad PRISM 8 и с помощью однофакторного Anova, выполняя множественные сравнения между группами, с поправкой Холма-Сидака для множественного тестирования.

В исследовании MC38-huCEA (фиг. 22) наблюдали, что обработка суррогатными молекулами FAP-LTBR P1AF4664 и P1AF4674 ингибирует рост опухолей MC38-huCEA при монотерапии и улучшает ингибирование роста опухоли aPD-L1 (фиг. 23А-23В). Кинетика роста опухоли показывает, что ингибирование роста опухоли у обработанных животных начинает проявляться через приблизительно одну неделю обработки (фиг. 23А и 23В). Через 12 дней после начала обработки наблюдается статистически значимая разница в объеме опухоли между несущей средой и P1AF4674, а также между несущей средой и обеими комбинациями aPD-L1 с P1AF4664 и P1AF4674. Кроме того, комбинация P1AF4674 и aPD-L1 демонстрирует статистически значимый меньший объем опухоли, чем монотерапия aPD-L1 (фиг. 23Б). Это указывает на то, что 2+1

формат (P1AF4674) демонстрирует превосходное ингибирование роста опухоли по сравнению с 1+1 форматом (P1AF4664).

Анализ посредством проточной цитометрии опухолевых суспензий отдельных клеток в день 9 и 16 после начала обработки выявил повышение экспрессии молекулы адгезии ICAM на эндотелии опухоли при обработке суррогатными молекулами FAP-LTBR (фиг. 24А и 24В). P1AF4674, которое является бивалентным агонистом LTBR, превосходит моновалентную молекулу P1AF4664.

В исследовании KPC4662-huCEA (фиг. 25), через 6 дней после начала обработки, наблюдали посредством гистологического анализа статистически значимое увеличение присутствия наружных эндотелиальных венул (HEV) в опухолевой ткани при обработке суррогатными молекулами FAP-LTBR P1AF4664 и P1AF4674 (фиг. 26А, 26Б и 26В).

5.3.4. Исследование эффективности и фармакодинамики *in vivo* суррогатной молекулы, направленной против FAP-LTBR, в комбинации с антителом к PD-L1 в ортотопической модели рака молочной железы.

Эффективность и фармакодинамический эффект на эндотелиальную активацию, секрецию цитокинов и иммунную инфильтрацию биспецифического антитела к FAP/LTBR P1AG5459 в монотерапии или комбинации с ингибитором контрольных точек aPD-L1 оценивали у мышей с ортотопическими опухолями молочной железы (EMT6). Модель характеризуется обильной стромой, экспрессирующей FAP⁺, и незначительным иммунным инфильтратом, в основном локализованным на краю опухоли на исходном уровне.

Клетки EMT6 получали из ATCC (CRL-2755). Клетки культивировали в DMEM + 15% FCS. Перед введением клетки подсчитывали и 1000000 клеток вводили в общем объеме 50 мкл в смеси 1:1 с RPMI и Matrigel в жировую подушечку молочной железы мышей BALB/c. Рост опухоли измеряли по меньшей мере два раза в неделю с использованием штангенциркуля, а объем опухоли рассчитывали следующим образом: Объем опухоли = $(W^2/2) \times L$ (W: ширина, L: длина). В этом исследовании отвечающие на обработку и не отвечающие на обработку определяли как имеющие объем опухоли в анализируемой временной точке ниже или выше объема опухоли в начале терапии соответственно.

Опухолевые суспензии отдельных клеток для анализа посредством проточной цитометрии и гистологического анализа проводили, как описано в 5.3.3, с добавлением антител к CD8 (BV421), CD4 (BV570) и B220 (BV711) к гистологической панели.

5 Уровни хемокина в опухолевых лизатах оценивали с использованием набора BSA (Thermo Scientific, набор для анализа белка Pierce BSA, №23225, США) в соответствии с инструкциями производителя, и планшет считывали с помощью ридера Spectramax i3 для ELISA (Molecular Devices, США). Затем для измерения уровня цитокинов и хемокинов в белковом лизате использовали Bio-Plex Pro™ Mouse Chemokine Panel 33-Plex (№ 12002231, BioRad, США). Образцы 10 готовили в соответствии с инструкциями производителя в 96-луночных магнитных планшетах (плоскодонные планшеты Bio-Plex Pro™, №171025001, BioRad, США). Анализ считывали на аппарате Flexmap 3D® (Luminex, США) в соответствии с инструкциями программного обеспечения xPonent®, версия 4.2, 15 поставляемого с аппаратом.

В исследовании EMT6 (**фиг. 27**) наблюдали, что обработка суррогатной молекулой, направленной против FAP-LTBR, P1AG5459 эффективно контролирует ортотопические опухоли EMT6 при монотерапии и дополнительно улучшает частичное ингибирование роста опухоли при обработке антителом к PD-L1, индуцируя регрессию опухоли (**фиг. 28А-Б**). В конце исследования 3 20 мыши в группе монотерапии и 5 мышей в группе комбинации не имели опухолей. Важно отметить, что эффект ингибирования роста опухоли не наблюдается, когда мышью обрабатывают нецелевым (DP47) антителом к LTBR (P1AG5461, **фиг. 28А-Б**), демонстрируя FAP-зависимый эффект 25 биспецифического антитела к FAP/LTBR *in vivo*. Проточная цитометрия суспензии отдельных клеток опухоли в день 13 после начала терапии выявила FAP-зависимую активацию молекул адгезии ICAM (**фиг. 29А**) и VCAM (**фиг. 29Б**) на эндотелии опухоли во всех группах, обработанных P1AG5459, но не P1AG5461. Повышение экспрессии молекул адгезии на эндотелии опухоли 30 может способствовать трансэндотелиальной миграции иммунных клеток из крови в ткань. Кроме того, обильная популяция Meca79+ HEV может быть обнаружена в опухолях, обработанных P1AG5459 (**фиг. 29В**). HEV представляют собой специализированные сосуды для экстравазации наивных Т-клеток и Т-клеток памяти в лимфоидных органах и недавно были связаны с повышенной

иммунной инфильтрацией в опухолях (Asrir et al, Cancer Cell. 2022 Mar 14;40(3):318-334.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2022.01.002). Наблюдаемые показания PD были гетерогенными, но более высокий эффект на уровни молекул адгезии на эндотелиальных клетках и более высокий процент HEV наблюдают в опухолях, характеризующихся как отвечающие на обработку (незаштрихованные квадраты, □) по сравнению с неответающими на обработку (заштрихованные круги, ●, **фиг. 29А-В**). Иммунофлуоресцентный гистологический анализ подтвердил значимое увеличение присутствия Меса79+ дифференцированных наружных эндотелиальных венул (**фиг. 30А**) в опухолях, обработанных только P1AG5459 или в комбинации с антителом аPD-L1. HEV гораздо реже обнаруживаются в опухолях, обработанных P1AG5461, что подтверждает FAP-зависимую активность FAP LTBR *in vivo*. Гистологический анализ также показал, что обработка P1AG5459 увеличивает инфильтрацию В-клеток (**фиг. 30Г**), CD8 (**фиг. 30Б**) и CD4 Т-клеток (**фиг. 30В**) в опухоль. Повышенный иммунный инфильтрат также был гетерогенным, но более высокий уровень иммунной инфильтрации наблюдается в опухолях отвечающих на обработку (незаштрихованные квадраты, □), по сравнению с неответающими на обработку (заштрихованные круги, ●). Повышенный иммунный инфильтрат является FAP-зависимым, поскольку он не наблюдается при обработке нецелевой молекулой P1AG5461. Анализ лизатов опухоли выявил увеличение количества хемокинов CXCL13 (**фиг. 31А**), CCL5 (**фиг. 31Б**) и CXCL10 (**фиг. 31В**) в ответ на обработку P1AG5459. Повышение уровня хемокинов в месте опухоли в ответ на обработку FAP-LTBR может опосредовать привлечение большего количества иммунных клеток в месте опухоли.

25 5.3.5. Исследование эффективности *in vivo* с суррогатной молекулой, направленной против FAP-LTBR, и группами деплеции Т- и В-клеток в ортотопической модели рака молочной железы.

Зависимость противоопухолевой эффективности P1AG5459 при монотерапии оценивали у мышей, лишенных CD4 Т-клеток, CD8 Т-клеток или CD20⁺-экспрессирующих В-клеток и несущих ортотопические опухоли молочной железы (EMT6). Модель характеризуется обильной стромой, экспрессирующей FAP⁺, и незначительным иммунным инфильтратом, в основном локализованным на краю опухоли на исходном уровне.

Клетки EMT6 получали из ATCC (CRL-2755). Клетки культивировали в DMEM + 15% FCS. Перед введением клетки подсчитывали и 100000 клеток вводили в общем объеме 50 мкл в смеси 1:1 с RPMI и Matrigel в жировую подушечку молочной железы мышей BALB/c. Рост опухоли измеряли по 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

меньшей мере два раза в неделю с использованием штангенциркуля, а объем опухоли рассчитывали следующим образом: Объем опухоли = $(W^2/2) \times L$ (W: ширина, L: длина). Деплецию CD4/CD8 Т-клеток проводили путем инъекции 150 мкг антитела к CD4 (GK1,5) или антитела к CD8 (2,43) в дни 4, 5, 6, 9 и 16 внутрибрюшинно. Деплецию В-клеток проводили путем инъекции 250 мкг антитела к CD20 (SA271G2) в день 8 внутривенно.

Для представления на графике данных роста опухоли проводили тесты в GraphPad PRISM 8 и однофакторном Anova, выполняя множественные сравнения между указанными группами, с поправкой Хольма-Сидака для множественного тестирования.

В этом исследовании подтвердили, что обработка суррогатной молекулой, направленной против FAP-LTBR, P1AG5459 эффективно контролирует ортотопические опухоли EMT6 при монотерапии (см. **фиг. 32А-32В**). Также показано, что в отсутствие CD8 Т-клеток опухоли, обработанные несущей средой и P1AG5459, растут одинаково быстро. В день 15, когда на группу все еще остается более 3 животных, статистический анализ не выявил статистически значимой разницы в объеме опухоли между группами с деплетирующей CD8 несущей средой и P1AG5459, что показывает, что CD8 Т-клетки необходимы для опосредования эффективности P1AG5459 в модели опухоли EMT6 (**фиг. 32Б**). Аналогичным образом, статистически значимая разница в объеме опухоли между группами с деплетирующей CD4 несущей средой и P1AG5459 и между группами с деплетирующей CD20⁺ В-клетки несущей средой и P1AG5459, которые анализировали в день 20 (**фиг. 32В**), что позволяет предположить, что CD4 и В-клетки также играют роль в опосредовании эффективности P1AG5459.

5.3.6. Фармакодинамическое исследование in vivo с суррогатной молекулой, направленной против FAP-LTBR, в ортотопической модели CRC, несущего мутации в Apc/KrasG12D/p53 shRNA/Smad4.

Фармакодинамические эффекты P1AG5459 при монотерапии оценивали у мышей с ортотопическими опухолями CRC (органонидная модель АКPS). Модель характеризуется обильной стромой, экспрессирующей FAP⁺, и очень

незначительным иммунным инфильтратом, если он вообще локализован на краю опухоли на исходном уровне.

Органоиды колоректального рака АКPS (кишечные органоиды мыши, сконструированные с помощью CRISPR-Cas9 для хранения мутаций в *Apc*, *KrasG12D* (нокаут), *p53* (нокаут) и *Smad4*) получали от Genentech. Органоиды культивировали в среде, содержащей добавку B-27TM (GibcoTM), N₂, расширенной среде DMEM/F-12 (GibcoTM) плюс глутамин и HEPES. Перед введением подсчитывали количество органоидов и вводили 200 органоидов в общем объеме 50 мкл той же среды, описанной выше, в подслизистую ободочной кишки (с помощью колоноскопии) мышей C57BL/6-n. Рост опухоли контролировали еженедельно с помощью колоноскопии.

Сбор опухоли проводили, когда мышей необходимо было умертвить в соответствии с местными рекомендациями или, наконец, в день 50 после имплантации. Для гистологического анализа иммунофлуоресцентным методом (трехмерная обработка изображений, 3DIP) опухоли фиксировали в буферном растворе для фиксации BD CytifixTM, разведенном в соотношении 1:4 в PBS, в течение приблизительно 20 часов. После промывки и переноса в PBS опухоли помещали в 4% легкоплавкий гель агарозы. Срезы опухолей (толщиной 70 мкм) вырезали из этих блоков с использованием Leica VT1200s Vibratome, оснащенного обычными бритвенными лезвиями. Затем срезы пермеабелизовали (TBS + 0,3% Triton-X) и блокировали с использованием BSA и сыворотки мыши (каждая 1%) в течение двух часов перед окрашиванием в течение ночи (около 15 часов) при комнатной температуре с использованием, среди прочего, следующих антител: Ki67 (AF532), B220 (AF647), CD8 (BV421), CD4 (BV570), CD11c (BV480), PD1 (PE), TCF1 (AF488), PNA_d/Meca79 (AF647) и CD31 (AF594). Изображение получали на инвертированном конфокальном микроскопе Leica SP8. Подготовку изображения проводили в Imaris 9.9 (Bitplane). Все окрашивания, кроме одного, проводили на одном и том же участке (как показано на **фиг. 34**).

Как наблюдали в других мышинных моделях, подтверждали, что обработка P1AG5459 индуцирует дифференцировку Meca79⁺ HEV (**фиг. 33**). Важно отметить, что HEV развиваются внутри опухоли, но не в соседней нормальной ткани толстой кишки (**фиг. 33**). Кроме того, обработка P1AG5459 значительно увеличила количество CD8 T-клеток в опухоли (**фиг. 33**). Кроме того, в одном

образце мыши, получавшей обработку P1AG5459, которую умерщвляли в день 50, было обнаружено, что иммунный инфильтрат опухоли организовался в третичную лимфоидную структуру (TLS), характеризующуюся наличием миелоидных клеток CD11c, различных зон В- и Т-клеток, пролиферирующего центра В-клеток и содержащего активированные Т-клетки (PD1+) и Т-клетки, экспрессирующие маркер стволовости TCF1 (фиг. 34).

Это исследование показало не только то, что обработка P1AG5459 может увеличить содержание иммунных клеток и HEV в опухоли, но также позволяет формировать третичные лимфоидные структуры, которые, как известно, коррелируют с улучшенным ответом на лечение ингибитором контрольных точек при различных видах рака (Schumacher and Thommen, DOI: 10.1126/science.abf9419).

В совокупности данные, описанные в примере 5, показывают, что новые биспецифические антитела к FAP/LTBR являются эффективными *in vivo* и способны контролировать рост опухоли в модели колоректального рака и иммунодефицитного рака молочной железы. Биспецифические антитела к FAP/LTBR синергизировали с ингибитором контрольных точек, направленным против PD-L1, что позволяет предположить, что биспецифические антитела к FAP/LTBR можно использовать для улучшения ответа на ингибиторы контрольных точек в клинических условиях. Данные также показывают, что биспецифические антитела к FAP/LTBR модулируют микроокружение опухоли, особенно сосудистую сеть опухоли, путем активации молекул адгезии и дифференцировки сосудов по отношению к фенотипу HEV, а также путем индуцирования секреции хемоаттрактантов. В совокупности эти эффекты улучшают иммунную инфильтрацию в опухоль, а увеличение содержания иммунных клеток опосредует противоопухолевую эффективность новых биспецифических антител к FAP/LTBR, которые демонстрировали на ортотопической модели рака молочной железы. Кроме того, новые биспецифические антитела к FAP/LTBR могут стимулировать образование третичных лимфоидных структур, что наблюдается в модели ортотопического колоректального рака.

Пример 6

Сравнение и превосходство биспецифических антител к FAP/LTBR над известными антителами к LTBR

5 6.1. Влияние биспецифических антител к FAP/LTBR на эндотелиальные клетки *in vitro*

Для функционального сравнения биспецифических антител к FAP/LTBR, содержащих антитело к LTBR P1AE9459 или известные антитела к LTBR CBE11 (как описано в US 7,429,644 B2) и ВНА10 (как описано в US 7,429,645 B2), кокультуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и клеток 10 NIH-3T3, сверхэкспрессирующих FAP человека, обрабатывали биспецифическими молекулами, а уровни молекулы адгезии ICAM на HUVEC измеряли с помощью анализа FACS, как описано в 5.2.2.

Все тестируемые биспецифические молекулы активируют ICAM на эндотелиальных клетках в присутствии FAP с аналогичной активностью (фиг. 15 35А). Большинство молекул неактивны в отсутствие FAP (фиг. 35Б), однако биспецифическое антитело, содержащее CBE11 в качестве антигенсвязывающего домена агониста LTBR (P1AE1079), демонстрирует некоторую активность в отсутствие FAP в высоких дозах, что свидетельствует о превосходстве биспецифических форматов, содержащих новое агонистическое антитело к 20 LTBR или ВНА10, над клоном антитела CBE11.

6.2. Биспецифические антитела к FAP/LTBR связывают LTBR человека, яванского макака и мыши на клетках

Для сравнения способности биспецифических антител, содержащих антитело к LTBR P1AE9459 и известные антитела к LTBR CBE11 и ВНА10, 25 связывать LTBR человека, яванского макака (яв.мак.) и мыши на клетках, биспецифические антитела к FAP/LTBR инкубировали с клетками, сконструированными для экспрессии LTBR человека, яванского макака или мыши, и их связывание измеряли с помощью проточной цитометрии, как описано в примере 5.1.

30 Все биспецифические антитела к FAP/LTBR связываются с LTBR человека на клетках аналогичным образом, однако P1AE1079 связывается с LTBR человека менее эффективно, чем биспецифические антитела, содержащие ВНА10 или антитело к LTBR P1AE9459. Кроме того, биспецифические антитела с моновалентным связыванием с LTBR (1+1 формат), содержащие ВНА10, менее

хорошо связываются с LTBR человека, чем молекулы с бивалентным связыванием с LTBR (для ВНА10, а также для нового антитела к LTBR P1AE9459) (фиг. 36А).

Биспецифические антитела, содержащие новое антитело к LTBR P1AE9459 или ВНА10, связываются аналогично LTBR яванского макака, однако биспецифическая молекула, содержащая СВЕ11, не связывается с LTBR яванского макака (фиг. 36Б) в соответствии с примером 5.1. Перекрестная реактивность в отношении яванского макака является важным преимуществом нового биспецифического антитела, поскольку это позволит исследовать профиль токсичности у соответствующего вида. Поскольку LTBR является широко выраженной мишенью, снижение риска потенциальных токсикологических эффектов *in vivo* имеет большое значение.

Интересно, что только биспецифические молекулы, содержащие новое антитело к LTBR P1AE9459, связываются с LTBR мыши на клетках, тогда как биспецифические молекулы, содержащие известные антитела СВЕ11 или ВНА10, не реагируют перекрестно с LTBR мыши (фиг. 36В). Эти данные свидетельствуют о том, что новое антитело к LTBR P1AE9459 связывает отдельный эпитоп, который обеспечивает перекрестную реактивность у трех видов, несмотря на низкую идентичность между LTBR человека и мыши (69% выравнивание ECD человека и мыши). Связывание с LTBR мыши является важным преимуществом новых биспецифических антител, поскольку оно позволяет проводить прямое исследование эффективности *in vivo* и фармакодинамических эффектов одного и того же связующего вещества в соответствующих сингенных моделях, требуя только муринизации остова. Сингенные модели, отражающие различные биологии опухолей человека, могут направлять исследование соответствующих стратегий комбинирования и стратегий отбора пациентов для информирования о клинической разработке.

6.3. Сравнение связывания с LTBR посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Связывающее поведение нового агонистического антитела к LTBR P1AE9459 сравнивали с таковым у известных антител к LTBR СВЕ11 и ВНА10. Связывание антител IgG к LTBR с LTBR человека, яванского макака и мыши исследовали с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore T200 или Biacore 8K (Cytiva). Все

эксперименты проводили при 25 °С с использованием HBS-P (Cytiva № BR-1006-71) в качестве подвижного буфера и буфера для разведения. Специфическое антитело к IgG PG LALA человека иммобилизовали на сенсорном чипе серии S CM5 или CM3 с использованием стандартной химии связывания аминов. IgG к LTBR захватывали на поверхности, что приводило к уровням захвата от 10 до 100 RU. LTBR человека, яванского макака или мыши (P1AE7979, P1AE4411 или P1AE4410 соответственно) вводили в течение 120 с в концентрациях от 3,7 до 300 нМ (серия разведений 1:3) на поверхность (фаза ассоциации) со скоростью потока 30 мкл/мин. Фазу диссоциации контролировали в течение 600 с путем промывки проточным буфером. Поверхность регенерировали путем введения 10 мМ NaOH в течение 60 с при скорости потока 5 мкл/мин. Объемные различия в показателях преломления корректировали путем вычитания отклика, полученного от эталонной поверхности. Холостые инъекции вычитали (двойной эталон). Записанные сенсограммы подгонял к модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения BIAevaluation. Константы скорости ассоциации и диссоциации, а также соответствующие аффинности (равновесная константа диссоциации KD) приведены в **таблице 18** ниже. Новое агонистическое антитело к LTBR P1AE9459 является перекрестно реактивным к LTBR человека, яванского макака и мыши, тогда как CBE11 связывается только с LTBR человека, а BHA10 является перекрестно реактивным к LTBR человека и яванского макака, но не связывается с LTBR мыши. Аффинности P1AE9459 и BHA10 к LTBR человека сопоставимы (0,3 нМ по сравнению с 0,5 нМ соответственно), тогда как аффинность CBE11 к LTBR человека в ~3 раза ниже, чем у P1AE9459. По сравнению с известными антителами CBE11 и BHA10, P1AE9459 является наиболее аффинным антителом к LTBR человека и яванского макака и единственным, которое перекрестно реагирует с рецептором мыши.

Таблица 18. Сравнение кинетики связывания антител IgG к LTBR с LTBR человека, яванского макака и мыши, как определено с помощью SPR

Антитело IgG к LTBR	Антиген	Ka (1/мс)	Kd (1/с)	KD (нМ)	T1/2 (мин.)
P1AE9459 (9459)	hu LTBR	7,95E+05	2,17E-04	0,3	53
	LTBR яванского макака	6,41E+05	1,91E-04	0,3	61
	mu LTBR	7,48E+05	7,95E-03	10,6	1
P1AE1873 (CBE11)	hu LTBR	4,89E+06	5,43E-03	1	2
	LTBR яванского	отсутствие связывания			

Антитело IgG к LTBR	Антиген	Ka (1/мс)	Kd (1/с)	KD (нМ)	T1/2 (мин.)
	макака mu LTBR	отсутствие связывания			
P1AH0119 (BHA10)	hu LTBR	1,72E+06	8,53E-04	0,5	14
	LTBR яванского макака	1,31E+06	1,54E-03	1,18	8
	mu LTBR	отсутствие связывания			

6.4. Определение эпитопа с помощью масс-спектрометрии на основе обмена водород/дейтерий (HDX)

Эпитопы агонистического антитела к LTBR P1AE9459, а также CBE11 (P1AE1873) и BHA10 (P1AH0119) определяли с помощью масс-спектрометрии на основе обмена водород/дейтерий. Для сравнения также определяли поверхность связывания одноцепочечной конструкции природного лиганда человеческого лимфотоксина $\alpha\beta 2$ (P1AE1235) с LTBR человека (P1AH2680), который клонировали из серина 28 в метионин 227.

LTBR человека метили дейтерием путем инкубации в забуференной дейтерированной воде (D_2O) либо в отсутствие антитела или лиганда (состояние белка 1), либо в присутствии ведущего антитела P1AE9459 (состояние белка 2), либо в присутствии антитела CBE11 (состояние белка 3), либо в присутствии BHA10 (состояние белка 4), либо в присутствии одноцепочечной конструкции природного лиганда лимфотоксина человека $\alpha\beta 2$ (состояние белка 5) в течение различной продолжительности. Использовали следующие буферы и приборы: H_2O -буфер (20 мМ гистидин, 140 мМ NaCl, pH 6,0 в H_2O), $D_2 O$ -буфер (20 мМ гистидин, 140 мМ NaCl, pH 6,0 в D_2O) и гасящий буфер (4 М мочевины, 0,17М KH_2PO_4 , 0,3 М трис-(2-карбоксиил)фосфина гидрохлорид (TCSP), pH 2,8). Для пипетирования и маркировки использовали автоматический пробоотборник PAL HTC от Leap Technologies. Все образцы для маркировки (0 мин., 15 секунд, 1, 10, 60 и 300 минут) выполняли в трех повторностях.

После различного времени мечения реакцию обмена гасили путем добавления гасящего буфера. Впоследствии все образцы расщепляли протеазой непентезином-2. Полученные пептиды разделяли с помощью обращенно-фазовой UPLC и идентифицировали с помощью MS/MS-детекции с использованием масс-спектрометра Thermo Orbitrap FusionTM LumosTM TribidTM (Thermo Fisher Scientific). Для оценки данных с целью идентификации пептидов с различными

уровнями дейтерирования LTBR в состояниях белка 1, 2, 3, 4 и 5 соответственно, использовали коммерчески доступные программные средства PeaksTM Studio от Bioinformatics Solutions, Inc. (BSI) и HDExaminer от Sierra Analytics.

5 Более подробно, анализы образцов, меченых дейтерием, проводили следующим образом: меченые и гашеные образцы загружали в охлажденную (0°C) систему Waters® nanoACQUITY UPLC® (Waters Corp., Милфорд, Массачусетс). Расщепление аспарагиновой протеиназой непентезином-2 (Affipro, № AP-PC-004) проводили онлайн при 20 °C. Полученные пептиды улавливали и обессоливали при 0 °C в течение 3 мин. (0,23% муравьиная
10 кислота в воде, 200 мкл/мин., WatersTM VanGuard C18, 1,7 мкм, 2,1x5 мм). Затем проводили обратное разделение фаз (колонка WatersTM VEN C18, 1,7 мкм, 1x100 мм) с использованием градиента от 8 до 35% с 0,23% муравьиной кислоты в ацетонитриле (pH 2,5) за 7 мин. для всех образцов при скорости потока 40 мкл/мин.

15 Масс-анализ проводили с помощью масс-спектрометра Thermo Orbitrap FusionTM LumosTM TribidTM с использованием положительной ионно-электрораспылительной ионизации. Для идентификации пептида с использованием образца времени мечения 0 мин. использовали коллизионную диссоциацию с более высокой энергией (HCD) для первого повтора,
20 диссоциацию переноса электронов (ETD) для второго повтора и диссоциацию переноса электронов/коллизии с более высокой энергией (EThcD) для третьего повтора, все в режиме сбора данных (DDA). Для всех измерений маркировки было достаточно режима полного сканирования.

С точки зрения оценки данных, PeaksTM Studio, Bioinformatics Solutions
25 Inc. (BSI) использовали для идентификации пептидов в соответствии с инструкциями поставщика. HDExaminer, Sierra Analytics использовали для определения включения дейтерия в пептиды по различному времени мечения по сравнению с недейтерированным контролем (время мечения 0 мин.) в соответствии с инструкциями поставщика. Для определения эпитопов
30 использовали карту разности дейтерации HDExaminer, сравнивая уровни дейтерации в связанных белках в состояниях 2, 3, 4 и 5 соответственно с несвязанным белком в состоянии 1.

Карты разности дейтерирования, определяемые для различных антител к LTBR, а также для природного лиганда лимфотоксина человека $\alpha 1\beta 2$

(P1AE1235), показаны на **фиг. 38А-38Г**. Сводные данные по соответствующим областям эпитопа приведены в **таблице 19** ниже. Эпитоп P1AE9459 перекрывается, но отличается от эпитопа антитела ВНА10. Антитело СВЕ11 связывается с совершенно другим эпитопом.

5 **Таблица 19. Сводные данные по областям эпитопа, определяемым с помощью масс-спектрометрии HDX**

Антитело к LTBR или его лиганд	Область эпитопа	АА (от – до) на P1AH2680 (UniProt P36941-1)
P1AE9459	-QCRCQPGMFCAAWALEC- (SEQ ID NO:351)	96-112 (123-139)
P1AH0119 (ВНА10)	-AWALECTHCELL- (SEQ ID NO:352)	107-118 (134-145)
P1AE1873 (СВЕ11)	-QTCRDQEKEYYEPQHR- (SEQ ID NO:353) -SRIRDTVС- (SEQ ID NO:354)	14-29 (41-56)
		46-53 (73-80)
P1AE1235 (лимфотоксин человека α 1 β 2)	-SYNEHWNLYLTICQL – (SEQ ID NO:355) -WALECTHCELLSDCPPGT – (SEQ ID NO:356)	60-73 (87-100)
		108-125 (135-152)

10 Хотя вышеизложенное изобретение было подробно описано посредством иллюстрации и примеров в целях ясности понимания, описания и примеры не следует воспринимать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Раскрытие всех патентов и научной литературы, цитируемых в данном документе, в полном объеме и явным образом включено посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агонистическое антитело к рецептору лимфотоксина-бета (LTBR),
которое связывается с LTBR человека и LTBR яванского макака, причем
5 указанное антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую
определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1),
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3,
10 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и
переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую
комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую
15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и
20 переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-
25 H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и
переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2,
30 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-
H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2,
содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 или SEQ ID

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:70, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

5 2. Агонистическое антитело к LTBR по п. 1, причем агонистическое антитело имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

(а) связывается с LTBR человека и LTBR яванского макака с менее чем 2-кратной разницей аффинности; или

10 (б) связывается с внеклеточным доменом LTBR человека с EC_{50} , составляющей менее 4 нМ, измеряемой посредством ELISA, и связывается с внеклеточным доменом LTBR яванского макака с EC_{50} , составляющей менее 5 нМ, измеряемой посредством ELISA; или

(в) требует перекрестного связывания для своей агонистической активности для активации LTBR человека; или

15 (г) требует перекрестного связывания для своей агонистической активности для индуцирования активации ICAM в эндотелиальных клетках пупочной вены человека или фибробластах, ассоциированных с раком; или

(д) ингибирует взаимодействие между LTBR человека и его человеческими лигандами: лимфотоксином $\alpha 1\beta 2$ и LIGHT.

20 3. Агонистическое антитело к LTBR по п. 1 или п. 2, причем агонистическое антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или

30 (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или

- (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или
- 5 (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98; или
- 10 (vi) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42; или
- 15 (vii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58; или
- 20 (viii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66;
- (ix) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:74.

25 4. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-3, причем агонистическое антитело дополнительно связывается с LTBR мыши.

30 5. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-4, причем агонистическое антитело связывается с внеклеточным доменом LTBR мыши с EC_{50} , составляющей менее 1 нМ, измеряемой посредством ELISA.

6. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-5, причем агонистическое антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:43, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80; или

(iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:92, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88.

7. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-6, причем агонистическое антитело содержит:

- 5 (i) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34; или
- 10 (ii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50; или
- 15 (iii) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82; или
- (iv) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; или
- 20 (v) переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98.

25 8. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-7, причем указанное антитело связывается с областью эпитопа SEQ ID NO:351 на LTBR человека.

30 9. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-8, причем указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую

определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

5

10. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-9, причем указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи (V_H LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и переменную область легкой цепи (V_L LTBR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

10

11. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-10, причем агонистическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело, в частности, биспецифическое антитело.

15

12. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-11, причем агонистическое антитело содержит Fc-домен человеческого происхождения, в частности, подкласса IgG человека, более конкретно, подкласса IgG1 человека.

20

13. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-12, причем агонистическое антитело содержит Fc-домен подкласса IgG1 человека, содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

25

14. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-13, причем агонистическое антитело содержит Fc-домен подкласса IgG1 человека с аминокислотными мутациями L234A, L235A и P329G (нумерация в соответствии с EU-индексом Kabat).

30

15. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-14, причем агонистическое антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое связывается с LTBR и опухолеассоциированным антигеном (ТАА), в частности, с белком активации фибробластов (FAP).

16. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-15, причем агонистическое антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

5 (а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с белком активации фибробластов (FAP);

(б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR; и

10 (в) Fc-домен подкласса IgG1 человека, содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

17. Агонистическое антитело к LTBR по п. 16, причем биспецифическое антитело активирует LTBR при связывании с FAP.

15

18. Агонистическое антитело к LTBR по п. 16 или п. 17, причем биспецифическое антитело содержит третий антигенсвязывающий домен, который связывается с LTBR человека.

20 19. Агонистическое антитело к LTBR по п. 18, в котором третий антигенсвязывающий домен, который связывается с LTBR человека, идентичен второму антигенсвязывающему домену, который связывается с LTBR.

25 20. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 16-19, в котором первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит:

30 (i) переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDR-H1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи (iv) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR-L2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8; или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20, и CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

21. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 16-20, в котором первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, или содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:25, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:26.

22. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 16-21, в котором первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи (V_L FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, или он содержит переменную область тяжелой цепи (V_H FAP), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25, и

вариабельную область легкой цепи ($V_L FAP$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26.

23. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-22, причем
5 указанное агонистическое антитело к LTBR представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FAP, содержащий вариабельную область тяжелой цепи ($V_H FAP$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и вариабельную область легкой цепи ($V_L FAP$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID
10 NO:10; и

(б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с LTBR, содержащий вариабельную область тяжелой цепи ($V_H LTBR$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и
15 вариабельную область легкой цепи ($V_L LTBR$), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

24. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-23, причем
20 указанное агонистическое антитело к LTBR представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(а) первый Fab-фрагмент, который связывается с FAP,

(б) второй Fab-фрагмент, который связывается с LTBR человека, и

(в) Fc-домен подкласса IgG1 человека, содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания
25 антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

25. Агонистическое антитело к LTBR по п. 24, в котором второй Fab-фрагмент, который специфично связывается с LTBR человека, представляет собой фрагмент crossFab.

30 26. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-23, причем указанное агонистическое антитело к LTBR представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

(а) первый Fab-фрагмент, который связывается с FAP,

(б) второй и третий Fab-фрагменты, которые связываются с LTBR человека, и

(в) Fc-домен подкласса IgG1 человека, содержащий одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность связывания антигенсвязывающей молекулы с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, при этом первый Fab-фрагмент, который связывается с FAP, слит на своем N-конце с C-концом одной из субъединиц Fc-домена, а каждый из второго и третьего Fab-фрагментов, которые специфично связываются с LTBR, слит на своем C-конце с N-концом одной из субъединиц Fc-домена.

10

27. Один или более выделенных полинуклеотидов, кодирующих агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-26.

15

28. Вектор экспрессии, содержащий один или более выделенных полинуклеотидов по п. 27.

20

29. Прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин, содержащая один или более выделенных полинуклеотидов по п. 27 или вектор экспрессии по п. 28.

25

30. Способ получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы, включающий шаги а) культивирования прокариотической или эукариотической клетки-хозяина по п. 29 в условиях, подходящих для экспрессии агонистического антитела к LTBR, и б) необязательного выделения агонистического антитела к LTBR.

30

31. Фармацевтическая композиция, содержащая агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-26 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

32. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-26 для применения в качестве лекарственного препарата.

33. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-26 для применения в (а) индуцировании активации ICAM на эндотелиальных клетках или фибробластах, ассоциированных с раком, или (б) усилении адгезии Т-клеток.

5

34. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-26 для применения в лечении рака.

10

35. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-26 для применения в лечении рака, причем агонистическое антитело к LTBR или фармацевтическая композиция предназначены для введения в комбинации с химиотерапевтическим средством, лучевой терапией и/или другими средствами для применения в иммунотерапии рака.

15

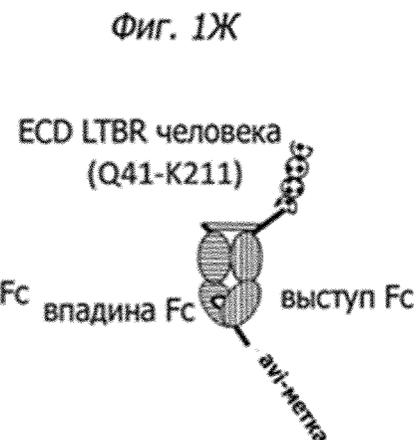
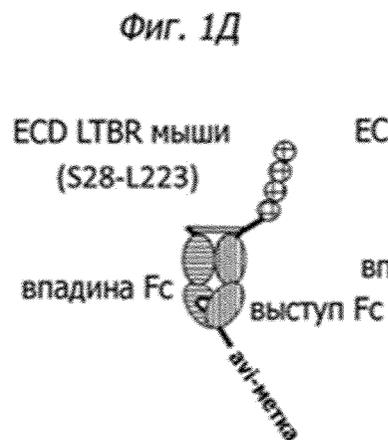
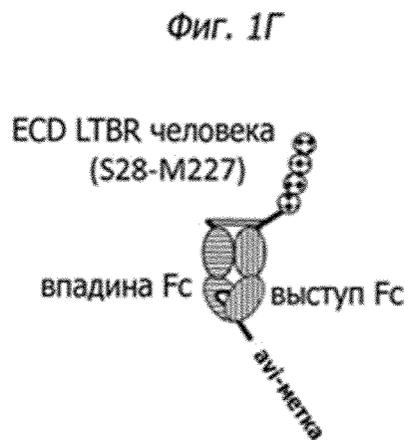
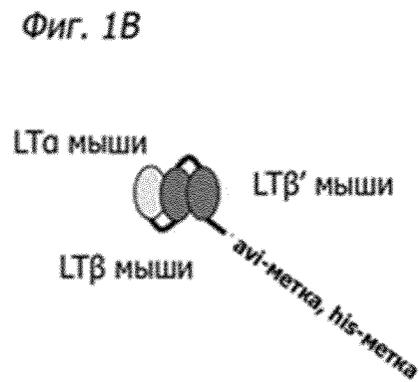
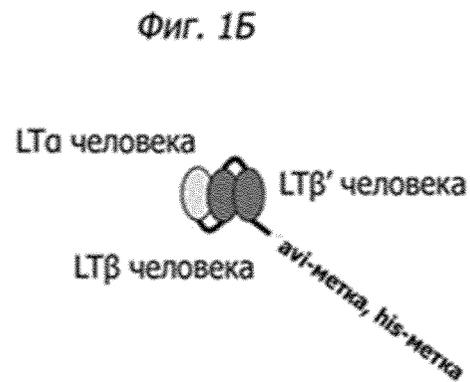
36. Агонистическое антитело к LTBR по любому из пп. 1-26 для применения в лечении рака, причем агонистическое антитело к LTBR предназначено для введения в комбинации со средством, блокирующим взаимодействие PD-L1/PD-1.

20

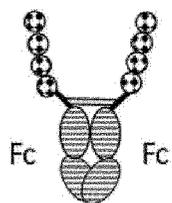
37. Применение агонистического антитела к LTBR по любому из пп. 1-26 или фармацевтической композиции по п. 30 в производстве лекарственного препарата для лечения рака.

25

38. Способ лечения индивидуума, у которого имеется рак, включающий введение индивидууму эффективного количества агонистического антитела к LTBR по любому из пп. 1-26 или фармацевтической композиции по п. 31.



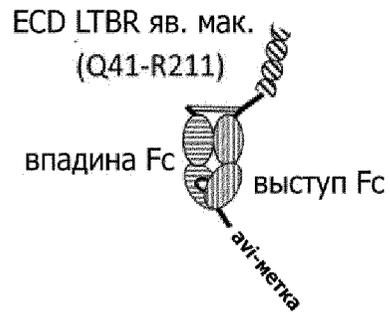
Фиг. 2А
ECD LTBR человека
(S28-M227)



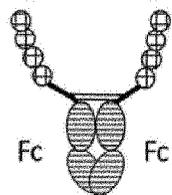
Фиг. 2Б
ECD LTBR человека
(S28-M227)
впадина Fc выступ Fc
avi-метка, his-метка



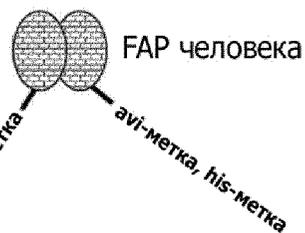
Фиг. 2В
ECD LTBR яв. мак.
(Q41-R211)
впадина Fc выступ Fc
avi-метка



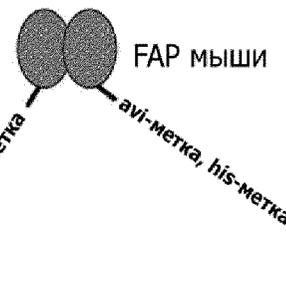
Фиг. 2Г
ECD LTBR мыши
(S28-P218)



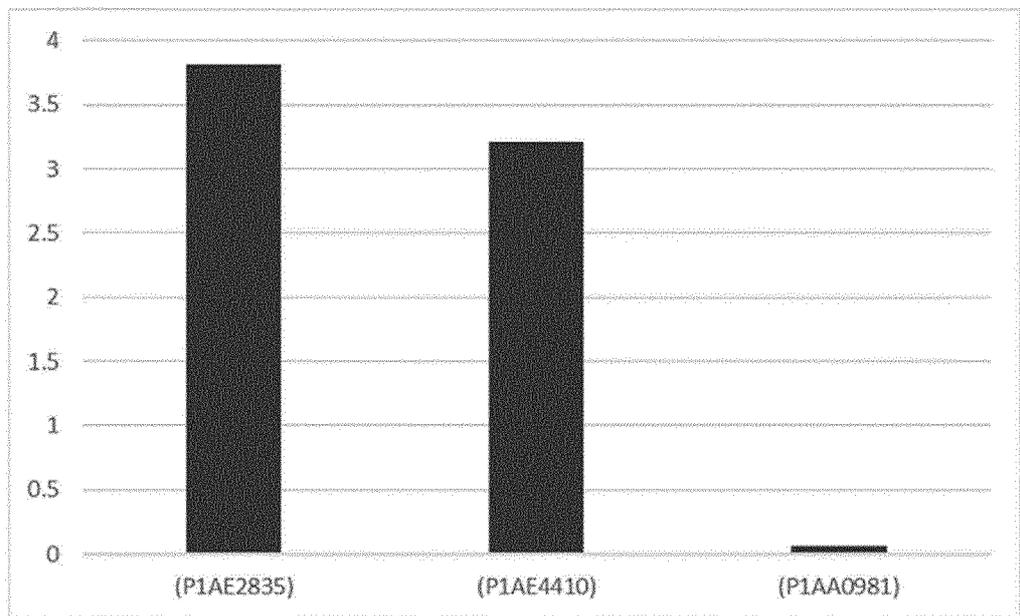
Фиг. 2Д
FAP человека
avi-метка, his-метка avi-метка, his-метка



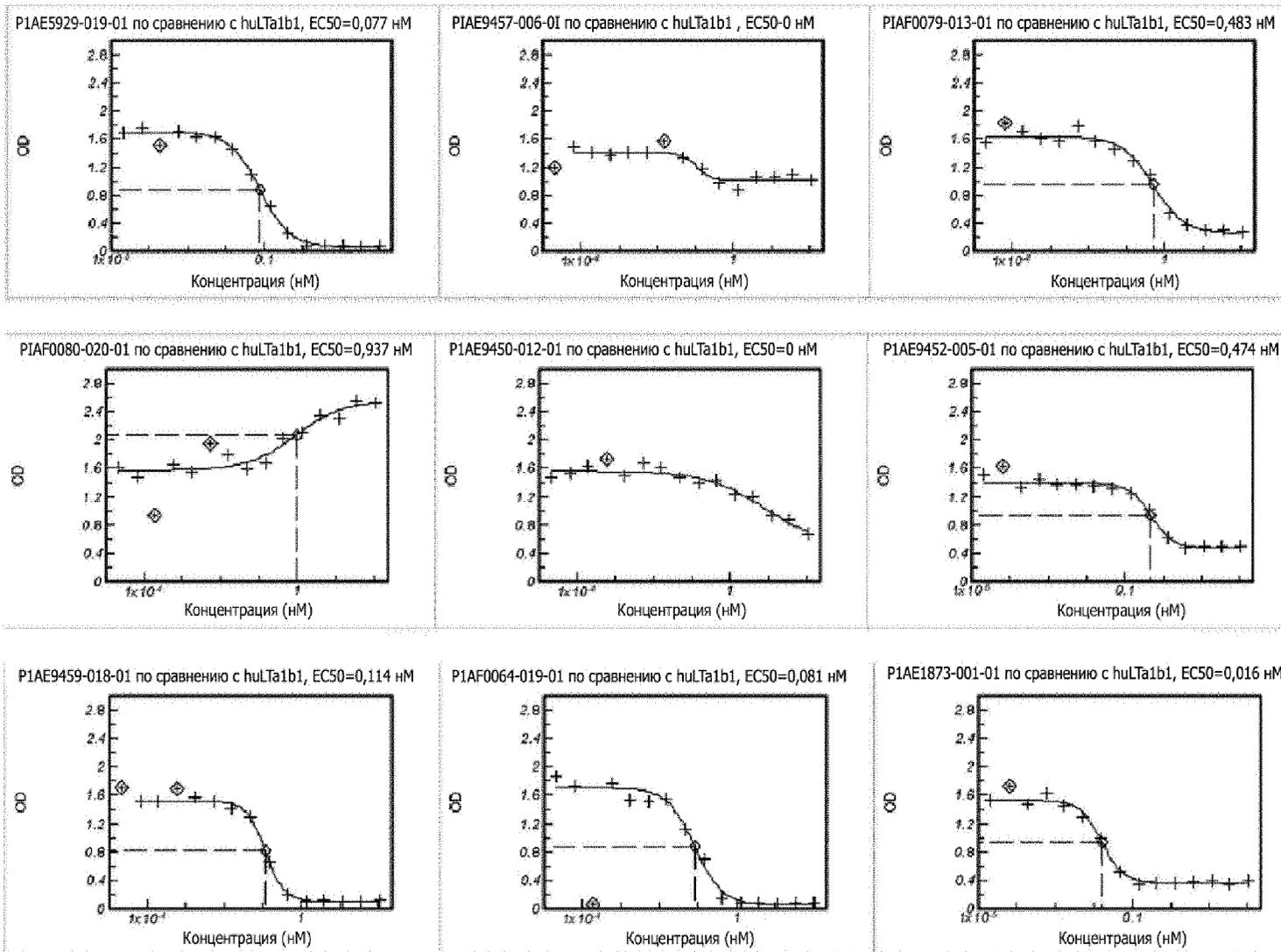
Фиг. 2Е
FAP мыши
avi-метка, his-метка avi-метка, his-метка



Фиг. 3

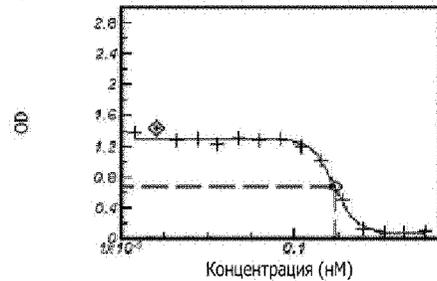


Фиг. 4

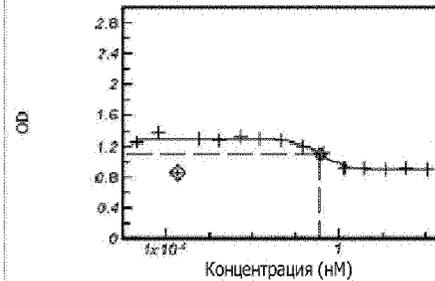


Фиг. 5

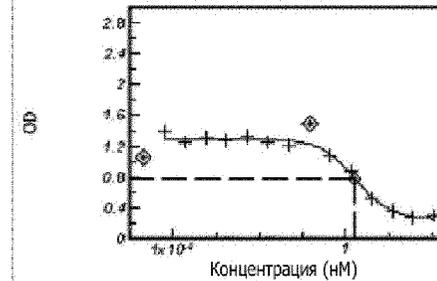
P1AE5929-019-01 по сравнению с huLIGHT, EC50=0,841 нМ



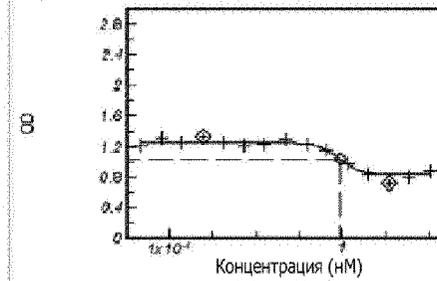
P1AE9457-006-01 по сравнению с huLIGHT, EC50=0,367 нМ



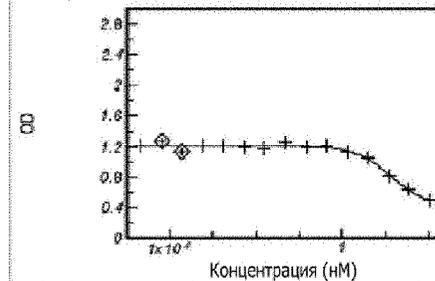
P1AF0079-013-01 по сравнению с huLIGHT, EC50=1,606 нМ



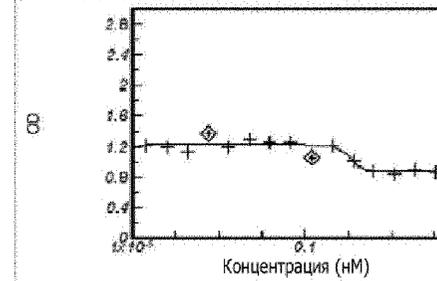
P1AF0080-020-01 по сравнению с huLIGHT, EC50=0,886 нМ



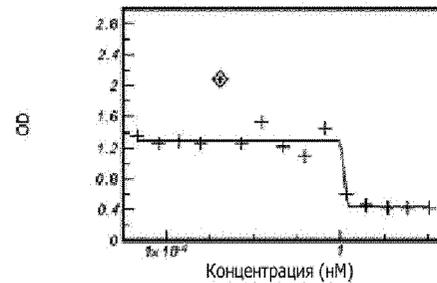
P1AE9450-012-01 по сравнению с huLIGHT, EC50=0 нМ



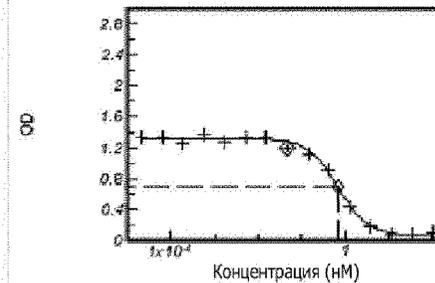
P1AE9452-005-01 по сравнению с huLIGHT, EC50=0 нМ



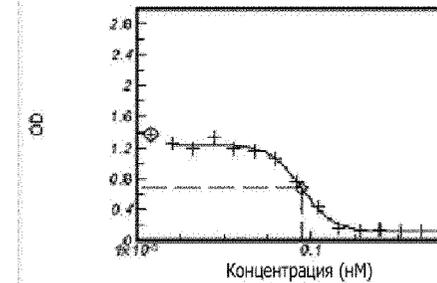
P1AE9459-018-01 по сравнению с huLIGHT, EC50=0 нМ



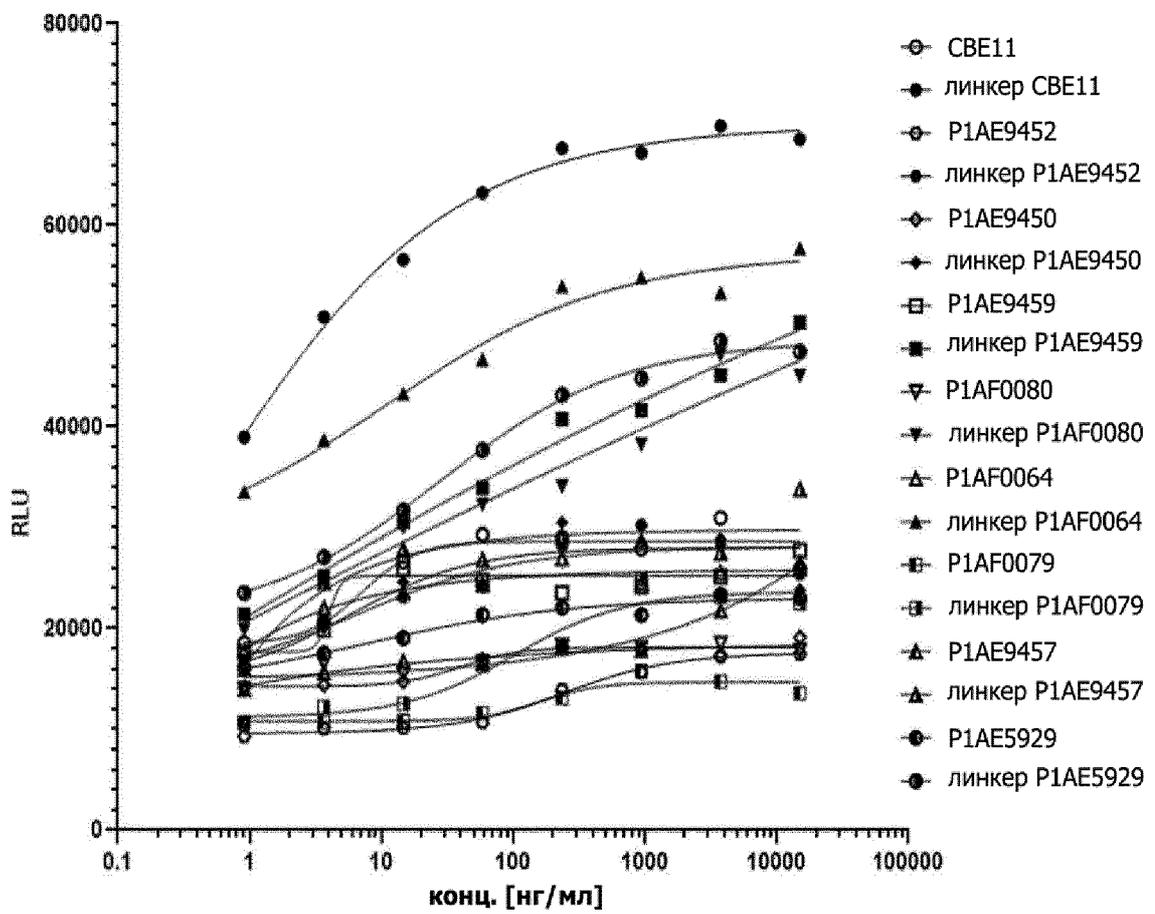
P1AF0064-019-01 по сравнению с huLIGHT, EC50=0,671 нМ



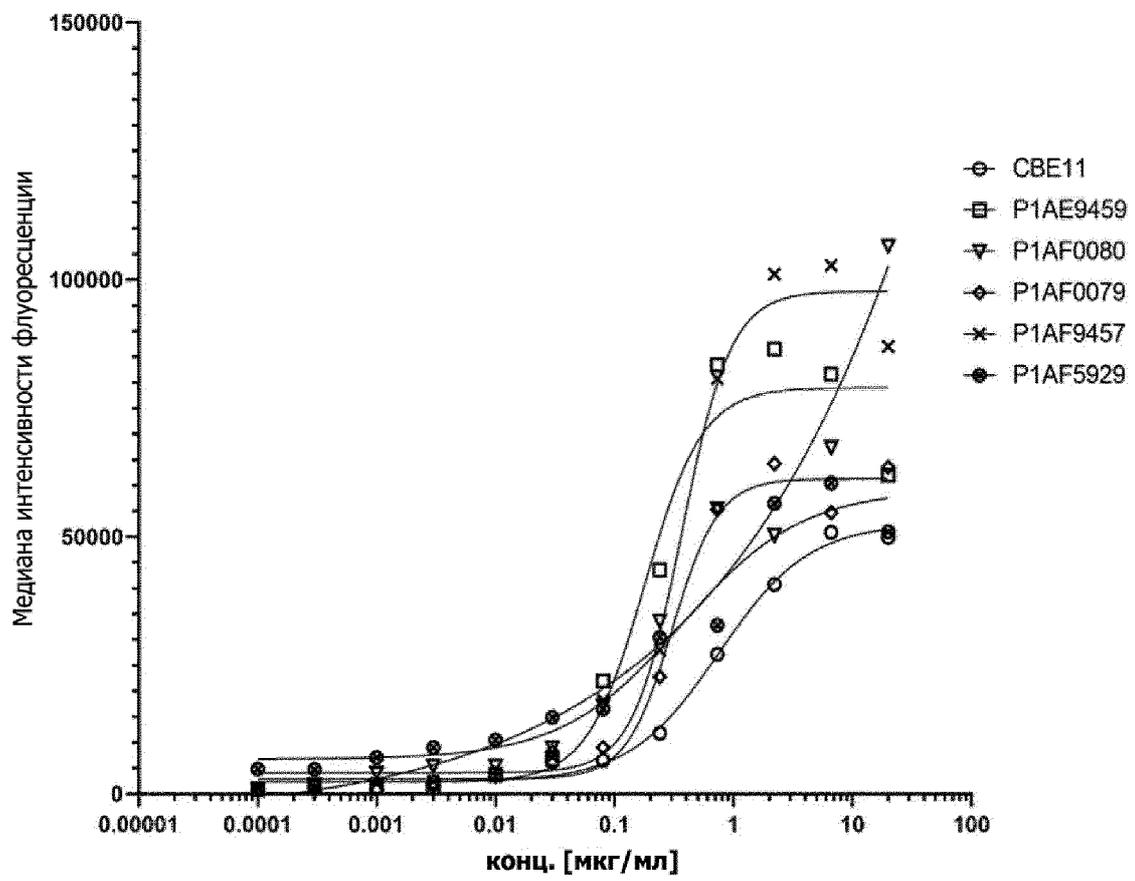
P1AE1873-001-01 по сравнению с huLIGHT, EC50=0,06 нМ



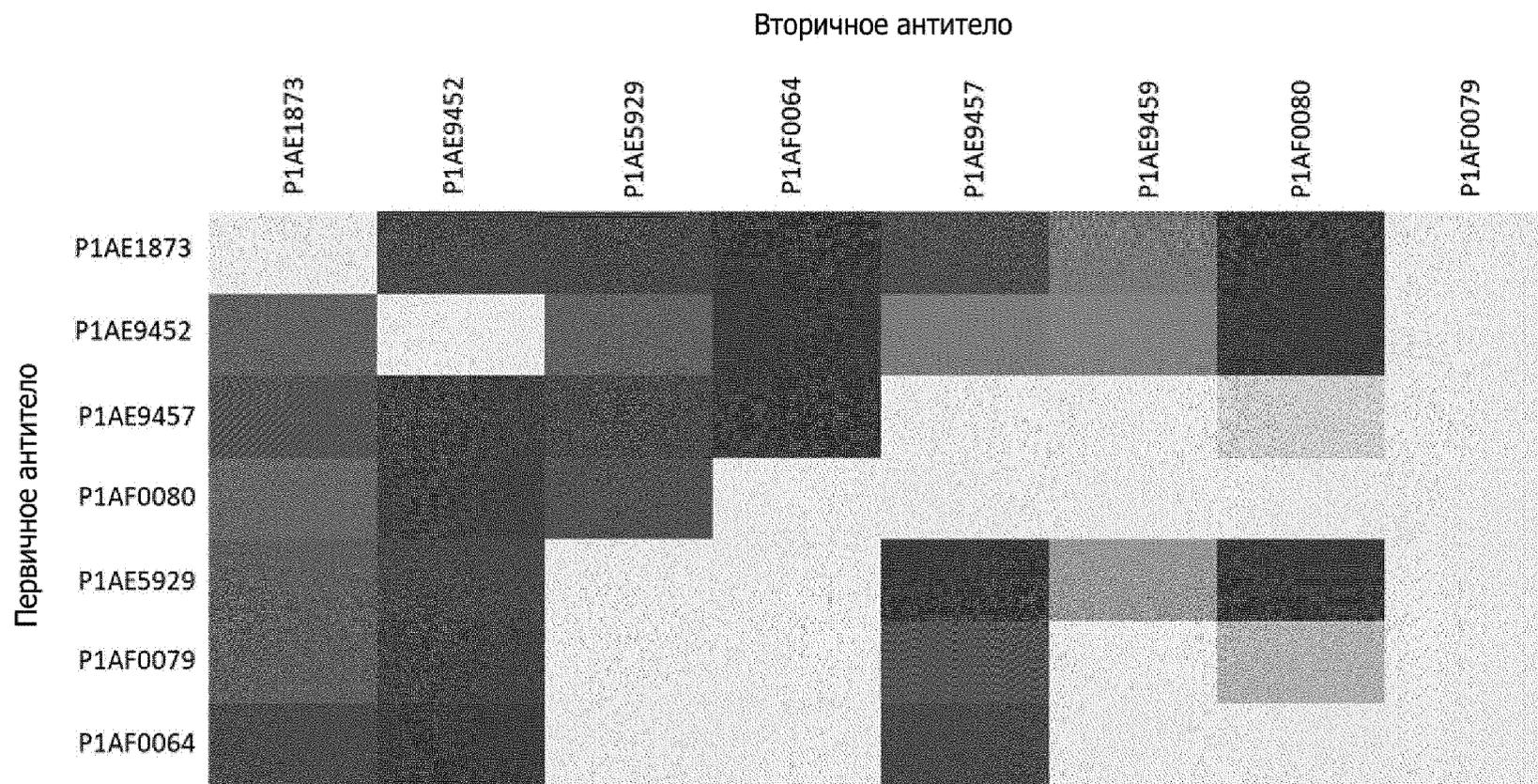
Фиг. 6



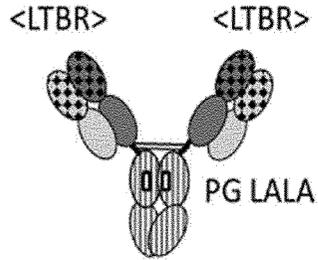
Фиг. 7



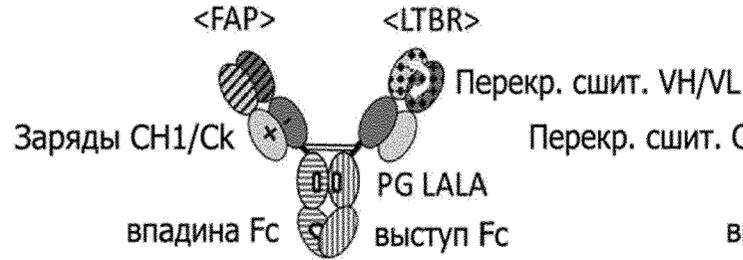
Фиг. 8



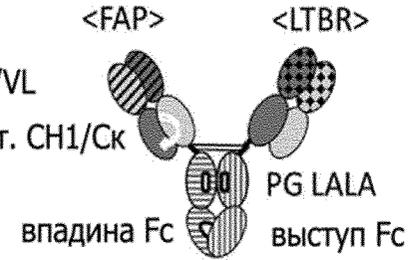
Фиг. 9А



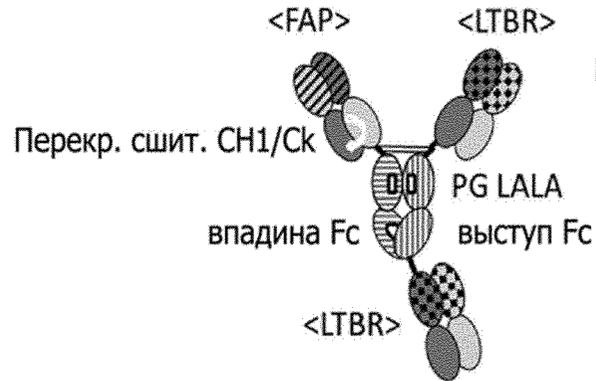
Фиг. 9Б



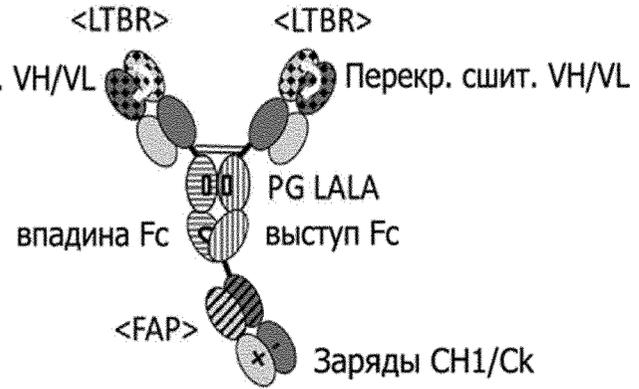
Фиг. 9В



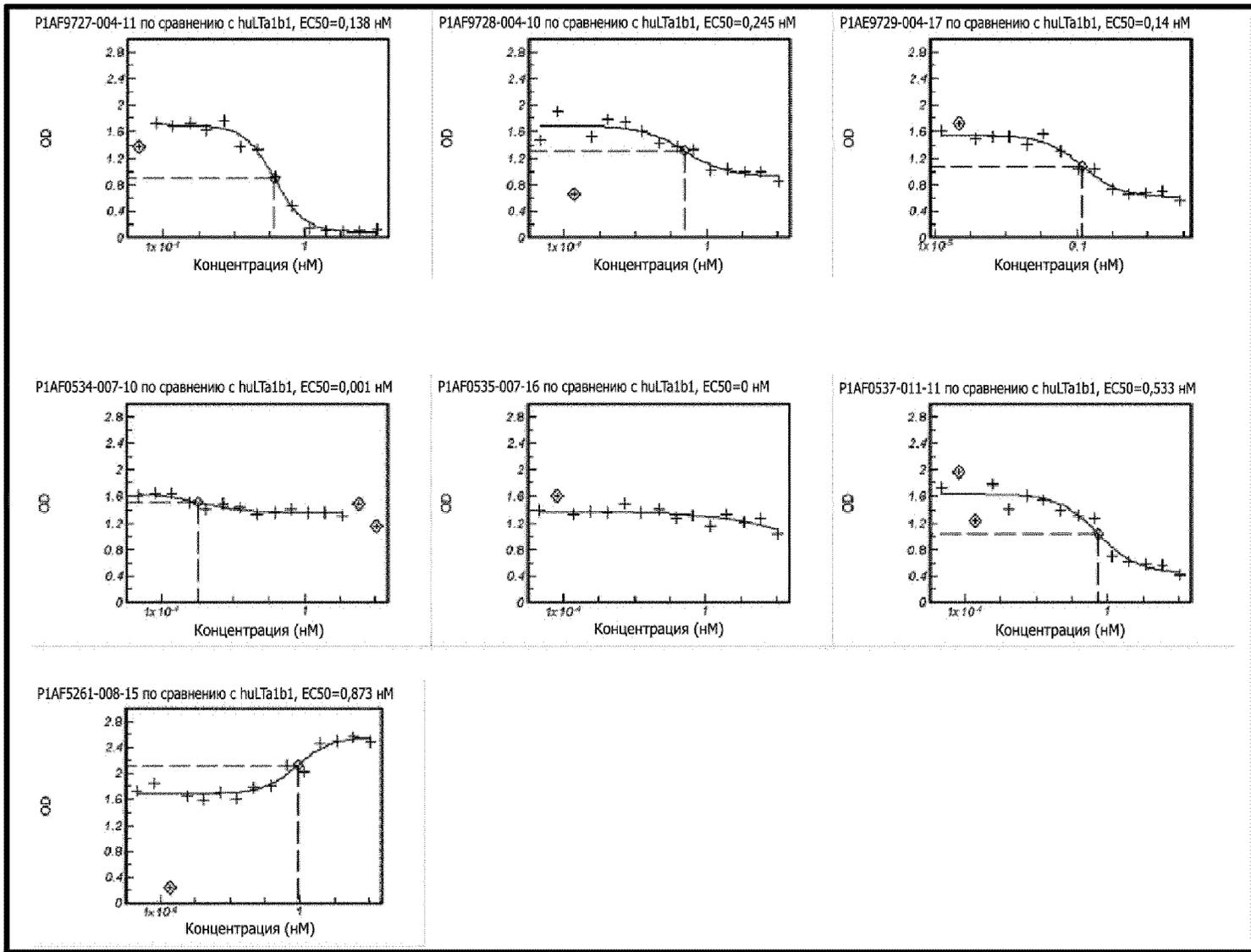
Фиг. 9Г



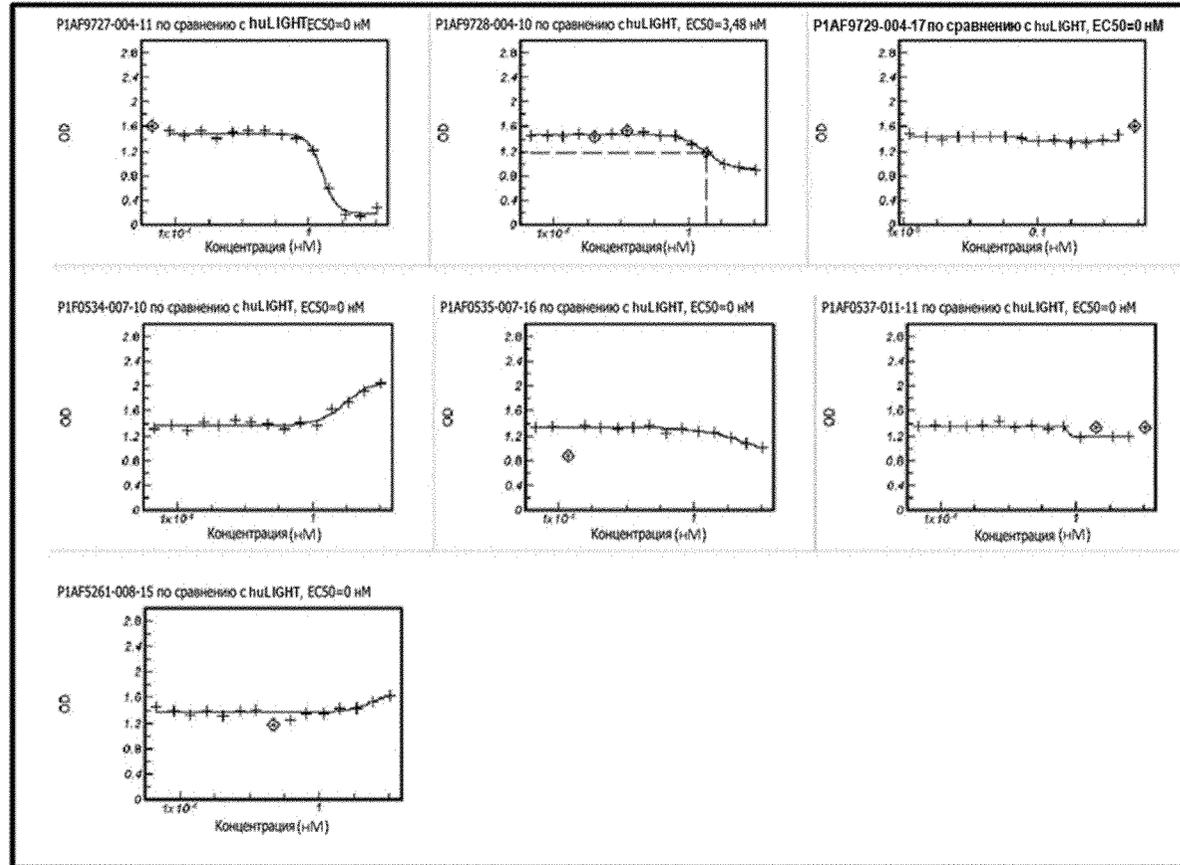
Фиг. 9Д



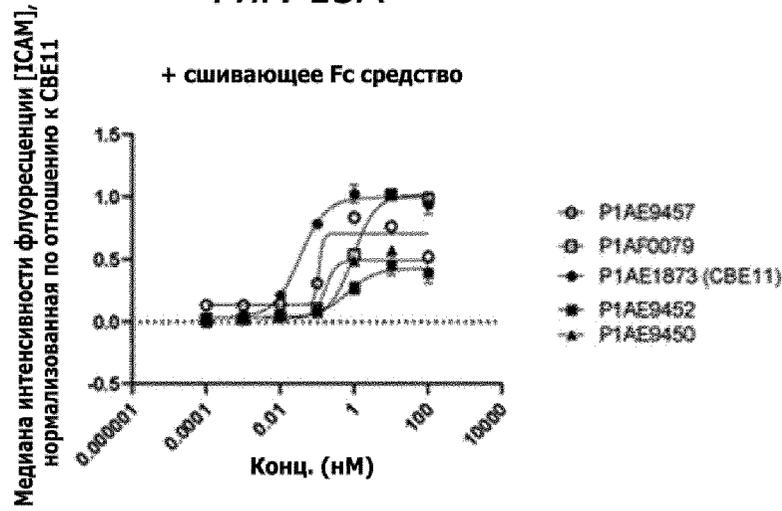
Фиг. 10



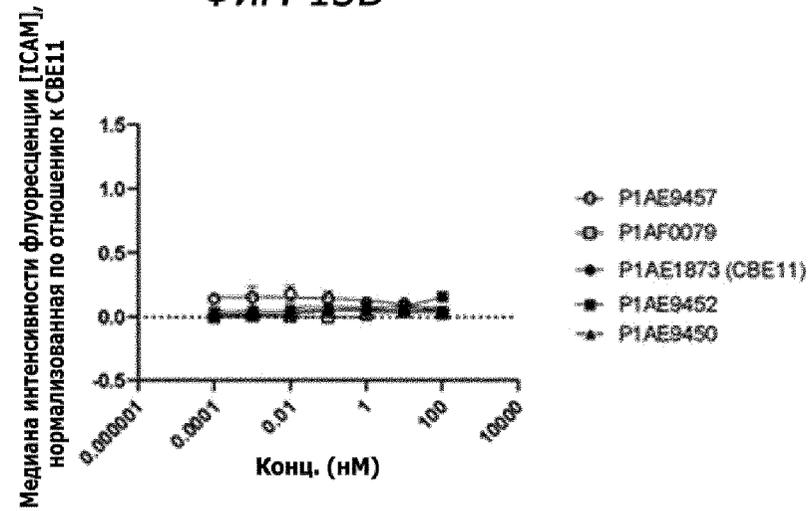
Фиг. 11



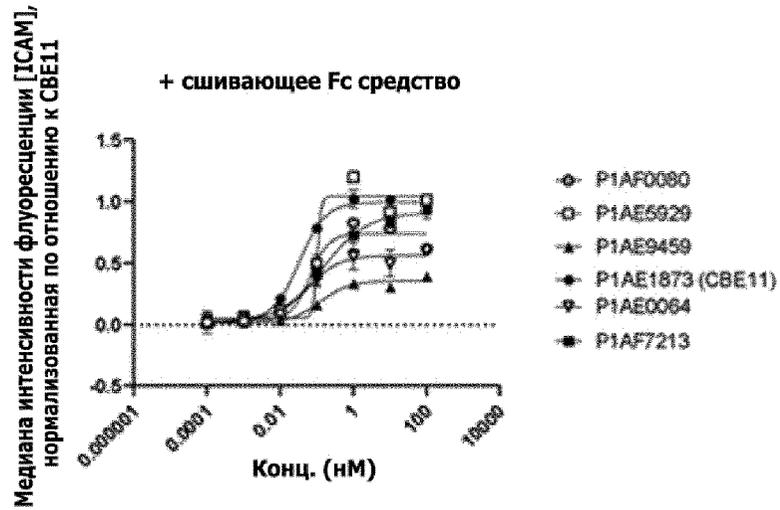
Фиг. 13А



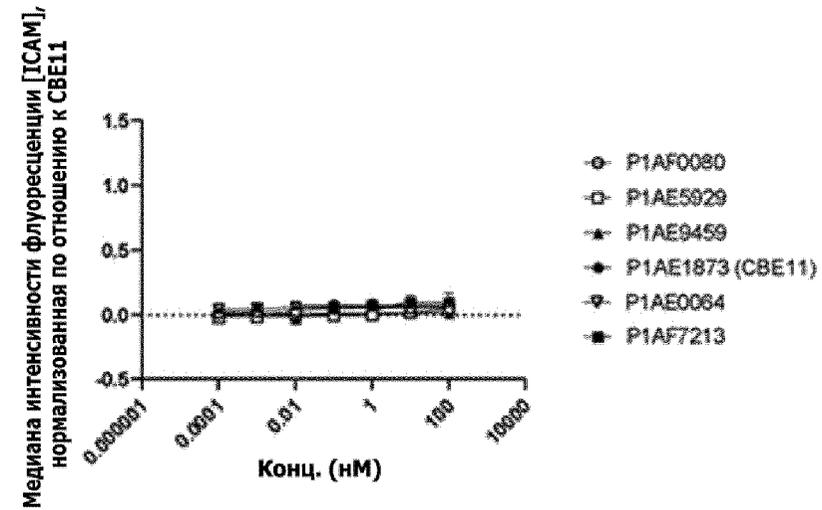
Фиг. 13Б

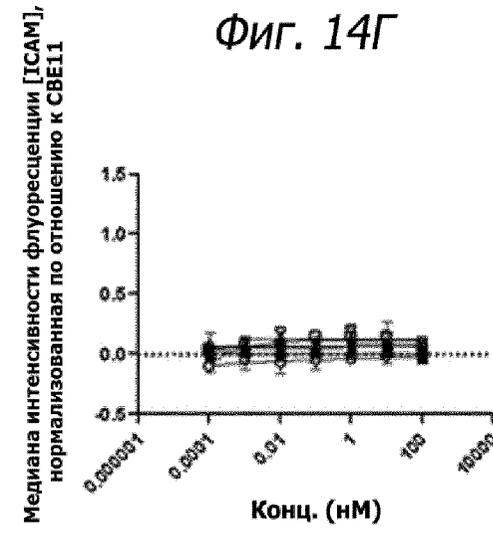
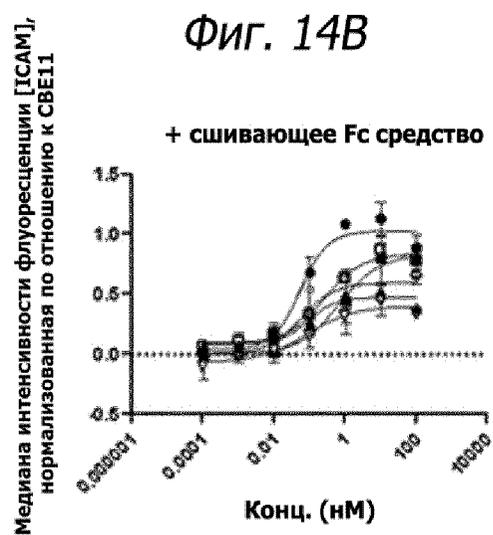
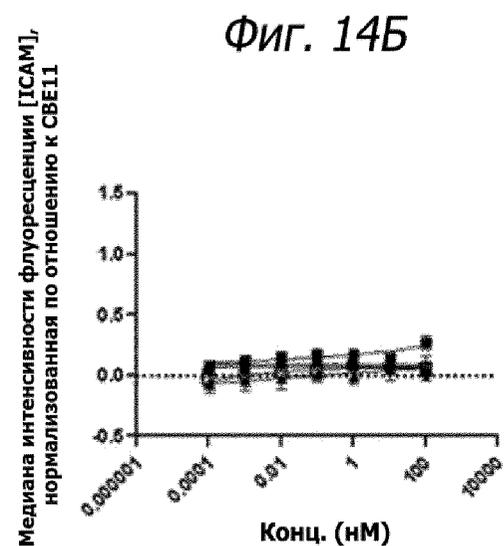
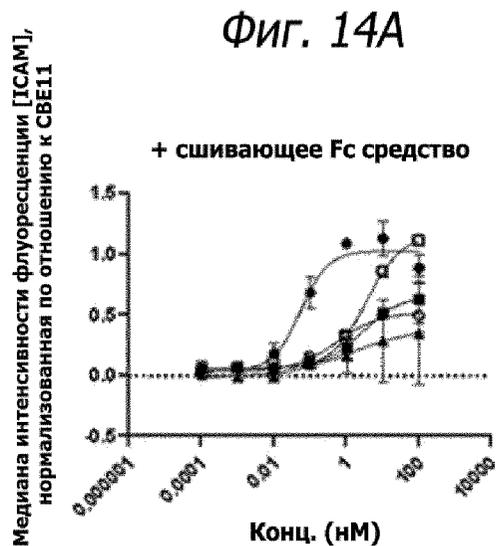


Фиг. 13В

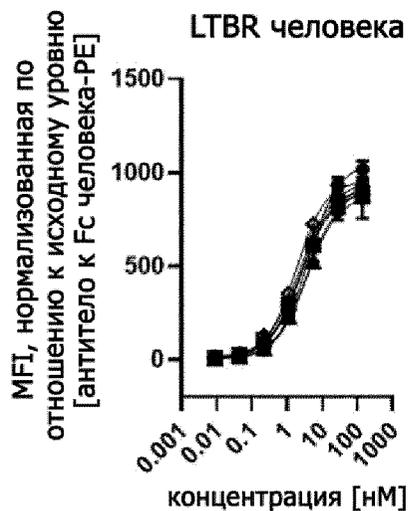


Фиг. 13Г



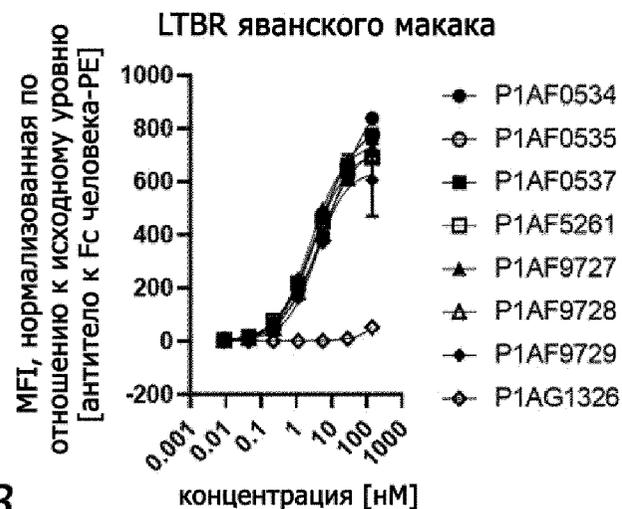


Фиг. 15А



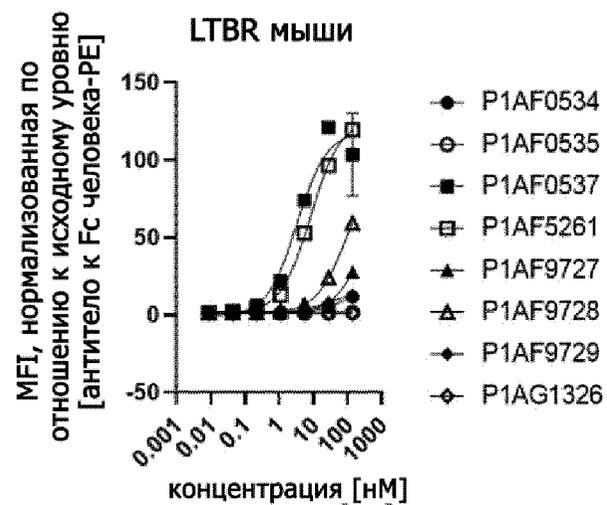
- P1AF0534
- P1AF0535
- P1AF0537
- P1AF5261
- ▲ P1AF9727
- △ P1AF9728
- ◆ P1AF9729
- ◇ P1AG1326

Фиг. 15Б



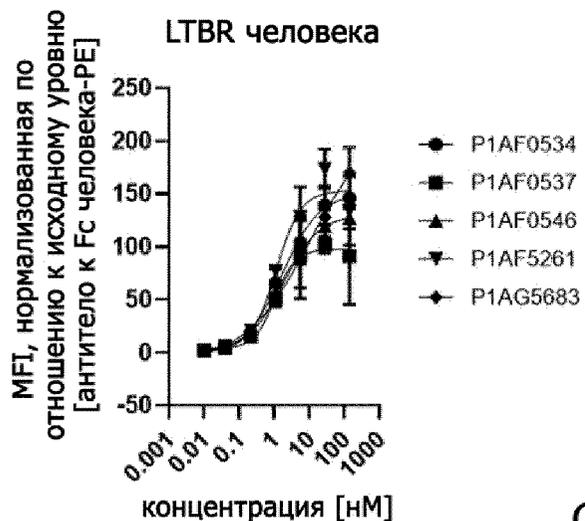
- P1AF0534
- P1AF0535
- P1AF0537
- P1AF5261
- ▲ P1AF9727
- △ P1AF9728
- ◆ P1AF9729
- ◇ P1AG1326

Фиг. 15В

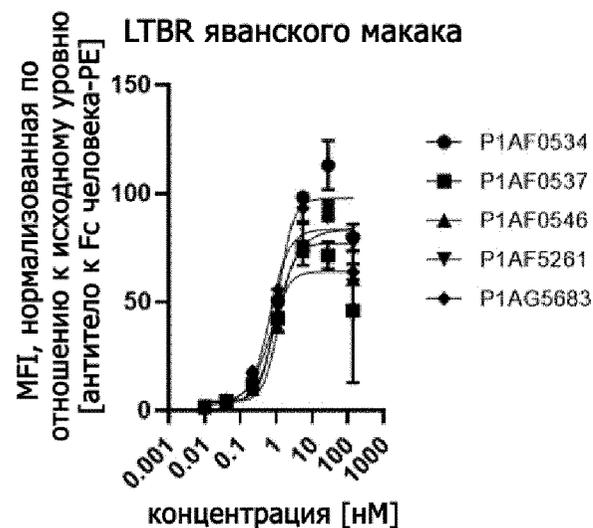


- P1AF0534
- P1AF0535
- P1AF0537
- P1AF5261
- ▲ P1AF9727
- △ P1AF9728
- ◆ P1AF9729
- ◇ P1AG1326

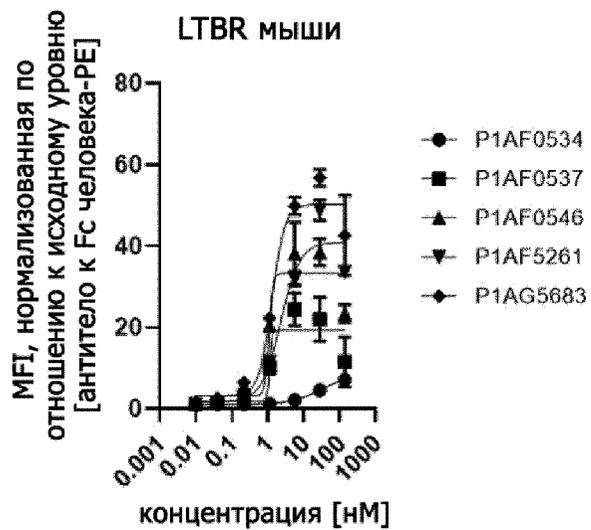
Фиг. 15Г



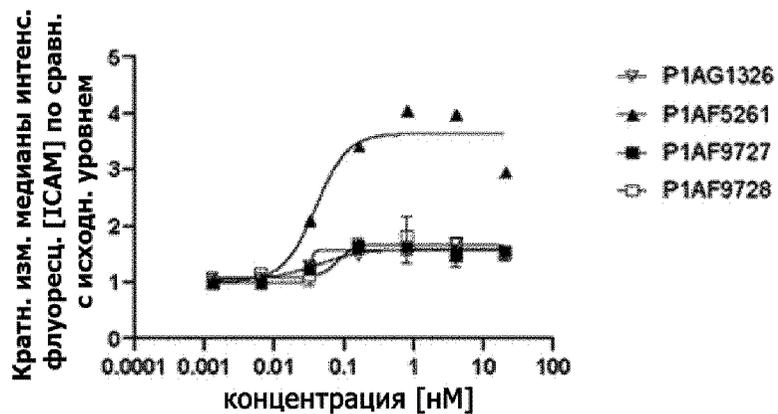
Фиг. 15Д



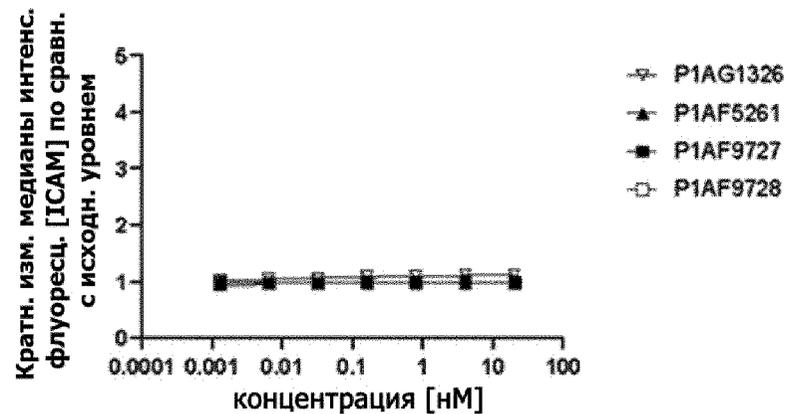
Фиг. 15Е



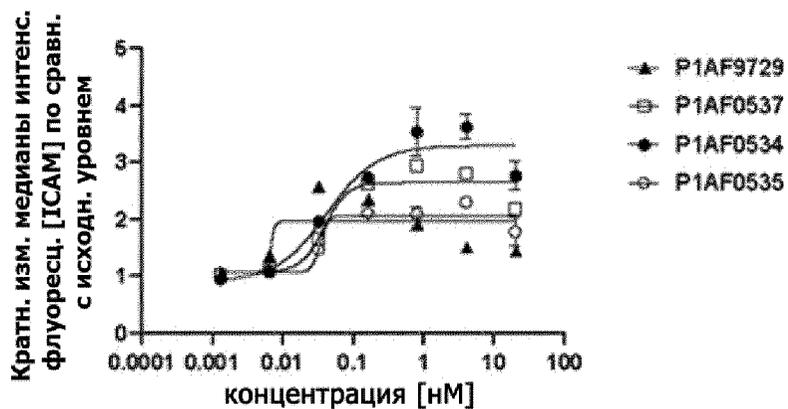
Фиг. 16А



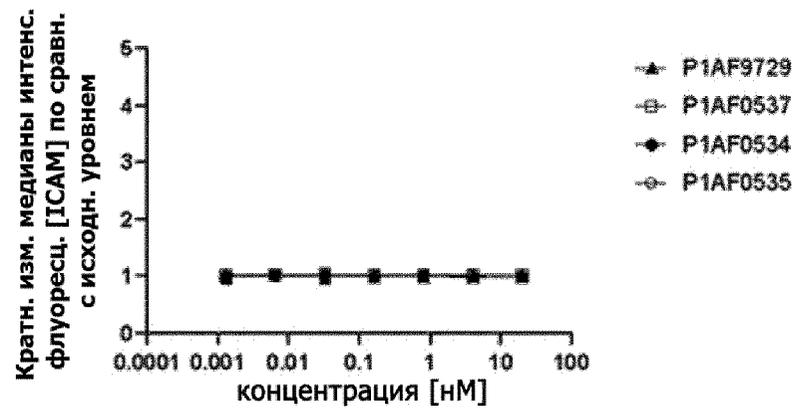
Фиг. 16Б



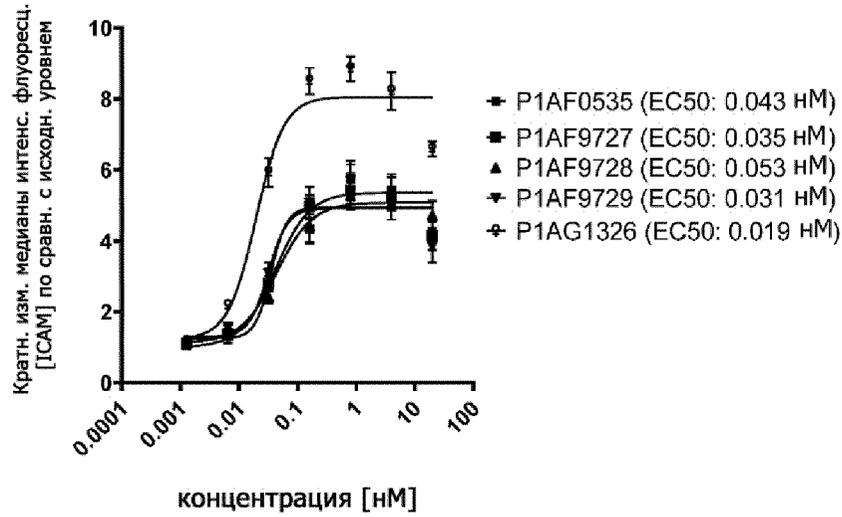
Фиг. 16В



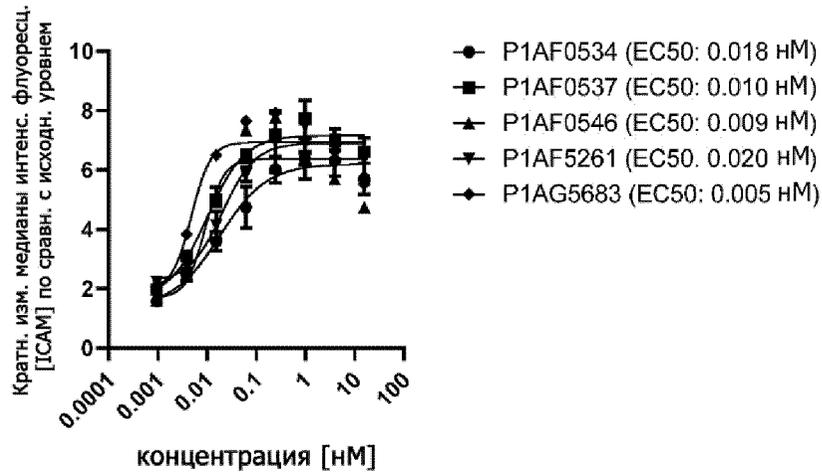
Фиг. 16Г



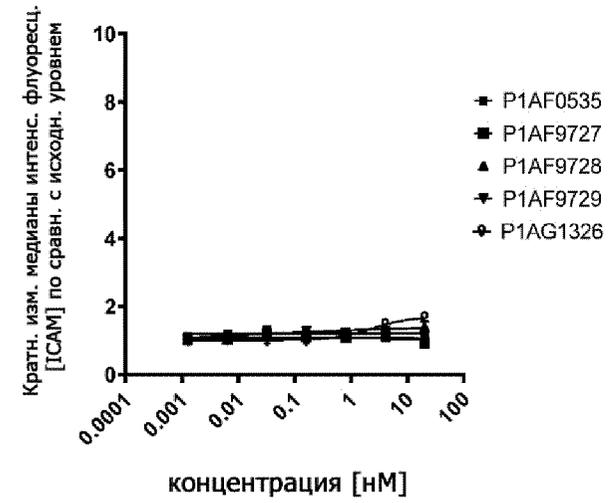
Фиг. 17А



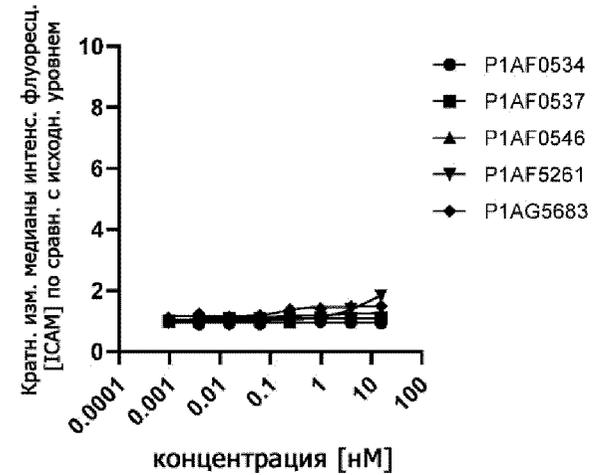
Фиг. 17В



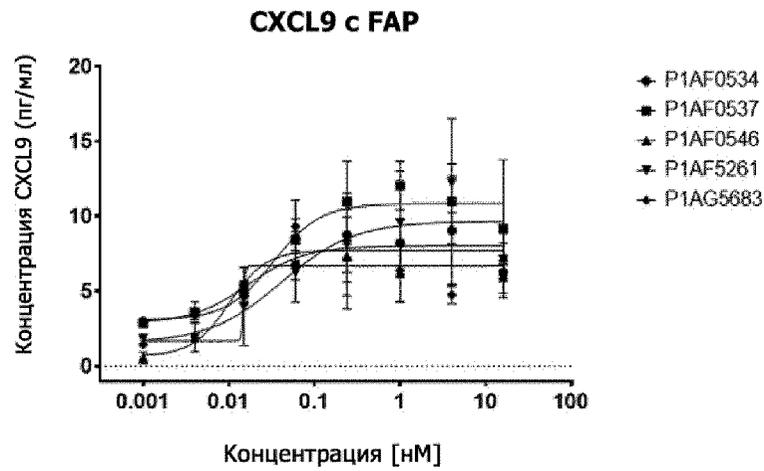
Фиг. 17Б



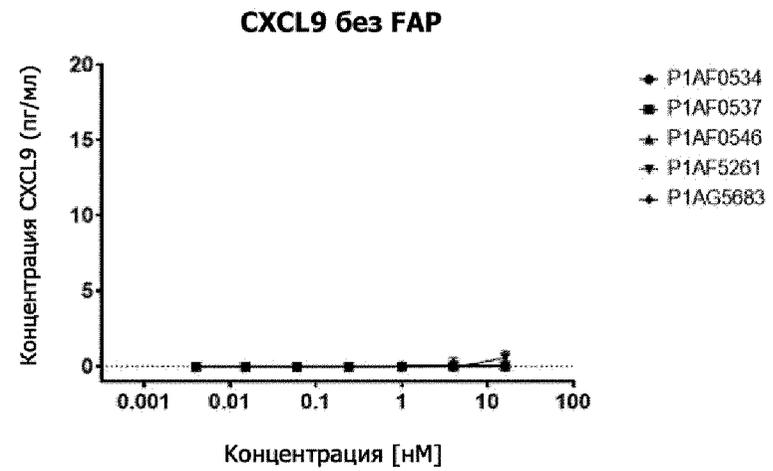
Фиг. 17Г



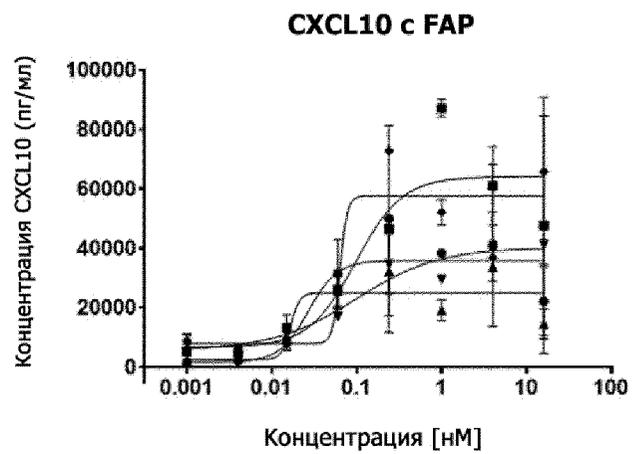
Фиг. 18А



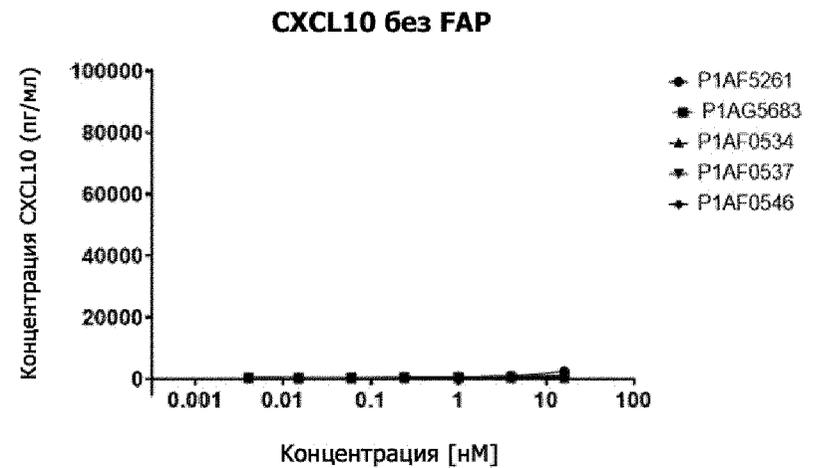
Фиг. 18Б



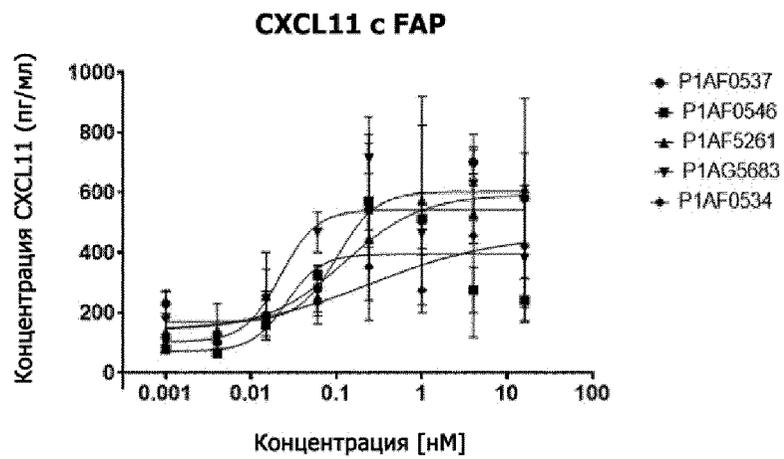
Фиг. 18В



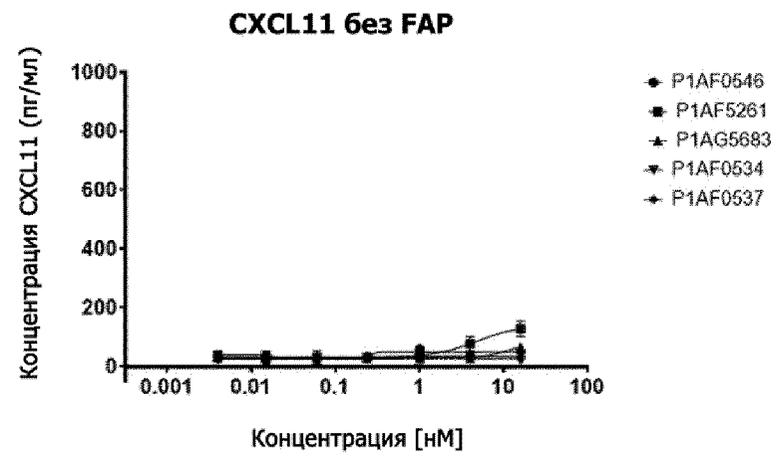
Фиг. 18Г



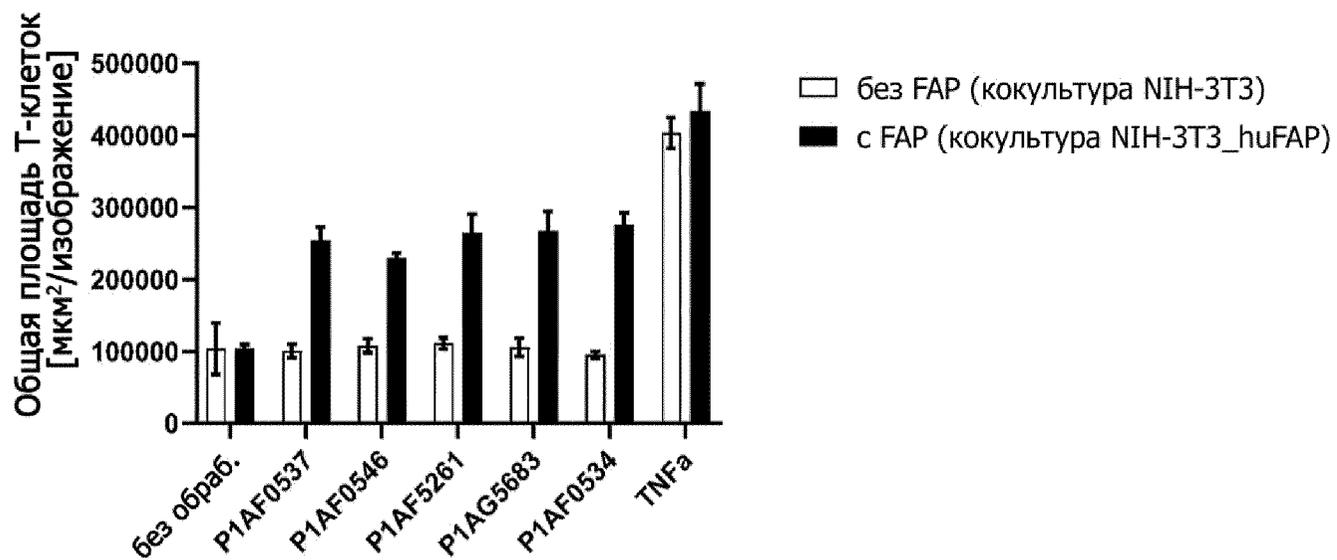
Фиг. 18Д



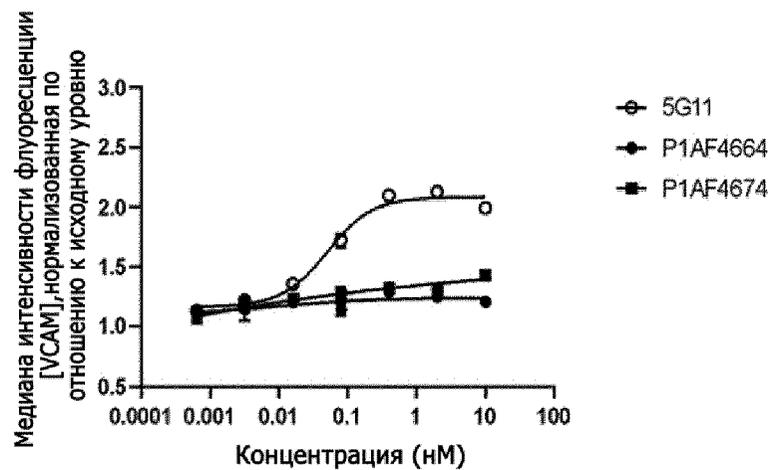
Фиг. 18Е



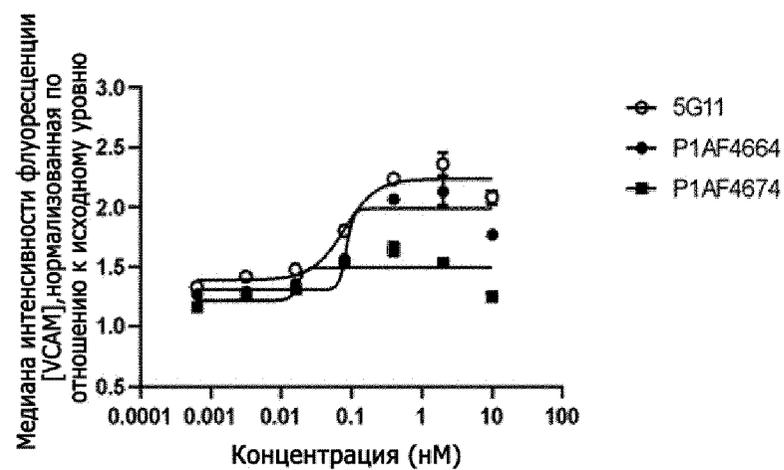
Фиг. 19



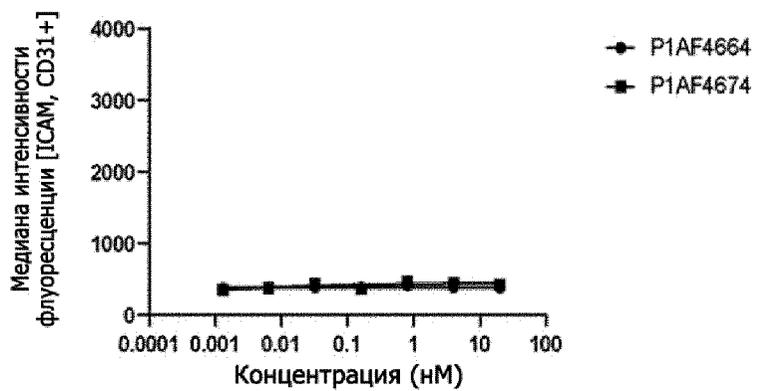
Фиг. 20А



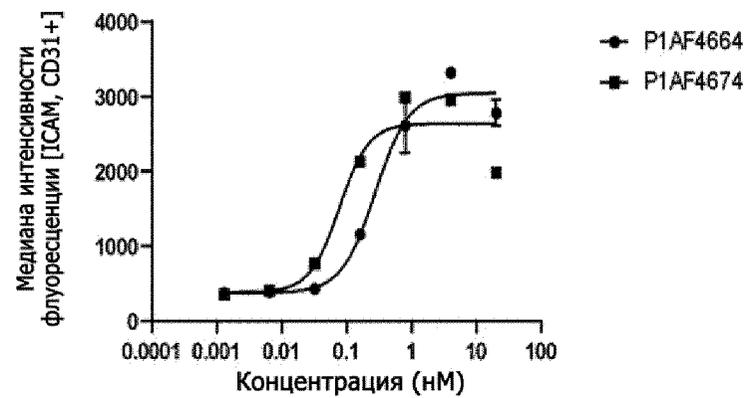
Фиг. 20Б



Фиг. 21А



Фиг. 21Б

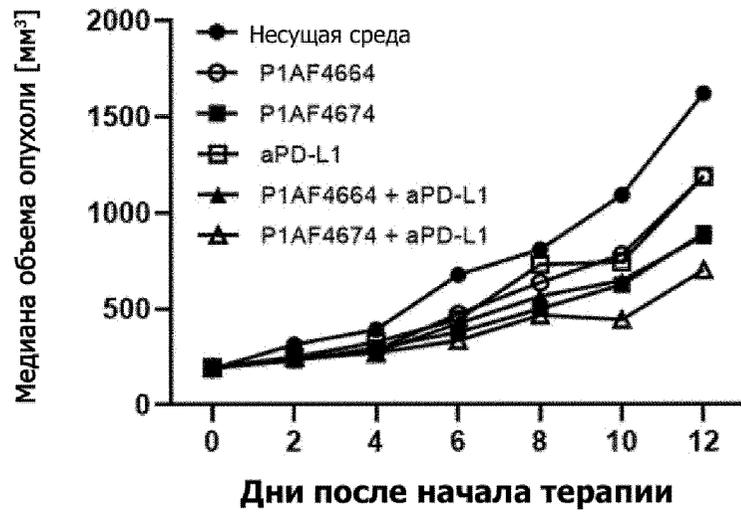


Фиг. 22

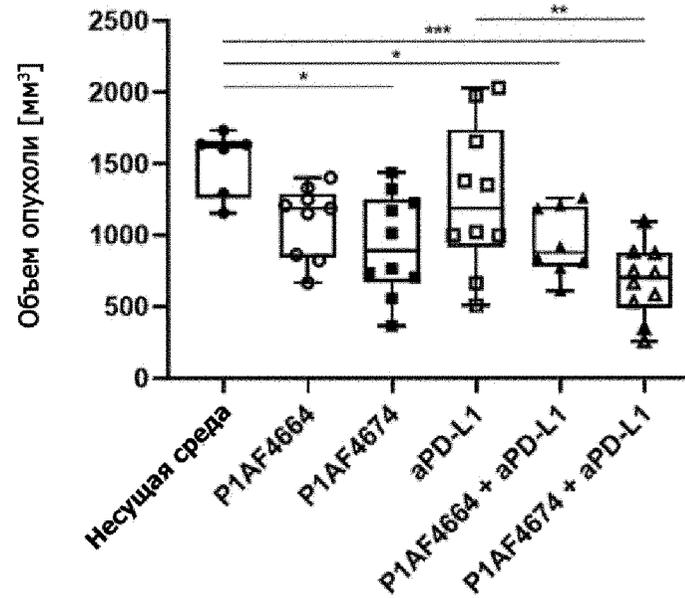


Группа	Кол-во животн.	Соединение	Доза (мг/кг)	Средство терапии	Количество средств терапии
А	15	Несущая среда	--	i.v.	7 (3 раза в неделю)
Б	15	P1AF4664	5	i.v.	7 (3 раза в неделю)
В	15	P1AF4674	5	i.v.	7 (3 раза в неделю)
Г	15	aPD-L1	10/5	i.p./i.v.	1 (только первое)/5 (2 раза в неделю)
Д	15	aPD-L1 + P1AF4664	10/5, 5	i.p./i.v., i.v.	1 (только первое)/5 (2 раза в неделю), 8 (3 раза в неделю)
Е	15	aPD-L1 + P1AF4674	10/5, 5	i.p./i.v., i.v.	1 (только первое)/5 (2 раза в неделю), 8 (3 раза в неделю)

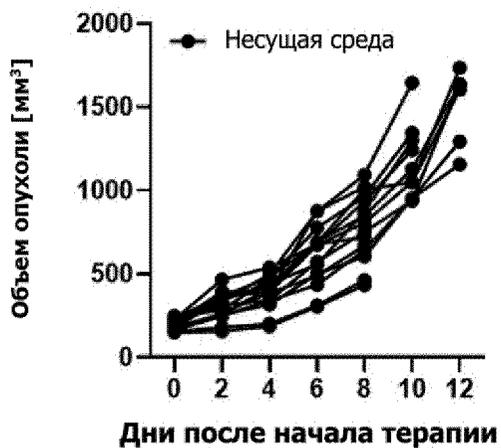
Фиг. 23А



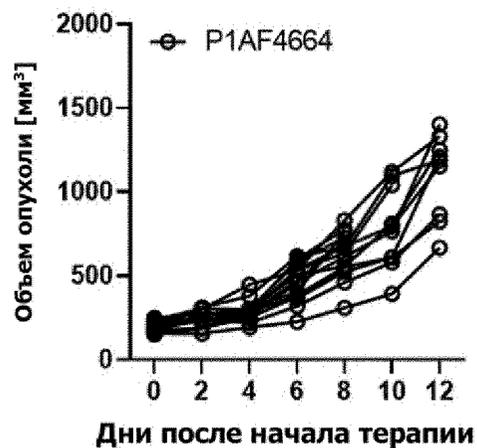
Фиг. 23Б



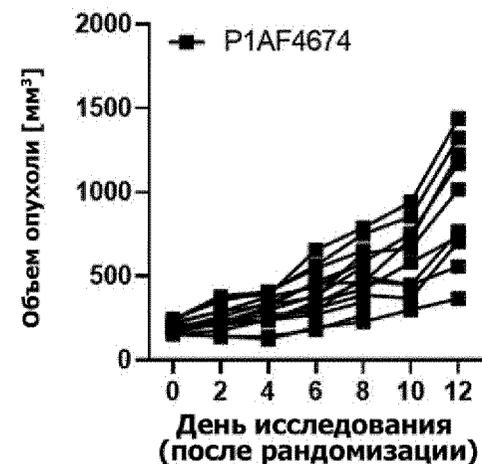
Фиг. 23В



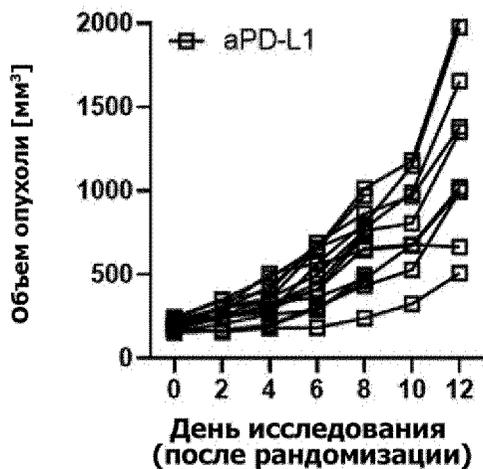
Фиг. 23Г



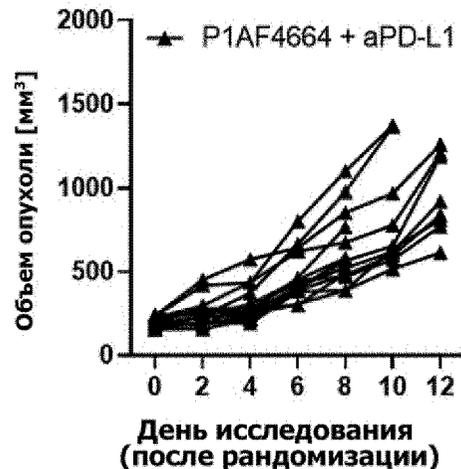
Фиг. 23Д



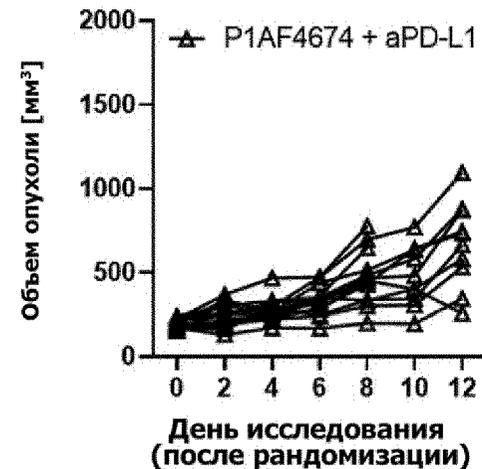
Фиг. 23Е



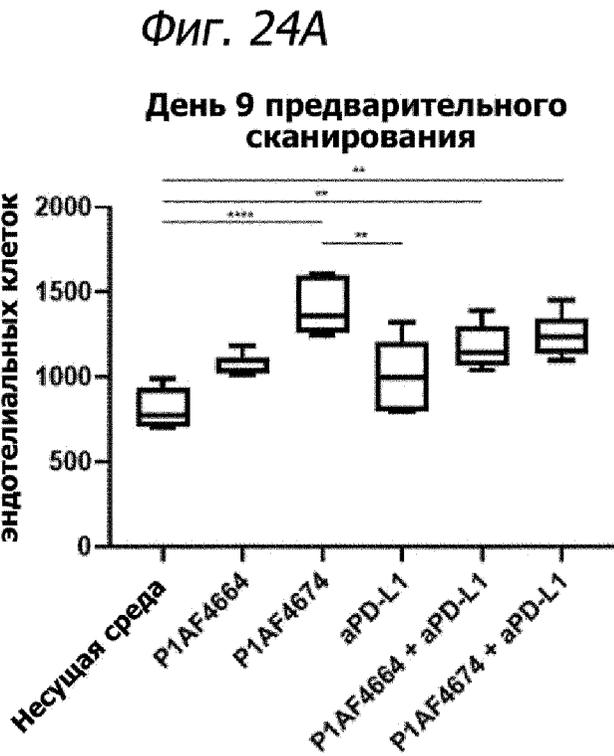
Фиг. 23Ж



Фиг. 23И



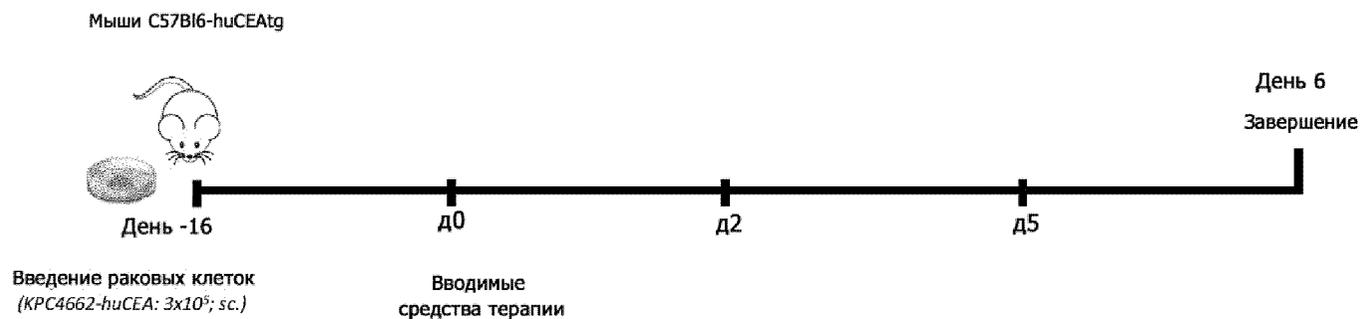
Медиана интенсивности флуоресценции [ICAM], гейтированная в отношении эндотелиальных клеток



Медиана интенсивности флуоресценции [ICAM], гейтированная в отношении эндотелиальных клеток

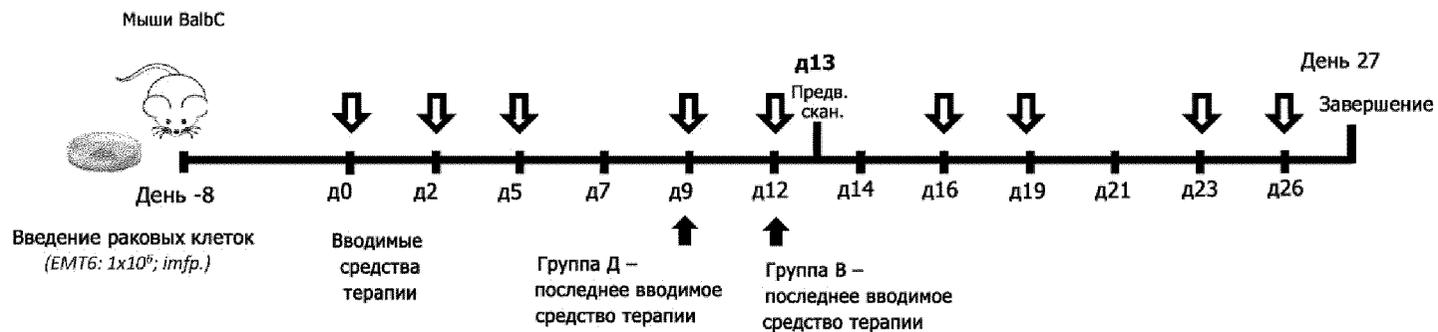


Фиг. 25



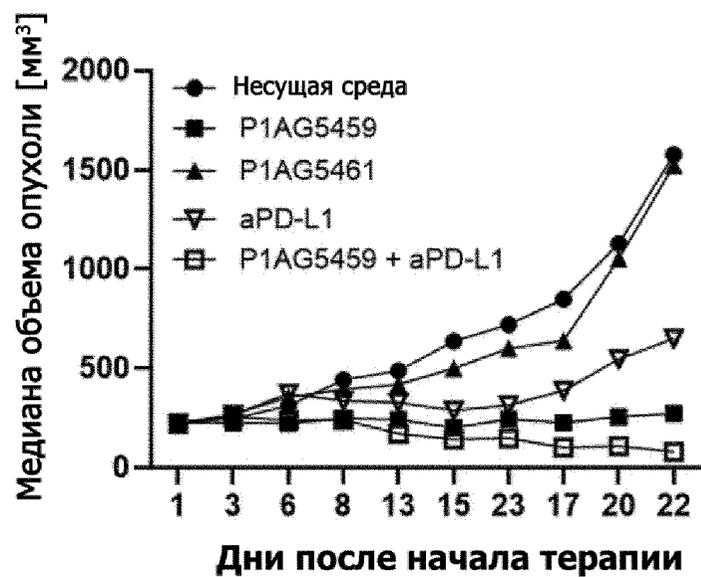
Группа	Кол-во животных	Соединение	Доза (мг/кг)	Средство терапии	Количество средств терапии
А	15	Несущая среда	--	i.v.	3 (3 раза в неделю)
Б	15	P1AF4664	10	i.v.	3 (3 раза в неделю)
В	15	P1AF4674	10	i.v.	3 (3 раза в неделю)

Фиг. 27

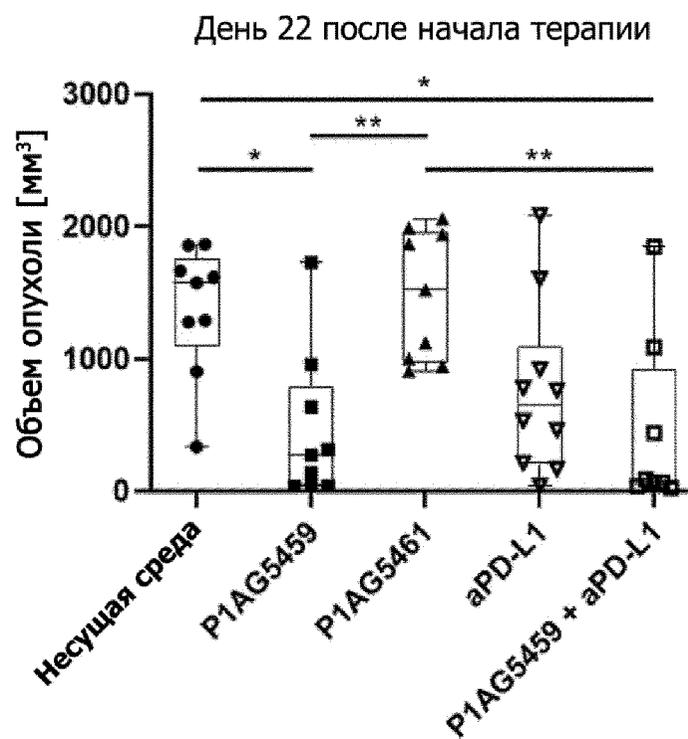


Группа	Кол-во животн.	Соединение	Доза (мг/кг)	Средство терапии	Количество средств терапии
А	15	Несущая среда	–	i.v.	12 (3 раза в неделю)
Б	15	P1AG5459	3	i.v.	12 (3 раза в неделю)
В	15	P1AG5461	3	i.v.	6 (3 раза в неделю)
Г	15	↓ aPD-L1	10/5	i.p./i.v.	1 (только первое)/8 (2 раза в неделю)
Д	15	↓ aPD-L1 + P1AG5459	10/5, 3	i.p./i.v., i.v.	1 (только первое)/3 (2 раза в неделю), 5 (3 раза в неделю)

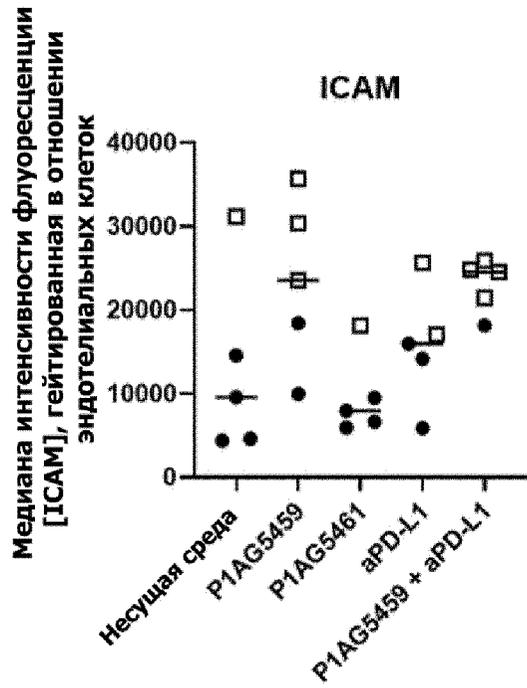
Фиг. 28А



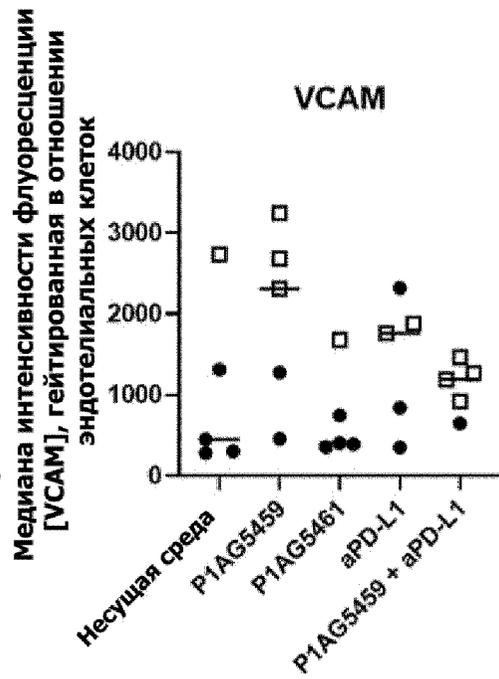
Фиг. 28Б



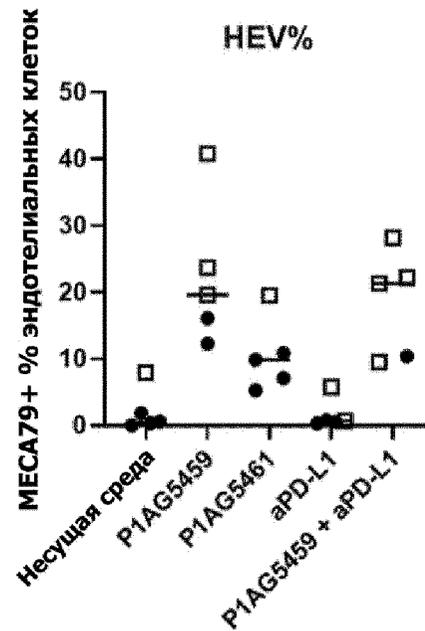
Фиг. 29А



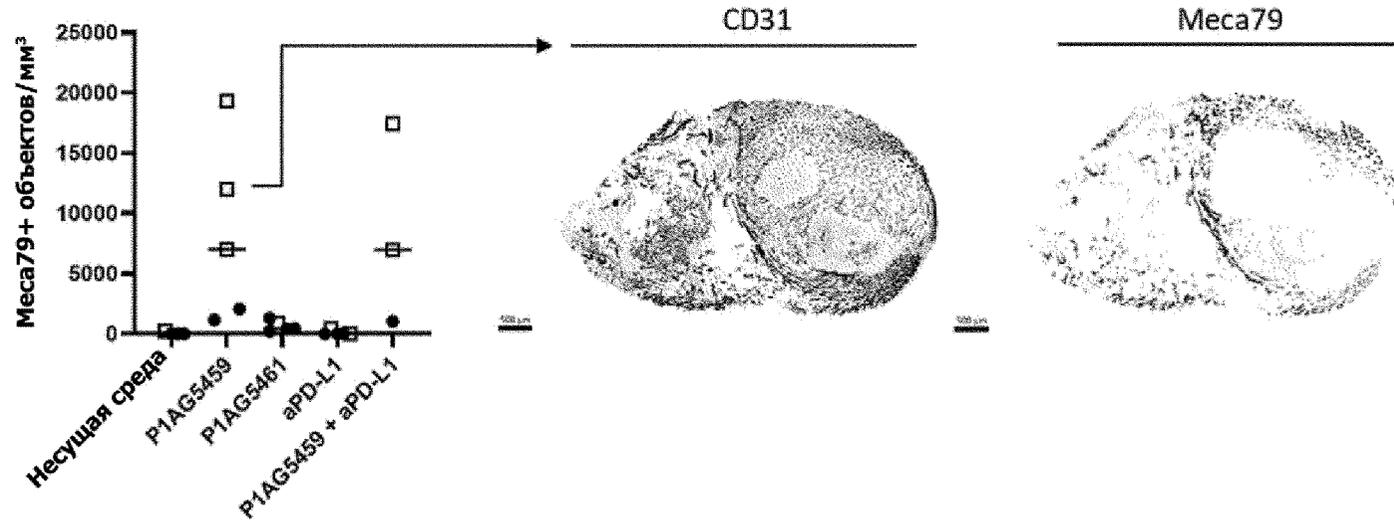
Фиг. 29Б



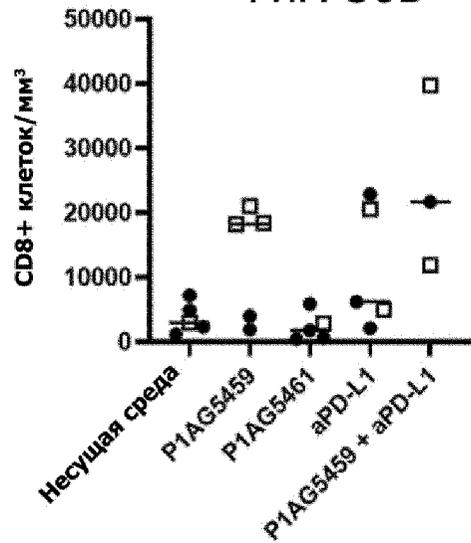
Фиг. 29В



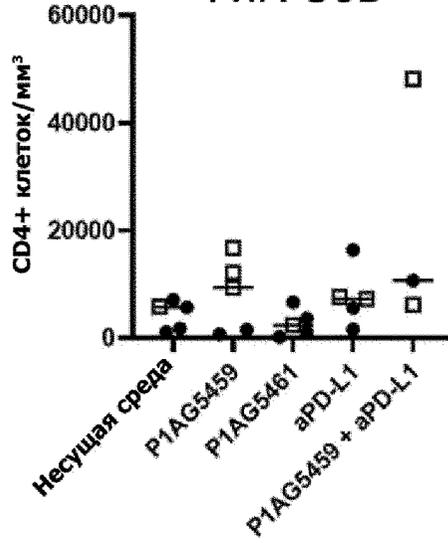
Фиг. 30А



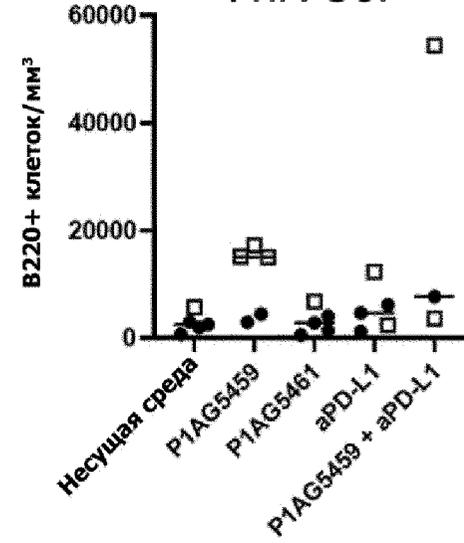
Фиг. 30Б



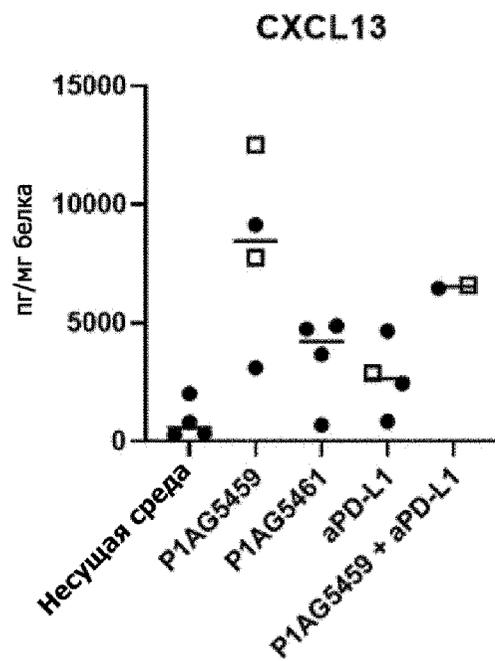
Фиг. 30В



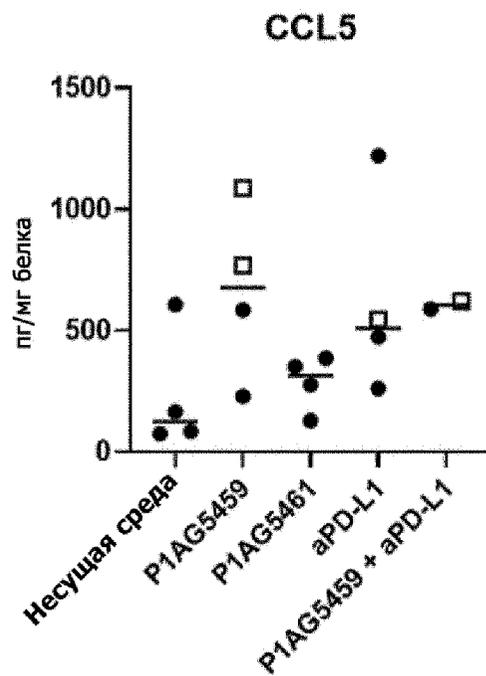
Фиг. 30Г



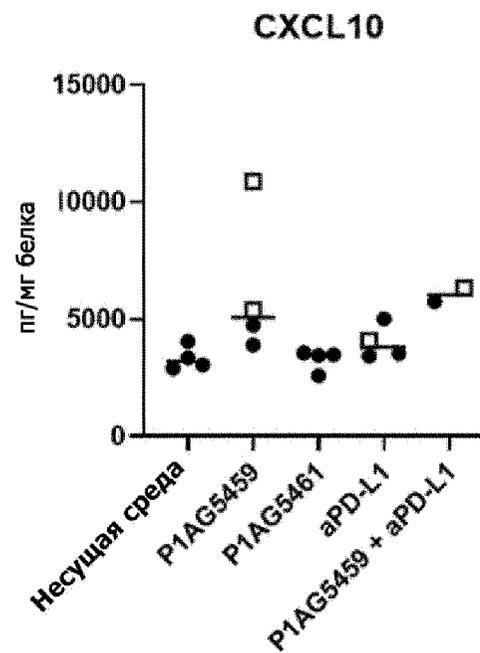
Фиг. 31А



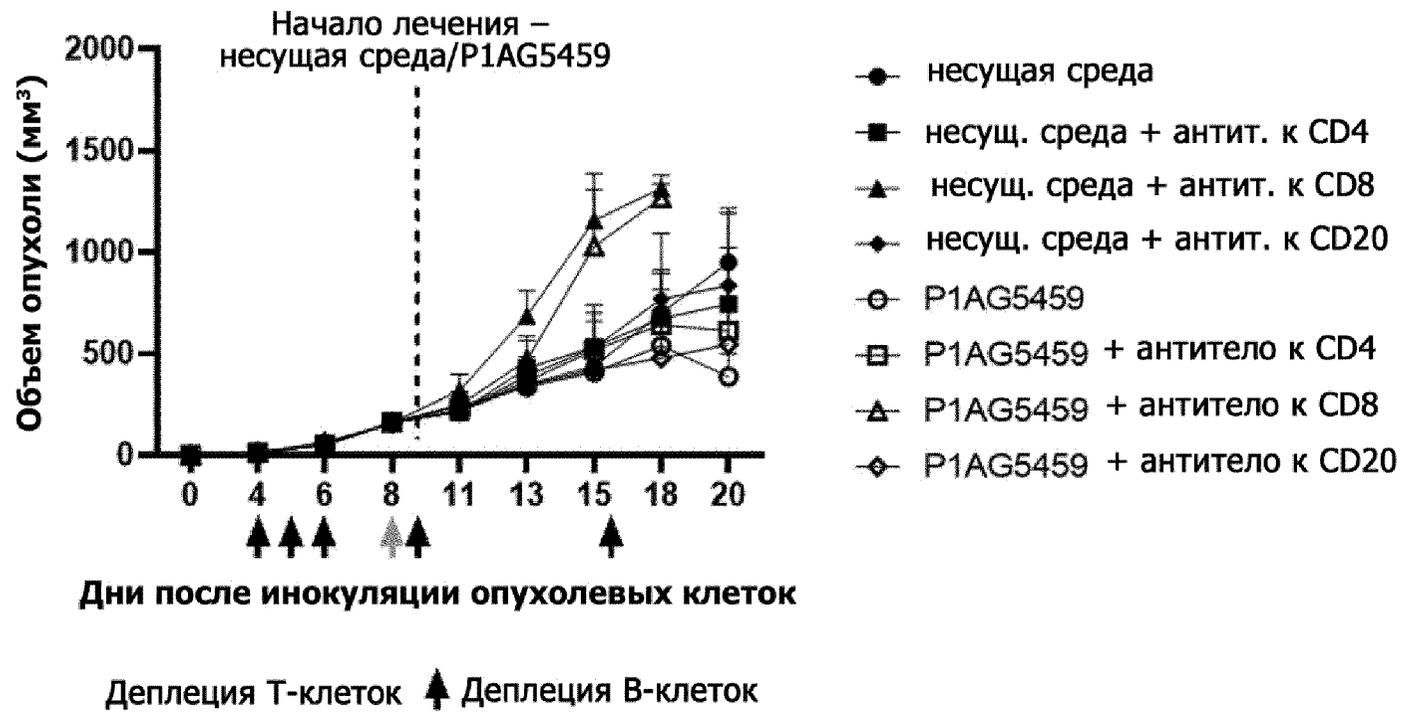
Фиг. 31Б



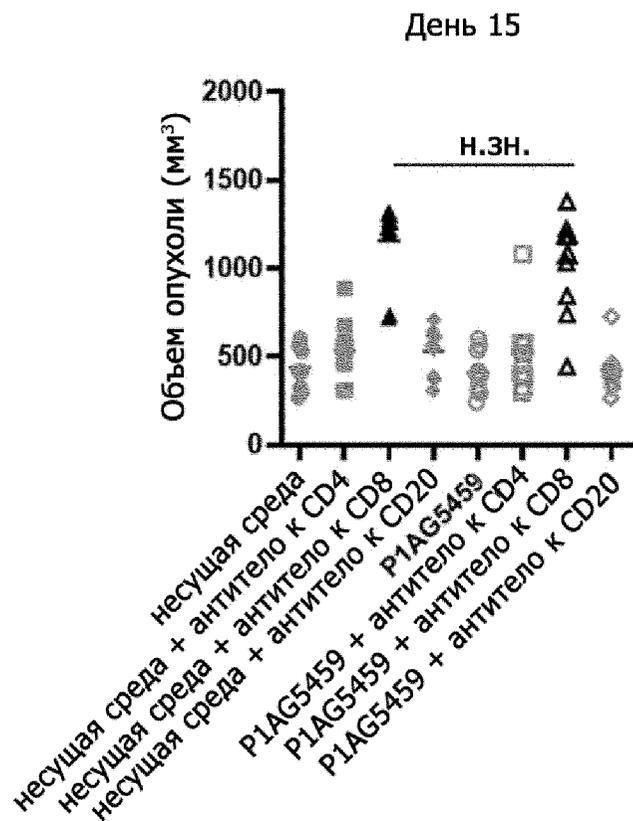
Фиг. 31В



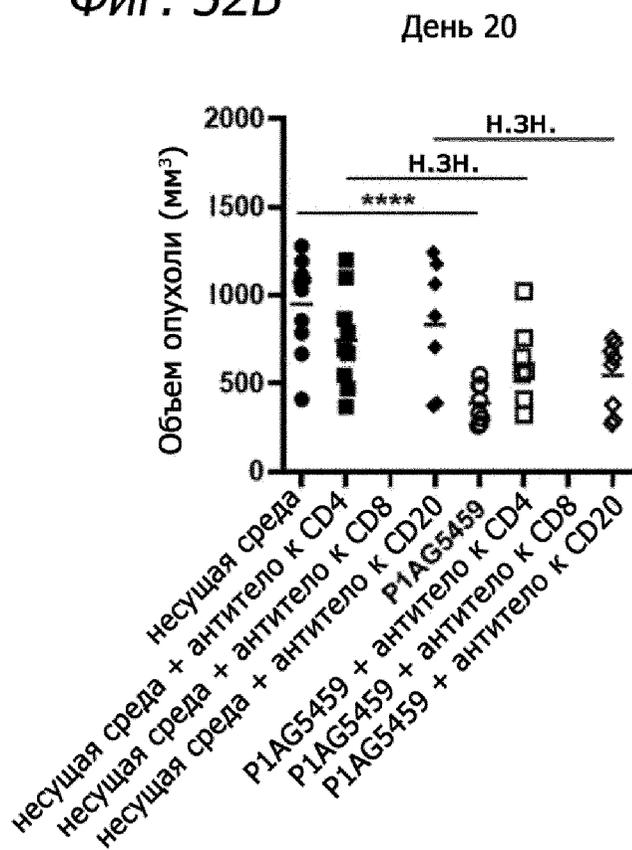
Фиг. 32А



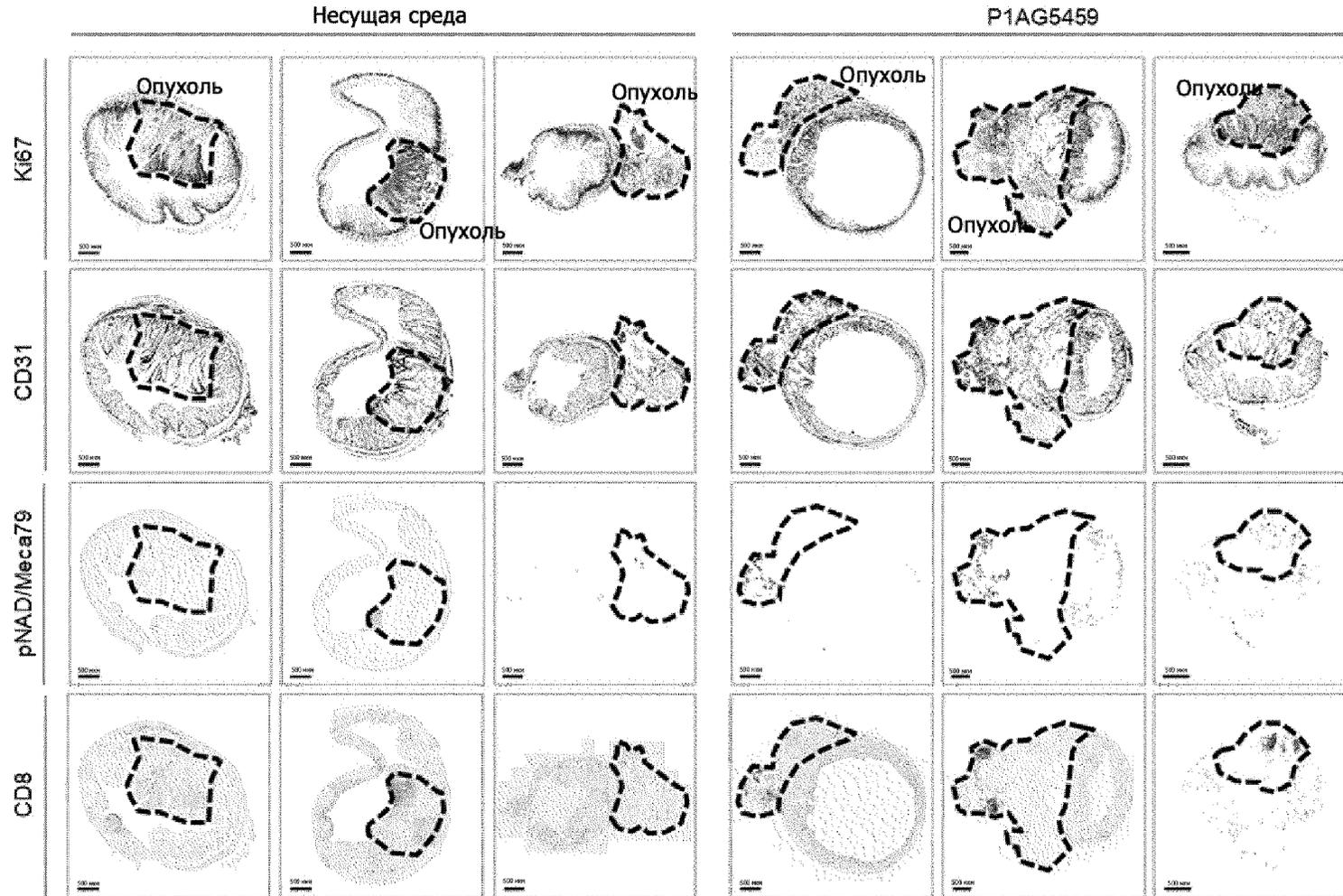
Фиг. 32Б



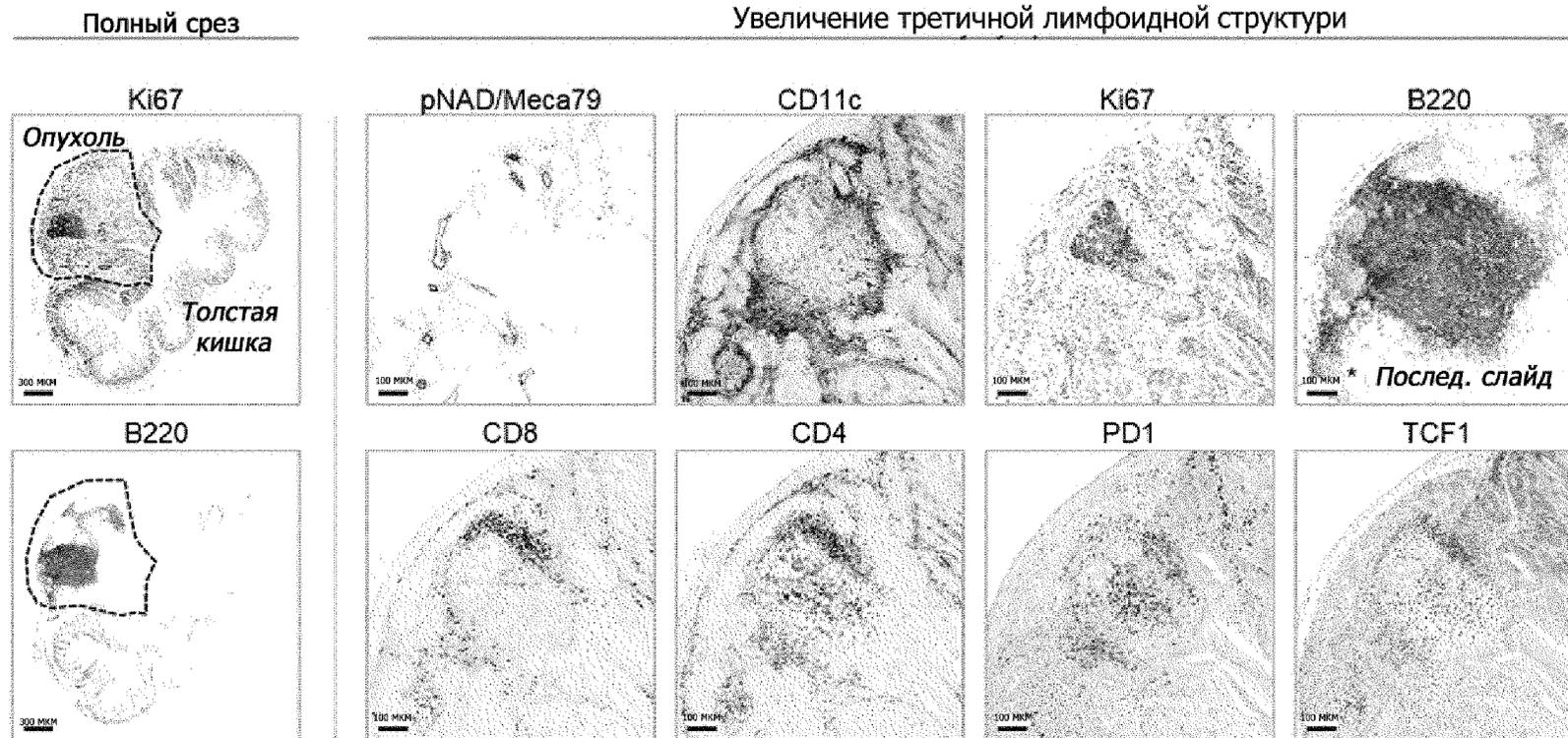
Фиг. 32В



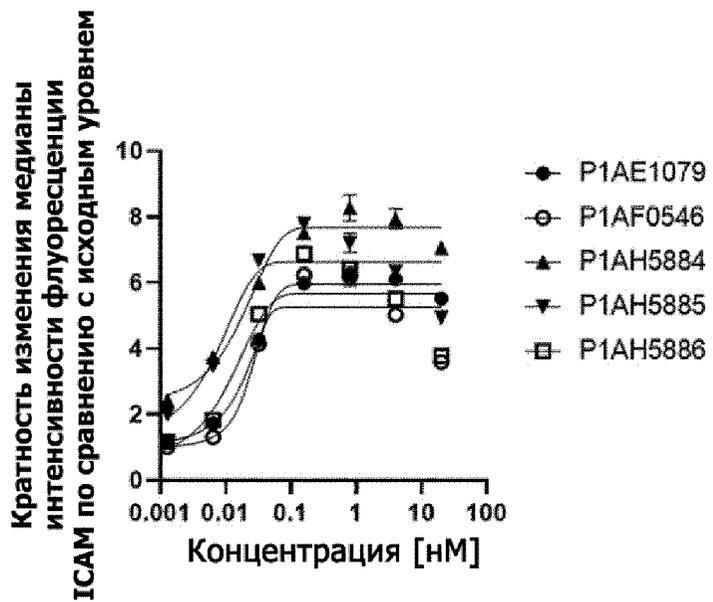
Фиг. 33



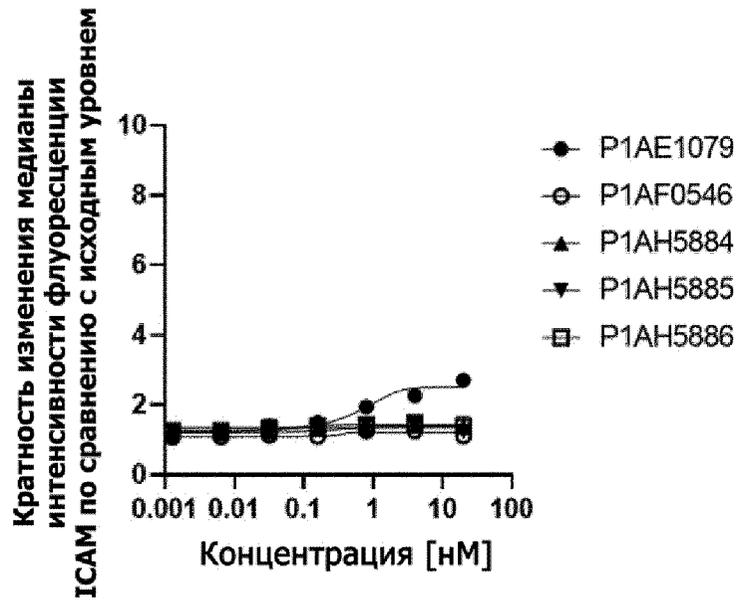
Фиг. 34



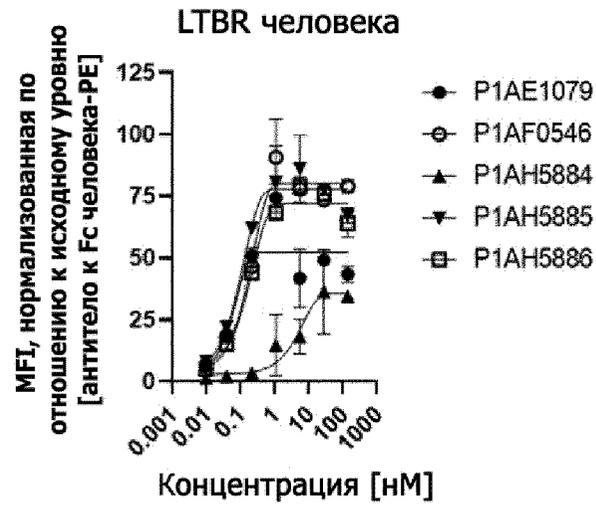
Фиг. 35А



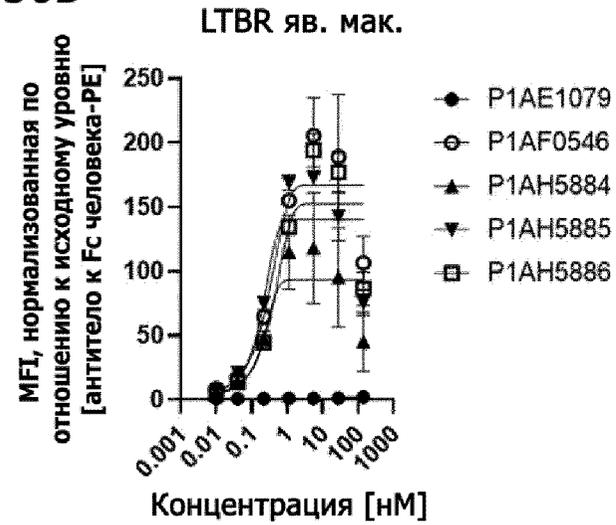
Фиг. 35Б



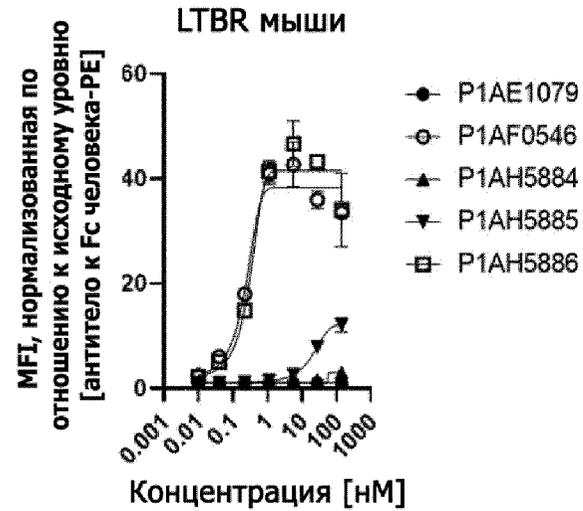
Фиг. 36А



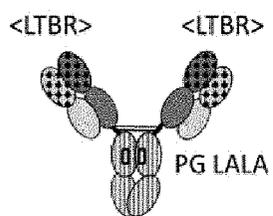
Фиг. 36Б



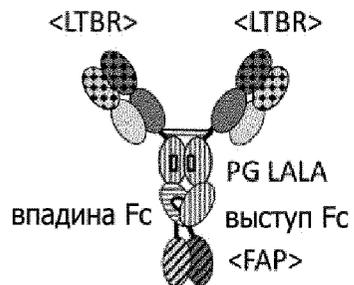
Фиг. 36В



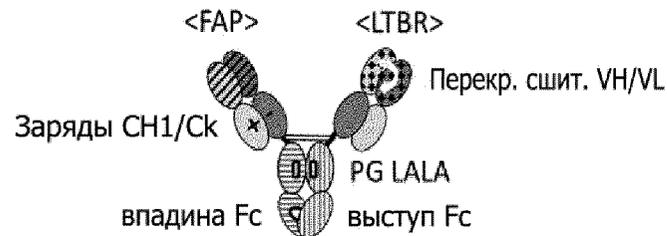
Фиг. 37А



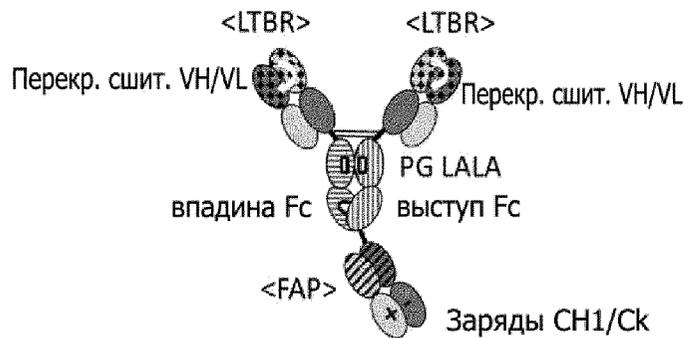
Фиг. 37Б



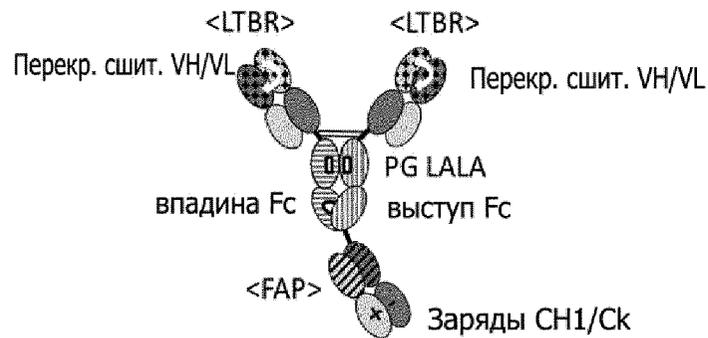
Фиг. 37В



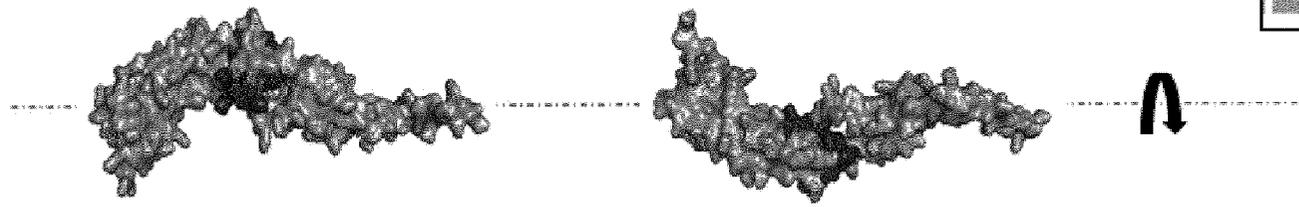
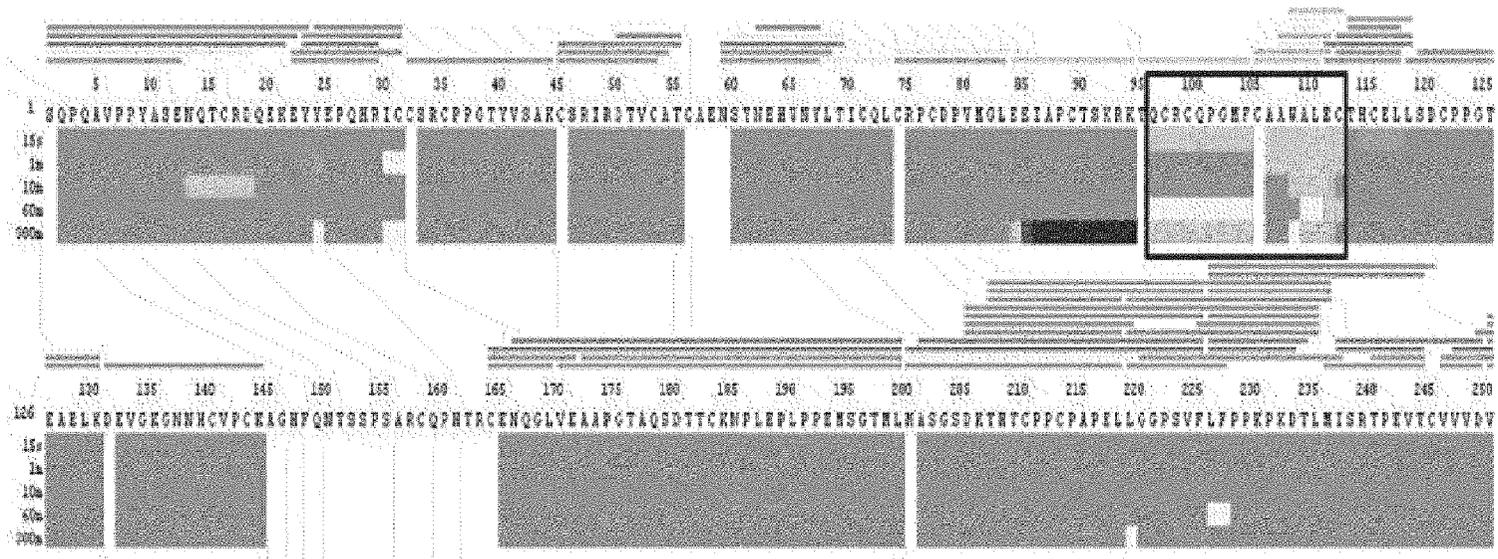
Фиг. 37Г



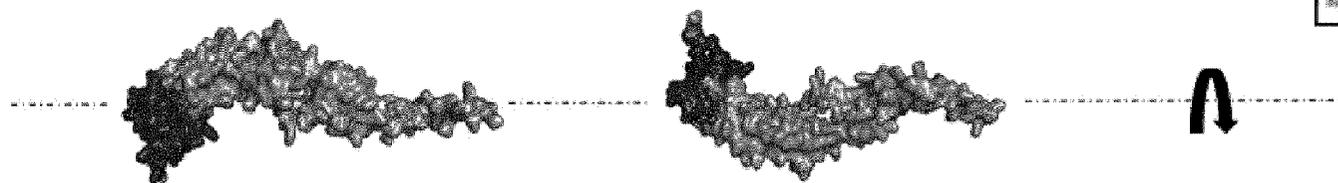
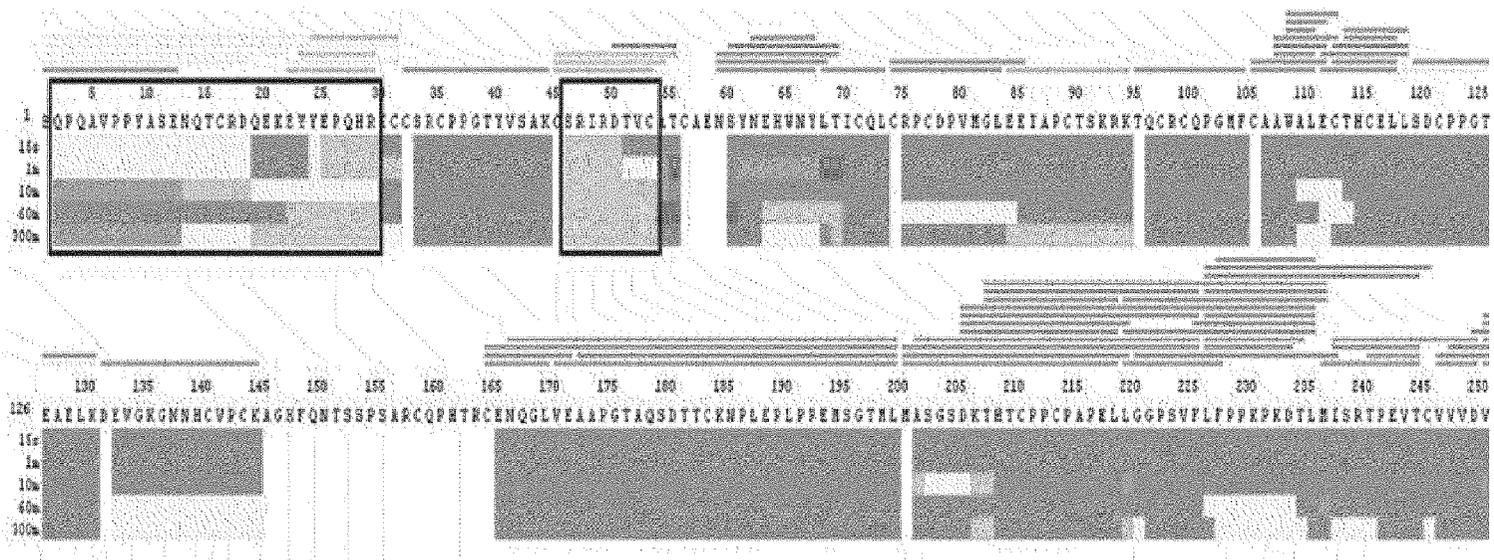
Фиг. 37Д



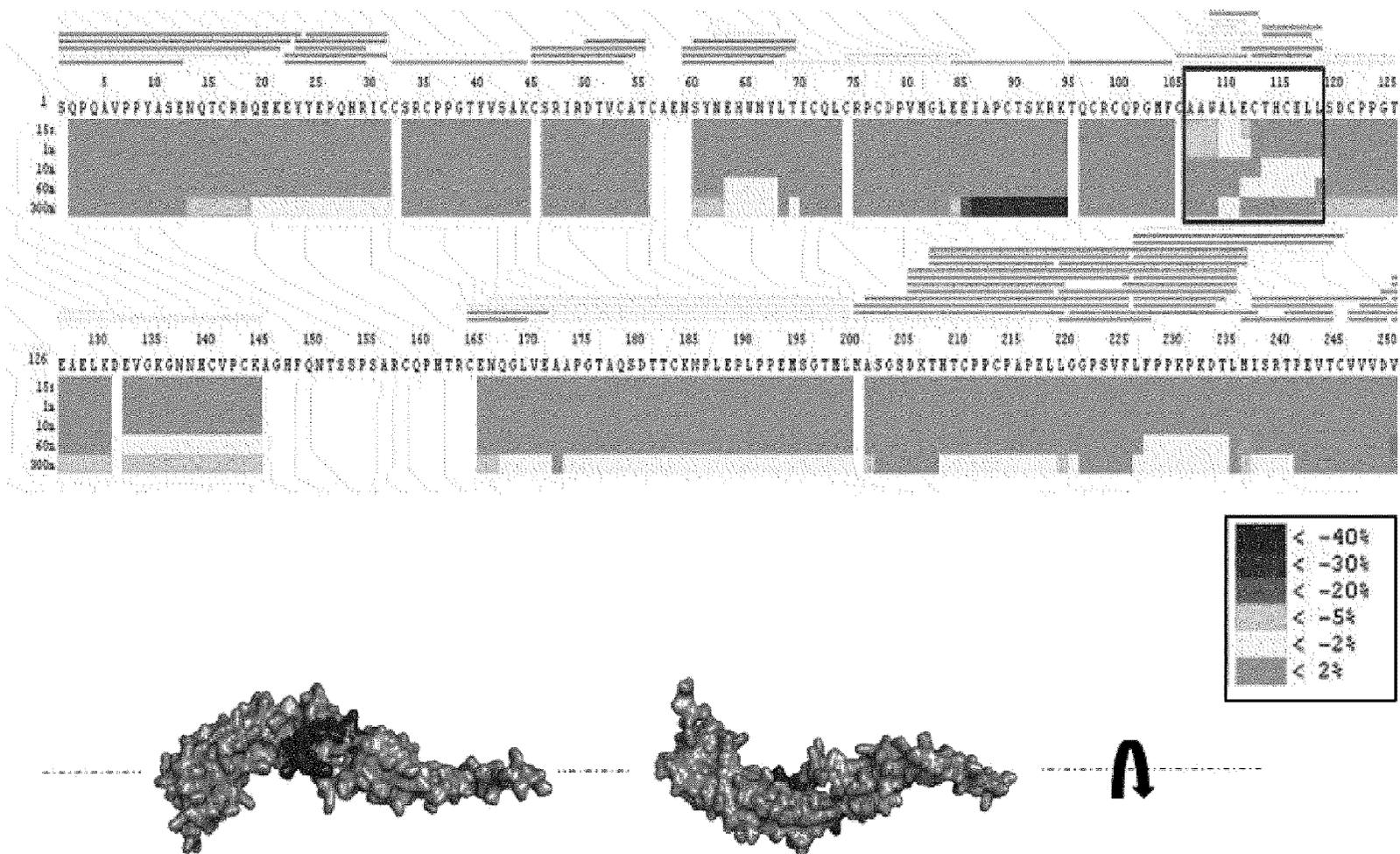
Фиг. 38А



Фиг. 38Б



Фиг. 38В



Фиг. 38Г

