

Область техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід стосується нових антитіл і їх застосування в медицині. Зокрема, винахід стосується біспецифічних антитіл, здатних зв'язуватися з PD-L1 людини й здатних зв'язуватися з CD3 людини. Також представлені нові класи антитіл, здатних зв'язуватися з PD-L1 людини. Винахід також стосується застосування антитіл за винаходом, а також способів, конструкцій з нуклеїнових кислот і клітин-хазяїв для одержання антитіл за винаходом.

Рівень техніки

Ліганд-1 запрограмованої смерті (PD-L1, PDL1, CD274, B7H1, B7-H1) є однопрогоновим мембранним білком I типу в 33 кДа. Були описані три ізоформи PD-L1 на основі альтернативного сплайсинга. PD-L1 належить до суперсімейства імуноглобулінів (Ig) і містить один Ig-подібний домен типу C2 і один Ig-подібний домен типу V. Свіжовиділені Т- і В-клітини експресують незначну кількість PD-L1, а фракція (близько 16 %) моноцитів CD14⁺ конститутивно експресує PD-L1 (Rietz and Chen, 2004, *Am J Transplant.* 4: 8-14). Відомо, що гамма-інтерферон (IFN-γ) підвищує рівень PD-L1 у пухлинних клітинах (Abiko et al., 2015, *Br J Cancer* 112: 1501-1509; Dong et al., 2002, *Nature Medicine* 8(8): 793-800).

PD-L1 пригнічує протипухлинний імунітет за рахунок: 1) надання толерантності реагуючим на пухлини Т-клітинам шляхом зв'язування зі своїм рецептором PD-1 (CD279) на активованих Т-клітинах (Dong et al., supra; Latchman et al., 2004, *Proc Natl Acad. Sci. USA* 101, 10691-6); 2) надання пухлинним клітинам стійкості до Т-клітин CD8⁺ і опосередкованому лігандом Fas лізису по сигналізації PD-1 через експресований пухлинними клітинами PD-L1 (Azuma et al., 2008, *Blood* 111, 3635-43); 3) надання Т-клітинам толерантності по зворотному зв'язку через експресований Т-клітинами CD80 (B7.1) (Butte et al., 2007, *Immunity* 27, 111-22; Park et al., 2010, *Blood* 116, 1291-8); і 4) сприяючи розвитку й підтримці індуктивних Т-регуляторних клітин (Francisco et al., 2009, *J Exp. Med.* 206, 3015-29). PD-L1 експресується при багатьох ракових захворюваннях людини, включаючи меланому, рак яєчників, рак легенів і товстої кишки (Dong et al., supra).

Антитіла, які блокують PD-L1, продемонстрували клінічну активність при деяких ракових захворюваннях, при яких гіперекспресується PD-L1 (включаючи меланому, NSCLC). Наприклад, атезоліумаб є гуманізованим моноклональним антитілом IgG1 проти PD-L1. У цей час він проходить клінічні випробування як імунотерапія за декількома показаннями, включаючи різні типи солідних пухлин (напр., див. Rittmeyer et al., 2017, *Lancet* 389: 255-265). Антитіло до PD-L1 авелумаб (Kaufman et al., *Lancet Oncol.* 2016, 17(10): 1374-1385) було схвалено FDA для лікування хворих дорослих і дітей у віці 12 років і більше з метастатичною карциномою Меркеля й у цей час проходить клінічні випробування за декількома раковими показаннями, включаючи рак сечового міхура, рак шлунка, рак голови й шиї, мезотеліому, NSCLC, рак яєчників і рак нирок. Антитіло до PD-L1 дурвалумаб схвалене для місцевого пізнього або метастатичного уротеліального раку й проходить клінічну розробку при багатьох солідних пухлинах і гематологічному раку (напр., див. Massard et al., 2016, *J Clin Oncol.* 34(26): 3119 -25). Інші антитіла проти PD-L1 були описані в WO 2004/004771, WO 2007/005874, WO 2010/036959, WO 2010/077634, WO 2013/079174, WO 2013/164694, WO 2013/173223 і WO 2014/022758.

Незважаючи на значний прогрес, досягнутий у ліквідації раку, усе ще існує потреба у подальшому поліпшенні терапії раку на основі антитіл.

Суть винаходу

У першому аспекті винаходу передбачені нові антитіла проти PD-L1, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини. Антитіла за цим другим аспектом винаходу можуть бути моноспецифічними або мультиспецифічними, а якщо вони мультиспецифічні, то дані мультиспецифічні антитіла можуть містити або не містити антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини.

Винаходом також передбачені біспецифічні антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε (епсilon) людини. Такі біспецифічні антитіла мають подвійну дію.

По-перше, через свою ділянку зв'язування PD-L1 антитіло зв'язує експресуючі PD-L1 пухлинні клітини, а через свою ділянку зв'язування CD3 антитіло зв'язує Т-клітини. Таким чином, антитіло приводить Т-клітини в безпосередню близькість до пухлинних клітин, тим самим сприяючи знищенню пухлинних клітин Т-клітинами. Крім того, не обмежуючись якою-небудь конкретною теорією, передбачається, що приведення експресуючих PD-L1 клітин і ефекторних Т-клітин у безпосередню близькість одну до одної може ініціювати вивільнення γ-інтерферону, який, у свою чергу, може активувати PD-L1 у пухлинних клітинах, тим самим сприяючи рекрутингу більшої кількості антитіл до пухлини й додатково підсилюючи її знищення.

По-друге, біспецифічні антитіла за винаходом інгібують зв'язування PD-L1 людини з PD-1 людини, тим самим запобігаючи блокуванню PD-L1 протипухлинного імунітету через PD-1.

Біспецифічні антитіла CD3×PD-L1 особливо корисні в таких терапевтичних умовах, при яких бажане специфічне наведення й опосередковане Т-клітинами знищення клітин, експресуючих PD-L1.

Біспецифічні антитіла CD3×PD-L1 дуже ефективні для знищення клітин, експресуючих PD-L1, у тому числі, у деяких втіленнях, клітин з малим числом копій PD-L1.

Антитіла за винаходом здатні зв'язуватися з такими експресуючими PD-L1 клітинами, як клітини MDA-MB-231, PC3 або HELA. Крім того, антитіла за винаходом інгібують взаємодію між PD-L1 і PD-1 і можуть опосередковувати знищення клітин MDA-MB-231, PC3 і/або HELA очищеними Т-клітинами або PBMC.

В іншому аспекті винаходу передбачене застосування антитіл за винаходом в медицині, зокрема, для лікування раку.

Ці й інші аспекти винаходу описані більш докладно нижче.

Короткий опис фігур

Фіг. 1. Зв'язування біспецифічних антитіл до PD-L1 CD3×PD-L1 і b12×PD-L1 і їх моноспецифічних, бівалентних аналогів із клітинами MDA-MB-231. (A) Зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR і IgG1-338-FEAR, (B) зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR і IgG1-547-FEAR, (C) зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR і IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×338-FEAR, (E) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×547-FEAR, (F) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR. Представлені дані за середньою інтенсивністю флуоресценції (MFI) при визначенні методом проточної цитометрії для одного репрезентативного експерименту.

Фіг. 2. Зв'язування біспецифічних антитіл до PD-L1 CD3×PD-L1 і b12×PD-L1 і їх моноспецифічних, бівалентних аналогів із клітинами PC3. (A) Зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR і IgG1-338-FEAR, (B) зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR і IgG1-547-FEAR, (C) зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR і IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×338-FEAR, (E) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×547-FEAR, (F) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR. Представлені дані за середньою інтенсивністю флуоресценції (MFI) при визначенні методом проточної цитометрії для одного репрезентативного експерименту.

Фіг. 3. Зв'язування біспецифічних антитіл до PD-L1 CD3×PD-L1 і b12×PD-L1 і їх моноспецифічних, бівалентних аналогів із клітинами HELA. (A) Зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR і IgG1-338-FEAR, (B) зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR і IgG1-547-FEAR, (C) зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR і IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×338-FEAR, (E) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×547-FEAR, (F) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR. Представлені дані за середньою інтенсивністю флуоресценції (MFI) при визначенні методом проточної цитометрії для одного репрезентативного експерименту.

Фіг. 4. Зв'язування біспецифічних антитіл до PD-L1 b12×PD-L1 і їх моноспецифічних, бівалентних аналогів із клітинами SK-MES-1. (A) Зв'язування bslgG1-b12-FEAL×338-FEAR і IgG1-338-FEAR, (B) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×547-FEAR і IgG1-547-FEAR, (C) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR і IgG1-511-LC33S-FEAR. Представлені дані за середньою інтенсивністю флуоресценції (MFI) при визначенні методом проточної цитометрії для одного репрезентативного експерименту.

Фіг. 5. Зв'язування біспецифічних антитіл до PD-L1 CD3×PD-L1 і b12×PD-L1 і їх моноспецифічних, двовалентних аналогів із клітинами CHO, трансфікованими PD-L1 макака-крабоїда. (A) Зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR і IgG1-338-FEAR, (B) зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR і IgG1-547-FEAR, (C) зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR і IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×338-FEAR, (E) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×547-FEAR, (F) зв'язування bslgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR. Представлені дані за середньою інтенсивністю флуоресценції (MFI) при визначенні методом проточної цитометрії для одного репрезентативного експерименту.

Фіг. 6. Перехресне блокування антитіл. Визначення перехресного блокування антитіл проводили методом інтерферометрії в біошарі. Усі антитіла одержували в кістяку IgG1 FEAR. У таблиці сигнали $\geq 0,1$ нм уважалися не блокуючими парами антитіл (представлені у вигляді цифр звичайним шрифтом у табл.), сигнали менше 0,1 уважалися блокуючими парами антитіл (представлені у вигляді цифр жирним шрифтом у табл.), а деякі сигнали не були ні блокуючими, ні неблокуючими, вони представлені як антитіла, що проявляють витіснення (указані зірочкою (*) в табл.). MEDI = MEDI4736; MPDL = MPDL3280A. Представлені типові графіки для витісняючих (A), блокуючих (B) і неблокуючих (C) пар антитіл.

Фіг. 7. Вплив біспецифічних антитіл до PD-L1 b12×PD-L1 і їх моноспецифічних, бівалентних аналогів на взаємодію PD-1/PD-L1. Дію (A) bslgG1-b12-FEAL×338-FEAR і IgG1-338-FEAR, (B) bslgG1-b12-FEAL×547-FEAR і IgG1-547-FEAR, (C) bslgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR і IgG1-511-LC33S-FEAR визначали методом біоаналіза блокади PD-1/PD-L1. Представлені дані з кратності індукції щодо контролю (без додавання антитіл) для одного репрезентативного експерименту.

Фіг. 8. Індукція цитотоксичності in vitro біспецифічними антитілами CD3×PD-L1 на клітинах MDA-MB-231. Клітини MDA-MB-231 інкубували з bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR, bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR і bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR. У якості ефекторних клітин використовували очищені Т-клітини (A) або PBMCs (B). Представлені дані у вигляді % життєздатних клітин для одного репрезентативного експерименту.

Фіг. 9. Індукція цитотоксичності *in vitro* біспецифічними антитілами CD3×PD-L1 на клітинах PC-3. Клітини PC-3 інкубували з bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR і bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR. У якості ефektorних клітин використовували очищені Т-клітини (А) або PBCs (В). Представлені дані у вигляді % життєздатних клітин для одного репрезентативного експерименту.

Фіг. 10. Індукція цитотоксичності *in vitro* біспецифічними антитілами CD3×PD-L1 на клітинах HELA. Клітини HELA інкубували з bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR і bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR. У якості ефektorних клітин використовували очищені Т-клітини (А) або PBCs (В). Представлені дані у вигляді % життєздатних клітин для одного репрезентативного експерименту.

Фіг. 11. Проліферація й активація Т-клітин біспецифічними антитілами CD3×PD-L1. Біспецифічні антитіла CD3×PD-L1 тестували при аналізі *in vitro* для вимірювання активації й проліферації Т-клітин, використовуючи клітини MDA-MB-231 у якості клітин-мішеней і очищені Т-клітини в якості ефektorних клітин. (А) Загальне число Т-клітин, (В) число Т-клітин CD69^{pos}, (С) число Т-клітин CD25^{pos}.

Фіг. 12. Зміни у зв'язуванні антитіл до PD-L1 з варіантами PD-L1 з аланіновими мутаціями в положеннях з 42 по 131. Кратність змін визначали як $\log_{10}(\text{нормалізоване } gMFI_{[\text{Ala-мутація}]} / \text{нормалізоване } gMFI_{[\text{wt}]})$. Залишки, за якими зміни у зв'язуванні були менші, ніж середня зміна – $1,5 \times SD$ (зазначені пунктирною лінією), уважалися “мутаціями із втратою зв'язування”. Залишки з позитивними значеннями змін у зв'язуванні – це залишки із втратою зв'язування в контрольного антитіла IgG1-625-FEAR-A488 (залишки 75 і 86). Цифрами над віссю x позначені положення амінокислот.

Фіг. 13. Антитілозалежна клітинна цитотоксичність у клітин MDA-MB-231 під дією антитіл до PD-L1 при визначенні методом вивільнення ⁵¹Cr. Визначали ADCC клітин MDA-MB-231 методом вивільнення ⁵¹Cr *in vitro* зі свіжевиділеними PBCs від здорового донора-людини при співвідношенні Е:Т = 100:1. Для кожної точки даних представлено середнє значення й стандартне відхилення з 3 повторів. Представлений типовий приклад із PBCs від одного донора.

Фіг. 14. Антитілозалежна клітинна цитотоксичність у клітин MDA-MB-231 під дією антитіл до PD-L1 при визначенні люмінесцентним методом біоаналіза репортера ADCC. Визначали ADCC у клітин MDA-MB-231 під дією антитіл до PD-L1, використовуючи експресуючі FcγRIIIa репортерні клітини Jurkat, які експресують люциферазу при зв'язуванні FcγRIIIa. Продукція люциферази представлена у вигляді відносних одиниць люмінесценції (RLU). Для кожної точки даних представлено середнє значення й стандартне відхилення з 2 повторів.

Розкриття сутності винаходу

Визначення

Термін “імуноглобулін” відноситься до класу структурно споріднених глікопротеїнів, які складаються із двох пар поліпептидних ланцюгів: однієї пари легких (L) низькомолекулярних ланцюгів і однієї пари важких (H) ланцюгів, причому всі чотири зв'язані між собою дисульфідними зв'язками. Структура імуноглобулінів добре вивчена, приміром, див. Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul W., 2nd ed., Raven Press, N.Y. (1989)). Коротко, кожний важкий ланцюг зазвичай складається з варіабельної області важкого ланцюга (скорочено V_H) і константної області важкого ланцюга (скорочено C_H). Константна область важкого ланцюга зазвичай складається із трьох доменів: C_{H1}, C_{H2} і C_{H3}. Шарнірна ділянка перебуває між доменами C_{H1} і C_{H2} важкого ланцюга і є дуже гнучкою. Дисульфідні зв'язки в шарнірній ділянці є частиною взаємодій між двома важкими ланцюгами в молекулі IgG. Кожний легкий ланцюг зазвичай складається з варіабельної області легкого ланцюга (скорочено V_L) і константної області легкого ланцюга (скорочено C_L). Константна область легкого ланцюга зазвичай складається з одного домена, C_L. Області V_H і V_L можна ще підрозділити на ділянки гіперваріабельності (або гіперваріабельні ділянки, які можуть бути гіперваріабельними за послідовністю й/або утворювати структурно визначені петлі), які також іменуються визначальними комплементарності ділянками (CDR) і перемижуються з більш консервативними ділянками, а саме каркасними ділянками (FR). Кожний V_H і V_L зазвичай складається із трьох CDR і чотирьох FR, що розташовуються від N-кінця до C-кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (також див. Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Якщо не зазначено інакше або не суперечить контексту, послідовності CDR ідентифікуються тут відповідно до правил IMGT за допомогою Domalignalign Version 4.9.2 (2016-09-26) (Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999, 27:209-212; і Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P., Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010); також див. інтернет-адреса <http://www.imgt.org/>). Якщо не зазначено інакше або не суперечить контексту, зазначення положень амінокислот у константних областях за даним винаходом відповідають нумерації EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA 1969 May, 63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242). Наприклад, в SEQ ID NO: 93 наведені положення амінокислот 118-447 за нумерацією EU у константній області важкого ланцюга IgG1m(f).

Термін “амінокислота, яка відповідає положенню...” у даному винаході відноситься до номера положення амінокислоти у важкому ланцюзі IgG1 людини. Відповідні положення амінокислот в інших імуноглобулінах можна знайти шляхом вирівнювання з IgG1 людини. Так, амінокислота або сегмент в

одній послідовності, яка “відповідає” амінокислоті або сегменту в іншій послідовності, вирівнюється з іншою амінокислотою або сегментом за допомогою стандартної програми вирівнювання послідовностей типу ALIGN, ClustalW або аналогічної, зазвичай при налаштуваннях за замовчуванням, і щонайменше на 50 %, на 80 %, на 90 % або на 95 % ідентична важкому ланцюгу IgG1 людини. У даній області добре відомо, як вирівнюються послідовності або сегменти послідовності й тим самим визначаються положення в послідовності, які відповідають положенням амінокислот за даним винаходом.

Термін “антитіло” (Ab) у контексті даного винаходу відноситься до молекул імуноглобуліну, фрагментів молекул імуноглобуліну або похідних тих і інших, які мають здатність до специфічного зв'язування з антигеном у типових фізіологічних умовах зі значним за часом періодом напівжиття типу щонайменше 30 хв., щонайменше 45 хв., щонайменше одна година, щонайменше дві години, щонайменше чотири години, щонайменше 8 годин, щонайменше 12 годин, близько 24 годин або більше, близько 48 годин або більше, близько 3, 4, 5, 6, 7 або більше днів і т.д., або будь-яким іншим відповідним функціонально визначеним періодом (типу часу, достатнього для індукції, стимулювання, посилення й/або модулювання фізіологічної реакції, зв'язаної зі зв'язуванням антитіла з антигеном, і/або часу, достатнього для того, щоб антитіло викликало ефекторну активність). Варіабельні області важкого й легкого ланцюгів молекули імуноглобуліну містять домен зв'язування, взаємодіючий з антигеном. Термін “антигензв'язуюча ділянка” у даному винаході відноситься до ділянки, яка взаємодіє з антигеном і включає ділянки V_H і V_L . Термін антитіло в даному винаході охоплює не тільки моноспецифічні антитіла, але також і мультиспецифічні антитіла, які містять декілька, як от дві або більше, напр., три або більше різних антигензв'язуючих ділянок. Константні області антитіл (Abs) можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну із тканинами або факторами хазяїна, включаючи різні клітини імунної системи (типу ефекторних клітин) і компонента системи комплементу типу C1q, першого компонента в класичному шляху активації комплементу. Як зазначено вище, термін антитіло, якщо не зазначено інакше або явно не суперечить контексту, включає фрагменти антитіл, які є антигензв'язуючими фрагментами, тобто зберігають здатність до специфічного зв'язування з антигеном. Було показано, що антигензв'язуюча функція антитіл може виконуватися фрагментами повнорозмірних антитіл. Приклади антигензв'язуючих фрагментів, охоплюваних терміном “антитіло”, включають (i) Fab'- або Fab-фрагмент – моновалентний фрагмент, який складається з доменів V_L , V_H , C_L і C_{H1} , або моновалентне антитіло типу описаних в WO 2007/059782 (Genmab); (ii) F(ab')₂-фрагменти – бівалентні фрагменти, які містять два Fab-фрагмента, з'єднаних дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) Fd-фрагмент, який складається в основному з доменів V_H і C_{H1} ; (iv) Fv-фрагмент, який складається в основному з доменів V_L і V_H одного плеча антитіла, (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), який в основному складається з домена V_H і також називається доменним антитілом (Holt et al., Trends Biotechnol. 2003 Nov, 21(11): 484-90); (vi) верблужі або нанотіла (Revets et al., Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan, 5(1): 111-24) і (vii) виділені ділянки, які визначають комплементарність (CDR). Крім того, хоча два домена Fv-фрагмента, V_L і V_H , кодуються окремими генами, їх можна з'єднати рекомбінантними методами за допомогою синтетичного лінкера, який дозволяє їм вироблятися у вигляді єдиного білкового ланцюга, у якому області V_L і V_H попарно утворюють моновалентні молекули (відомі як одноланцюгові антитіла або одноланцюгові Fv (scFv), приміром, див. Bird et al., Science 242, 423-426 (1988); і Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такі одноланцюгові антитіла охоплюються терміном антитіло, якщо не зазначено інакше або не впливає явно з контексту. Хоча такі фрагменти зазвичай входять у значення антитіла, однак вони в сукупності й кожний незалежно є унікальними ознаками даного винаходу, що проявляють різні біологічні властивості й застосовності. Ці й інші корисні фрагменти антитіл у контексті даного винаходу, а також біспецифічні формати таких фрагментів ще обговорюються далі. Також слід мати на увазі, що термін антитіло, якщо не зазначено інакше, також охоплює поліклональні антитіла, моноклональні антитіла (mAb), антитілоподібні поліпептиди типу химерних антитіл і гуманізованих антитіл, а також фрагменти антитіл, що зберігають здатність до специфічного зв'язування з антигеном (антигензв'язуючі фрагменти), отримані будь-яким відомим методом типу ферментативного розщеплення, синтезу пептидів і рекомбінантних методів. Отримане антитіло може мати будь-який ізотип. У даному винаході термін “ізотип” відноситься до класу імуноглобуліну (приміром, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE або IgM), який кодується генами константної області важкого ланцюга. При згадуванні конкретного ізотипа, напр., IgG1, термін не обмежується певною послідовністю ізотипа, напр., конкретною послідовністю IgG1, але означає те, що антитіло ближче за послідовністю до цього ізотипа, напр., IgG1, ніж до інших ізотипів. Так, напр., антитіло типу IgG1 за винаходом може бути варіантом послідовності природного антитіла IgG1, що включає варіації в константних областях.

Термін “моноклональне антитіло” у даному винаході відноситься до препаратів молекул антитіл з однаковим молекулярним складом. Композиція моноклонального антитіла проявляє одну специфічність зв'язування й спорідненість до конкретного епітопу. Відповідно, термін “людське моноклональне антитіло” відноситься до антитіл, що проявляють одну специфічність зв'язування, у яких варіабельні й константні області походять із гаметних послідовностей імуноглобуліну людини.

Людські моноклональні антитіла можуть вироблятися гібридомою, яка включає В-клітини, отримані із трансгенної або трансхромосомної тварини типу трансгенної миші, геном якої містить трансген важкого ланцюга людини й трансген легкого ланцюга, злиті з іморталізованими клітинами.

Термін “біспецифічне антитіло” або “bs” у контексті даного винаходу відноситься до антитіл, які містять дві різні антигензв’язуючі ділянки, задані різними послідовностями антитіл. У деяких втіленнях дані різні антигензв’язуючі ділянки зв’язують різні епітопи на тому самому антигені. Однак у кращих втіленнях дані різні антигензв’язуючі ділянки зв’язують різні цільові антигени. Біспецифічні антитіла можуть бути в будь-якому форматі, включаючи будь-які з описаних нижче форматів біспецифічних антитіл.

У даному винаході терміни “половинка молекули”, “Fab-плече” і “плече” відносяться до однієї пари важкий ланцюг-легкий ланцюг.

Якщо описано, що біспецифічне антитіло містить половинку молекули антитіла, “яка походить з” першого антитіла, і половинку молекули антитіла, “яка походить з” другого антитіла, то термін “походить з” означає, що біспецифічне антитіло було отримано шляхом рекомбінації будь-яким відомим способом даних половинок молекул від кожного з даних першого й другого антитіла в одне біспецифічне антитіло. У цьому контексті “рекомбінація” не повинна обмежуватися якимось конкретним методом рекомбінації, а включає всі способи одержання біспецифічних антитіл, описані тут, включаючи, приміром, рекомбінацію шляхом обміну половинок молекул, а також рекомбінацію на рівні нуклеїнової кислоти й/або за допомогою спільної експресії двох половинок молекул у тих самих клітинах.

Термін “моновалентне антитіло” у контексті даного винаходу означає, що молекула антитіла здатна зв’язувати тільки одну молекулу антигену й тому не здатна зшивати антигени або клітини.

Термін “повнорозмірне” при використанні в контексті антитіла означає те, що антитіло не є фрагментом, а містить усі домени певного ізотипа, які зазвичай зустрічаються в цього ізотипа в природі, напр., домени V_H , C_H1 , C_H2 , C_H3 , шарнірний, V_L і C_L антитіла IgG1.

У даному винаході, якщо це не суперечить контексту, термін “Fc-область” відноситься до області антитіла, яка складається із двох послідовностей Fc важких ланцюгів імуноглобуліну, причому дані послідовності Fc містять щонайменше шарнірну ділянку, домен C_H2 і домен C_H3 .

У даному винаході термін “гетеродимерна взаємодія між першою і другою ділянками C_H3 ” відноситься до взаємодії між першою ділянкою C_H3 і другою ділянкою C_H3 у гетеродимерному білку типу перший- C_H3 /другий- C_H3 .

У даному винаході термін “гомодимерна взаємодія першої та другої ділянок C_H3 ” відноситься до взаємодії між першою ділянкою C_H3 і іншою першою ділянкою C_H3 у гомодимерному білку типу перший- C_H3 /перший- C_H3 і взаємодії між другою ділянкою C_H3 і іншою другою ділянкою C_H3 у гомодимерному білку типу другий- C_H3 /другий- C_H3 .

У даному винаході терміни “здатне зв’язуватися” або “зв’язується” у контексті зв’язування антитіла із заданим антигеном або епітопом зазвичай означає зв’язування зі спорідненістю, яка відповідає значенню K_D в 10^{-6} М або менше, як от 10^{-7} М або менше, як от 10^{-8} М або менше, як от 10^{-9} М або менше, близько 10^{-10} М або менше або 10^{-11} М або ще менше, при визначенні методом інтерферометрії в біошарі (BLI), напр., як описано в прикладі 8, або ж, приміром, при визначенні за технологією поверхневого плазмонного резонансу (SPR) на приладі BIACore 3000 при використанні антигену в якості ліганда й антитіла в якості аналізованої речовини. Антитіло зв’язується із заданим антигеном зі спорідненістю, яка відповідає значенню K_D , яке щонайменше вдесятеро менше, як от щонайменше в 100 разів менше, як от щонайменше в 1000 разів менше, як от щонайменше в 10 000 разів менше, як от щонайменше в 100 000 разів менше, ніж його спорідненість при зв’язуванні зі неспецифічним антигеном (напр., BSA, казеїном), а не із заданим антигеном або близькоспорідненим антигеном. У якому ступені спорідненість буде менше, залежить від K_D антитіла, тому, якщо значення K_D антитіла дуже низьке (тобто антитіло є високоспецифічним), то ступінь, у якому спорідненість до антигену буде нижче, ніж спорідненість до неспецифічного антигену, може становити щонайменше 10 000 разів.

Термін “ k_d ” (сек⁻¹) у даному винаході відноситься до константи швидкості дисоціації певної взаємодії антитіло-антиген. Дана величина також згадується як значення k_{off} або k_{dis} .

Термін “ K_D ” (М) у даному винаході відноситься до рівноважної константи дисоціації певної взаємодії антитіло-антиген. Отримується шляхом розподілу k_d на k_a .

Термін “ k_a ” (М⁻¹×сек⁻¹) у даному винаході відноситься до константи швидкості асоціації певної взаємодії антитіло-антиген. Дана величина також згадується як значення k_{on} або швидкість асоціації.

У кращому втіленні антитіло за винаходом є виділеним. “Виділене антитіло” у даному винаході означає таке антитіло, яке практично не містить інших антитіл з іншою антигенною специфічністю. У кращому втіленні виділене біспецифічне антитіло, яке специфічно зв’язується з PD-L1 і другою мішенню типу CD3, практично не містить моноспецифічних антитіл, що специфічно зв’язуються з PD-L1 або із другою мішенню, напр., CD3. В іншому кращому втіленні антитіло або фармацевтична композиція, що містить антитіло, практично не містить виникаючих природним шляхом антитіл, не

здатних зв'язуватися з PD-L1. У наступному кращому втіленні антитіло за винаходом містить структурну зміну своєї амінокислотної послідовності щодо структури природного антитіла проти PD-L1, причому дана структурна зміна викликає зміну функціональності даного антитіла щодо функціональності в природного антитіла проти PD-L1, причому дана функціональність обрана із групи, яка складається з: (i) спорідненості зв'язування з PD-L1, (ii) здатності інгібувати зв'язування PD-L1 з PD-1 і (iii) здатності індукувати Fc-опосередковані ефекторні функції.

Термін "PD-L1" у даному винаході відноситься до ліганду-1 білка запрограмованої смерті. PD-L1 зустрічається в людей і інших видів, тому термін "PD-L1" не обмежується PD-L1 людини, якщо це не суперечить контексту. Послідовності PD-L1 людини, макаки й миші можна знайти через номер доступу в Genbank NP_054862.1, XP_005581836 і NP_068693, відповідно.

Термін "PD-L2" у даному винаході відноситься до ліганду-2 білка запрограмованої смерті людини (номер доступу в Genbank NP_079515).

Термін "PD-1" у даному винаході відноситься до білка-1 запрограмованої смерті людини, також відомому як CD279.

Термін "CD3" у даному винаході відноситься до білка-3 кластера диференціювання людини, яка входить до складу корецепторного Т-клітинного білкового комплексу й складається із чотирьох окремих ланцюгів. CD3 також зустрічається в інших видів, тому термін "CD3" не обмежується людським CD3, якщо це не суперечить контексту. У ссавців цей комплекс містить ланцюг CD3 γ (гама) (CD3 γ людини – UniProtKB/Swiss-Prot No. P09693, а CD3 γ макаки-крабоїда – UniProtKB/Swiss-Prot No. Q95LI7), ланцюг CD3 δ (дельта) (CD3 δ людини – UniProtKB/Swiss-Prot No. P04234, а CD3 δ макаки-крабоїда – UniProtKB/Swiss-Prot No. Q95LI8), два ланцюги CD3 ϵ (епсилон) (CD3 ϵ людини – UniProtKB/Swiss-Prot No. P07766 (SEQ ID NO:95); CD3 ϵ макаки-крабоїда – UniProtKB/Swiss-Prot No. Q95LI5; CD3 ϵ макаки-резус – UniProtKB/Swiss-Prot No. G7NCB9), і ланцюг CD3 ζ -ланцюг (дзета) (CD3 ζ людини – UniProtKB/Swiss-Prot No. P20963, CD3 ζ макаки-крабоїда – UniProtKB/Swiss-Prot No. Q09TK0). Ці ланцюги зв'язуються з молекулою, відомою як Т-клітинний рецептор (TCR), і генерують сигнал активації в Т-лімфоцитах. Молекули TCR і CD3 разом становлять комплекс TCR.

"Антитіло до PD-L1" або "антитіло проти PD-L1" є антитіло, як описано вище, яке специфічно зв'язується з антигеном PD-L1, зокрема, PD-L1 людини.

"Антитіло до CD3" або "антитіло проти CD3" є антитіло, як описано вище, яке специфічно зв'язується з антигеном CD3, зокрема, CD3 ϵ (епсилон) людини.

"Антитіло до CD3 $\times$ PD-L1", "антитіло проти CD3 $\times$ PD-L1", "антитіло до PD-L1 $\times$ CD3" або "антитіло проти PD-L1 $\times$ CD3" є біспецифічне антитіло, яке містить дві різні антигензв'язуючі ділянки, одна з яких специфічно зв'язується з антигеном PD-L1, а інша специфічно зв'язується з CD3.

Даним винаходом також передбачені антитіла, які містять функціональні варіанти областей V_L, областей V_H або одного або декількох CDR антитіл із прикладів. Функціональні варіанти V_L, V_H або CDR при використанні в контексті антитіл все-таки дозволяє антитілам зберігати щонайменше істотну частку (щонайменше 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або більше) спорідненості й/або специфічності/вибірковості "еталонного" або "вихідного" антитіла, а в деяких випадках таке антитіло може бути зв'язуватися з більшою спорідненістю, вибірковістю й/або специфічністю, ніж вихідне антитіло.

Такі функціональні варіанти зазвичай зберігають значну ідентичність послідовності з батьківським антитілом. Ступінь ідентичності між двома послідовностями є функцією кількості ідентичних позицій між цими послідовностями (тобто % гомології = число ідентичних позицій/загальне число позицій $\times$ 100), беручи до уваги кількість пробілів і довжину кожного пробілу, який необхідно ввести для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Ступінь ідентичності між двома нуклеотидними або амінокислотними послідовностями можна визначити, напр., за алгоритмом E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4, 11-17 (1988), який вбудований у програму ALIGN (версія 2.0), використовуючи таблицю ваг залишків PAM120, штраф за довжину пробілу 12 і штраф за пробіл 4. Крім того, ступінь ідентичності між двома амінокислотними послідовностями можна визначити за алгоритмом Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970).

Типові варіанти включають варіанти, які відрізняються від послідовностей областей V_H і/або V_L і/або CDR вихідного антитіла в основному консервативними замінами; приміром, 10, як от 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 або 1 заміна у варіанта є консервативними замінами амінокислотних залишків.

У контексті даного винаходу консервативні заміни можна визначити як заміни в межах класів амінокислот, наведених у наступній таблиці.

Класи амінокислотних залишків для консервативних замін

Кислі залишки	Asp (D), Glu (E)
Основні залишки	Lys (K), Arg (R), His (H)
Гідрофільні незаряджені залишки	Ser (S), Thr (T), Asn (N), Gln (Q)

Аліфатичні незаряджені залишки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I)
Неполярні незаряджені залишки	Cys (C), Met (M), Pro (P)
Ароматичні залишки	Phe (F), Tyr (Y), Trp (W)

У контексті даного винаходу для опису мутацій використовуються наступні позначення, якщо не зазначене інакше: i) заміна амінокислоти в даному положенні записується, напр., як K409R, що означає заміну лізину в положенні 409 на аргінін; i ii) для певних варіантів використовуються специфічні три- або однобуквені коди, включаючи коди Хаа і Х для позначення будь-яких амінокислотних залишків. Так, заміна лізину на аргінін у положенні 409 позначається як K409R, а заміна лізину на будь-який амінокислотний залишок у положенні 409 позначається як K409X. У випадку делеції лізину в положенні 409 вона позначається як K409*.

У контексті даного винаходу “конкуренція” означає значне зниження схильності певної молекули до зв'язування з певним партнером за зв'язуванням в присутності іншої молекули, яка зв'язується з партнером за зв'язуванням. “Конкуренція” може означати як “блокування”, так і “витиснення”, тобто конкуруюча молекула може бути або блокувальною, або молекулою, що витісняє. “Витиснення” означає такий стан, при якому друге антитіло може витіснити антиген з комплексу антиген-антитіло (який сформувався раніше), що приводить до обміну антигену (Abdiche et al., 2017 Plos One 12(1): e0169535). Конкуренцію за зв'язування з PD-L1 між двома або декількома антитілами проти PD-L1 можна визначити будь-яким придатним методом. В одному втіленні конкуренція визначається, як описано тут у Прикладі 9.

Аналогічно, у контексті даного винаходу “інгібування зв'язування PD-L1 з PD-1” означає будь-яке вимірне значне зниження зв'язування PD-L1 з PD-1 у присутності антитіла, здатного зв'язуватися з PD-L1. Як правило, інгібування означає зниження щонайменше на 10 %, як от щонайменше на 15 %, напр., щонайменше на 20 %, як от щонайменше на 40 % зв'язування між PD-L1 і PD-1, викликане присутністю антитіла проти PD-L1. інгібування зв'язування PD-L1 з PD-1 можна визначити будь-яким придатним методом. В одному втіленні інгібування визначається, як описано тут у Прикладі 10.

Термін “епітоп” позначає білкову детермінанту, здатну специфічно зв'язуватися з антитілом. Епітопи зазвичай складаються з поверхневих угруповань молекул типу бічних ланцюгів амінокислот або цукрів, і зазвичай мають специфічні характеристики тривимірної структури, а також специфічні характеристики заряду. Конформаційні й неконформаційні епітопи відрізняються тим, що зв'язування з першими, але не з останніми втрачається у присутності денатуруючих розчинників. Епітоп може містити амінокислотні залишки, які безпосередньо беруть участь у зв'язуванні, і інші амінокислотні залишки, які не беруть участь безпосередньо у зв'язуванні, типу амінокислотних залишків, які ефективно блокуються або закриваються специфічними антигензв'язуючими пептидами (іншими словами, цей амінокислотний залишок перебуває в зоні дії пептида, що специфічно зв'язується з антигеном).

Термін “химерне антитіло” у даному винаході відноситься до таких антитіл, у яких варіабельна область походить із іншого виду, ніж людей (напр., від гризунів), а константна область походить із іншого виду типу людини. Химерні моноклональні антитіла для терапевтичного застосування розробляються для зниження імуногенності антитіл. Терміни “варіабельна область” або “варіабельний домен” у контексті химерних антитіл відносяться до області, яка включає ділянки CDR і каркасні ділянки як важких, так і легких ланцюгів імуноглобуліну. Химерні антитіла можуть бути отримані стандартними методами ДНК, як описано в Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15. Химерні антитіла можуть бути генетично або ензиматично інженерними рекомбінантними антитілами. Фахівцеві в даній області відомо, як одержують химерні антитіла, тому одержання химерних антитіл за даним винаходом може проводитися й іншими способами, ніж описані тут.

Термін “гуманізоване антитіло” у даному винаході відноситься до генно-інженерних не людських антитіл, які містять константні домени людського антитіла й варіабельні домени не від людини, модифіковані так, щоб у них був високий рівень гомології послідовності з варіабельними доменами людини. Це досягається шляхом пересадження шести визначальних комплементарних ділянок (CDR) антитіла не від людини, які разом утворюють антигензв'язуючий сайт, на гомологічну акцепторну каркасну область (FR) людини (див. WO 92/22653 і EP 0629240). Для повного відновлення спорідненості й специфічності зв'язування вихідного антитіла може знадобитися заміна каркасних залишків людини на каркасні залишки вихідного антитіла (тобто антитіла не від людини) (зворотні мутації). Моделювання структурної гомології може допомогти ідентифікувати амінокислотні залишки в каркасних ділянках, які важливі для властивостей зв'язування антитіла. Таким чином, гуманізоване антитіло може містити послідовності CDR не від людини, в основному людські каркасні ділянки, що необов'язково містять одну або кілька зворотних амінокислотних мутацій в амінокислотній послідовності не від людини, і повністю людські константні області. Необов'язково проводяться

додаткові модифікації амінокислот, які необов'язково є зворотними мутаціями, щоб одержати гуманізовані антитіла із кращими характеристиками типу спорідненості й біохімічних властивостей.

Термін “людське антитіло” у даному винаході відноситься до антитіл, у яких варіабельні й константні області походять із гаметних послідовностей імуноглобуліну людини. Людські антитіла можуть містити в собі амінокислотні залишки, не кодовані гаметними послідовностями імуноглобуліну людини (напр., мутації, введені при випадковому або сайт-специфічному мутагенезі *in vitro* або при соматичних мутаціях *in vivo*). Однак термін “людське антитіло” у даному винаході не повинен охоплювати антитіла, у яких на каркасні послідовності людини були пересажені послідовності CDR, які походять із зародкової лінії іншого виду ссавців типу миші. Людські моноклональні антитіла за винаходом можуть бути отримані різними методами, включаючи стандартні методи моноклональних антитіл, напр., стандартним методом гібридизації соматичних клітин Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975). Хоча кращі методики гібридизації соматичних клітин, але в принципі можуть застосовуватися й інші методи одержання моноклональних антитіл, напр., вірусна або онкогенна трансформація В-лімфоцитів або методи фагового дисплея з використанням бібліотек генів антитіл людини. Придатною системою на тварин для одержання гібридом, секретуючих людські моноклональні антитіла, є система на мишах. Одержання гібридами в мишей – дуже добре відпрацьована процедура. Методики імунізації й методи виділення імунізованих спленоцитів для злиття відомі в даній області. Партнери для злиття (напр., клітини мієломи миші) і процедури злиття також відомі. Так, людські моноклональні антитіла можуть бути отримані, напр., з використанням трансгенних або трансхромосомних мишей або пацюків, що несуть частини імунної системи людини, а не миші або пацюки. Відповідно, в одному втіленні людські антитіла одержують із трансгенних тварин типу мишей або пацюків, що несуть гаметні послідовності імуноглобуліну людини замість послідовностей імуноглобуліну тварин. У таких втіленнях антитіло походить із гаметних послідовностей імуноглобуліну людини, уведених тварині, але кінцева послідовність антитіла є результатом того, що дані гаметні послідовності імуноглобуліну людини зазнають додаткових модифікацій за допомогою соматичних гіпермутацій і дозрівання спорідненості під дією ендогенних механізмів антитіл у тварин, напр., див. Mendez et al., 1997 Nat Genet. 15(2):146-56. Термін “відновлювальні умови” або “відновлювальне середовище” відноситься до таких умов або середовищ, у яких субстрат, у цьому випадку залишок цистеїну в шарнірній області антитіла, з більшою ймовірністю стане відновленим, ніж окисненим.

Термін “рекомбінантна клітина-хазяїн” (або просто “клітина-хазяїн”) у даному винаході служить для позначення клітин, у які був уведений експресуючий вектор, напр., експресуючий вектор, що кодує антитіло за винаходом. Рекомбінантні клітини хазяїна включають, приміром, трансфектоми типу клітин CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 або NS0 і лімфоцитарні клітини.

Термін “лікування” відноситься до введення ефективної кількості терапевтично активного антитіла за даним винаходом з метою пом'якшення, ослаблення, припинення або усунення (лікування) симптомів або захворювань.

Термін “ефективна кількість” або “терапевтично ефективна кількість” означає таку кількість, яка при дозуваннях і протягом необхідного часу ефективно дає необхідний терапевтичний результат. Терапевтично ефективна кількість антитіла може варіюватися залежно від таких факторів, як захворювання, вік, стать й вага індивіда й здатність антитіла викликати необхідну відповідь в індивіда. Терапевтично ефективна кількість також означає таку кількість, при якій будь-які токсичні або шкідливі ефекти антитіла або частини антитіла переважаються терапевтично корисними ефектами.

Термін “антиідіотипічне антитіло” відноситься до таких антитіл, які розпізнають унікальні детермінанти, зазвичай пов'язані з антигензв'язуючим сайтом антитіл.

Інші аспекти й втілення винаходу

Як описано вище, у першому аспекті винаходу передбачені біспецифічні антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε (епсилон) людини, причому антитіло інгібує зв'язування PD-L1 людини з PD-1 людини. Таким чином, такі біспецифічні антитіла містять дві різні антигензв'язуючі ділянки, одна з яких має специфічність зв'язування для PD-L1, а інша – специфічність зв'язування для CD3.

В одному втіленні антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, причому послідовність CDR3 V_H обрана із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 і SEQ ID NO: 21.

В іншому втіленні антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 2, 3 і 4, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 6, послідовність KAS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 7, відповідно, або

сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_H щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1, FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_H, а послідовності CDR V_H не мутовані, при цьому відповідні сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_L щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1, FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_L, а послідовності CDR V_L не мутовані. У контексті цього втілення ступінь ідентичності означає відсоток ідентичності, отриманий при додаванні разом усіх каркасних послідовностей у вигляді однієї послідовної послідовності без проміжних послідовностей CDR.

У кращому втіленні антитіл за винаходом антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

- (i) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 5, або
- (ii) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 15, або
- (iii) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22.

Різні антитіла, здатні зв'язуватися з тим самим антигеном типу PD-L1, можуть зв'язувати різні ділянки даного антигену. У деяких випадках зв'язування одного антитіла до PD-L1 з PD-L1 все-таки може дозволяти зв'язування іншого антитіла до PD-L1 з PD-L1. Однак в інших випадках зв'язування одного антитіла до PD-L1 з PD-L1 може конкурувати (блокувати або витіснити) зв'язування іншого антитіла до PD-L1 з PD-L1. Таким чином, експерименти по конкуруванню подають інформацію про те, де на цільовому антигені зв'язується антитіло, що може вплинути на функціональні ефекти зв'язування антитіла.

В одному втіленні біспецифічні антитіла за винаходом:

(i) конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 15, але не конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22, або

(ii) конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22, але не конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 15.

У наступному втіленні дані антитіла конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 5.

Антитіла, які конкурують за зв'язування цільового антигену, можуть зв'язуватися з різними епітопами на антигені, причому епітопи настільки близькі один до одного, що зв'язування першого антитіла з одним епітопом запобігає зв'язуванню другого антитіла з іншим епітопом. Однак в інших ситуаціях два різні антитіла можуть зв'язуватися з тим самим епітопом на антигені.

Так, в одному втіленні антитіла за винаходом:

(i) здатні зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіла, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 5, або

(ii) здатні зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіла, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 15, або

(iii) здатні зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіла, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22.

В іншому втіленні зв'язування біспецифічних антитіл з PD-L1 людини не витісняється антитілом, яке містить послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 53, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 57.

У наступному втіленні зв'язування біспецифічних антитіл з PD-L1 людини блокується антитілом, яке містить послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22. При цьому "блокування" означає, що антитіло, яке містить послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22, конкурує з біспецифічним антитілом, але не витісняє його.

Як описано вище, вищезгадані біспецифічні антитіла за першим аспектом винаходу містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини.

В одному втіленні антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε людини, містить CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області (V_H) важкого ланцюга, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно.

Шість послідовностей CDR, як визначено вище, походять із мишачого антитіла, позначеного SP34. Були отримані гуманізовані версії цього антитіла, і ці гуманізовані антитіла позначені тут як huCD3 і більш докладно розкриті в WO 2015/001085 (Genmab).

У кращому втіленні біспецифічних антитіл за винаходом дані біспецифічні антитіла містять:

(i) антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, яка включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 2, 3 і 4, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 6, послідовність KAS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 7, відповідно, і антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, яка включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(ii) антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, яка включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 9, 10 і 11, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 16, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 17, відповідно, і антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, що включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(iii) антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, яка включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 19, 20 і 21, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 23, послідовність DDN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 24, відповідно, і антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, яка включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно.

В одному втіленні біспецифічні антитіла містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, яка включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), причому дана послідовність V_H щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, наведеній в SEQ ID NO: 25.

В одному втіленні біспецифічні антитіла містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, яка включає варіабельну область легкого ланцюга (V_L), причому дана послідовність V_L щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, наведеній в SEQ ID NO: 29.

У кращому втіленні антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε людини, включає послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 25, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29.

В одному аспекті біспецифічні антитіла за винаходом можуть бути модифіковані для зменшення спорідненості антитіл. Це може бути вигідно в деяких умовах і приводить до підвищення ефективності. Зокрема, низька спорідненість зв'язування з CD3ε людини може вплинути на рухливість Т-клітин у кровотоці й на місці пухлини, що веде до кращої взаємодії Т-клітин з пухлинними клітинами, див. Mølhøj et al., *Molecular Immunology* 44 (2007).

Відповідно, в іншому втіленні біспецифічних антитіл за винаходом, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, дані біспецифічні антитіла:

(i) мають більш низьку спорідненість зв'язування з CD3ε людини в порівнянні з антитілом, яке містить антигензв'язуючу ділянку, яка включає послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 25, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, причому переважно дана спорідненість щонайменше в 2 рази нижче, напр., щонайменше в 5 разів нижче, як от щонайменше в 10 разів нижче, напр., щонайменше в 25 разів нижче, напр., щонайменше в 50 разів нижче, і

(ii) здатні опосередковувати залежну від концентрації цитотоксичність для клітин MDA-MB-231, клітин PC-3 і/або клітин HELA при використанні PBMC або очищених Т-клітин у якості ефektorних клітин.

Аналогічно, в одному втіленні антитіла за винаходом містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, причому дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε людини:

(i) має більш низьку спорідненість зв'язування з CD3ε людини у порівнянні з антитілом, яке містить антигензв'язуючу ділянку, яка включає послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 25, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, причому переважно дана спорідненість щонайменше в 2 рази нижче, напр., щонайменше в 5 разів нижче, як от щонайменше в 10 разів нижче, напр., щонайменше в 25 разів нижче, напр., щонайменше в 50 разів нижче, і

(ii) здатна опосередковувати залежну від концентрації цитотоксичність для клітин MDA-MB-231, клітин PC-3 і/або клітин HELA при використанні PBMC або очищених Т-клітин у якості ефektorних клітин.

Спорідненість до CD3ε людини може бути виміряна, напр., октетним методом визначення спорідненості зв'язування, як описано в Прикладі 7 з WO 2017/009442.

Здатність антитіл опосередковувати цитотоксичність в PBMCs або очищених Т-клітин можна визначити, напр., як описано тут у Прикладі 11, тобто висівають клітини MDA-MB-231, PC-3 або клітини HELA і культивують у лунках. Додають пухлинні клітини, PBMCs і серійні розведення антитіл, а після інкубації проводять фарбування пухлинних клітин на життєздатність.

При цьому huCD3-H1L1 означає антитіло проти CD3 з послідовностями V_H і V_L, наведеними в SEQ ID NO: 25 і 29. IgG1-huCD3-FEAL означає його варіант, який містить заміни L234F, L235E, D265A і F405L (також див. тут в іншому місці).

Приклади варіантів IgG1-huCD3-FEAL зі зниженою спорідненістю до CD3ε людини були описані в WO 2017/009442 (Genmab). У прикладі 7 (табл. 6) з WO 2017/009442 наведена спорідненість IgG1-huCD3-FEAL і семи його варіантів при вимірюванні октетним методом визначення спорідненості зв'язування:

Антитіло	K _D (нМ)	SDEV	SEM	CV
IgG1-huCD3-FEAL	15	6	3	37
IgG1-huCD3-Y114V-FEAL	29	8	4	26
IgG1-huCD3-T31P-FEAL	42	9	4	21
IgG1-huCD3-Y114M-FEAL	42	14	8	33
IgG1-huCD3-Y114R-FEAL	46	10	6	22
IgG1-huCD3-S110A-FEAL	72	15	6	21
IgG1-huCD3-T31M-FEAL	99	23	13	23
IgG1-huCD3-H101G-FEAL	683	169	97	25

В одному втіленні біспецифічних антитіл за винаходом антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε людини, включає:

(i) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 99, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(ii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 100, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(iii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 101, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(iv) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 102, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(v) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 103, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(vi) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 104, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(vii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 105, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно.

В іншому втіленні антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε людини, включає:

(i) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 39, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 29, або

(ii) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 40, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 29, або

(iii) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 41, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 29, або

- (iv) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 42, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, або
- (v) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 43, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, або
- (vi) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 44, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, або
- (vii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 45, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29.

В інших кращих втіленнях біспецифічних антитіл за винаходом кожна з антигензв'язуючих ділянок включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H) і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), причому кожна з даних варіабельних областей містить три послідовності CDR: CDR1, CDR2 і CDR3, відповідно, і чотири каркасні послідовності: FR1, FR2, FR3 і FR4, відповідно.

В інших кращих втіленнях біспецифічних антитіл за винаходом антитіло містить дві константні області важкого ланцюга (C_H) і дві константні області легкого ланцюга (C_L).

В одному кращому втіленні біспецифічне антитіло містить перший і другий важкий ланцюг, причому кожен з даних першого й другого важких ланцюгів включає щонайменше шарнірну ділянку й ділянки CH2 і CH3, причому в першому важкому ланцюзі була замінена щонайменше одна з амінокислот у положенні, відповідному до положення, обраного із групи, яка складається з T366, L368, K370, D399, F405, Y407 і K409 (за нумерацією EU), і в другому важкому ланцюзі була замінена щонайменше одна з амінокислот у положенні, відповідному до положення, обраного із групи, яка складається з T366, L368, K370, D399, F405, Y407 і K409 (за нумерацією EU), при цьому в даних першому й другому важких ланцюгах заміни були не в однакових положеннях.

Найбільше переважно (i) амінокислота в положенні, що відповідає F405 (за нумерацією EU), представлена L у даному першому важкому ланцюзі, а амінокислота в положенні, що відповідає K409 (за нумерацією EU), представлена R у даному другому важкому ланцюзі, або ж (ii) амінокислота в положенні, що відповідає K409 (за нумерацією EU), представлена R у даному першому важкому ланцюзі, а амінокислота в положенні, що відповідає F405 (за нумерацією EU), представлена L у даному другому важкому ланцюзі.

У наступному особливо кращому втіленні антитілом є біспецифічне антитіло CD3×PD-L1, яке містить перший і другий важкий ланцюг, причому положення, відповідні до положень L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, і в першому важкому ланцюзі, і в другому важкому ланцюзі представлені F і E, відповідно, при цьому (i) положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU в першому важкому ланцюзі, представлене L, а положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU у другому важкому ланцюзі, представлене R, або ж (ii) положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU у першому важкому ланцюзі, представлене R, а положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU у другому важкому ланцюзі, представлене L.

У наступному особливо кращому втіленні антитілом є біспецифічне антитіло CD3×PD-L1, яке містить перший і другий важкий ланцюг, причому положення, відповідні до положень L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, і в першому важкому ланцюзі, і в другому важкому ланцюзі представлені F, E і A, відповідно, при цьому (i) положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU у першому важкому ланцюзі, представлене L, а положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU у другому важкому ланцюзі, представлене R, або ж (ii) положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU у першому важкому ланцюзі, представлене R, а положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU у другому важкому ланцюзі, представлене L.

Нові класи антитіл до PD-L1

У наступному аспекті винаходу передбачені нові антитіла проти PD-L1, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини. Антитіла за цим аспектом винаходу можуть бути моноспецифічними або мультиспецифічними, а якщо вони мультиспецифічні, то дані мультиспецифічні антитіла можуть містити або не містити антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини.

В одному втіленні винаходу передбачені антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, має ознаки, зазначені тут вище.

В одному втіленні винаходу передбачені антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому зв'язування антитіл з мутантним PD-L1, у якому один або кілька амінокислотних залишків у положеннях, відповідних до положень 113 (R113), 123 (Y123) і 125 (R125) в SEQ ID NO: 94, замінені на аланін, знижується в порівнянні зі зв'язуванням з PD-L1 дикого типу, які мають амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 94; при цьому зниження зв'язування визначається як кратність зміни у зв'язуванні даного антитіла, яка менше середньої кратності змін у зв'язуванні по всіх аланінових мутантах – $1,5 \times SD$, де SD означає стандартне відхилення за всіма розрахованими змінами для зв'язування антитіла з мутантним PD-L1, а кратність змін у зв'язуванні розраховується, як описано в Прикладі 13.

Дані антитіла можуть зв'язуватися з епітопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причому даний епітоп містить амінокислотний залишок у положенні 113 (R113), амінокислотний залишок у положенні 123 (Y123) і/або амінокислотний залишок у положенні 125 (R125) SEQ ID NO: 94.

В одному втіленні винаходу передбачені антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому зв'язування антитіл з мутантним PD-L1, у якому один або кілька амінокислотних залишків у положеннях, відповідних до положень 19 (F19), 42 (F42), 45 (E45), 46 (K46), 94 (L94) і 116 (I116) в SEQ ID NO: 94, замінені на аланін, знижується у порівнянні зі зв'язуванням з PD-L1 дикого типу, які мають амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 94; при цьому зниження зв'язування визначається як кратність зміни у зв'язуванні даного антитіла, яка менше середньої кратності змін у зв'язуванні по всіх аланінових мутантах – $1,5 \times SD$, де SD означає стандартне відхилення за всіма розрахованими змінами для зв'язування антитіла з мутантним PD-L1, а кратність змін у зв'язуванні розраховується, як описано в Прикладі 13.

Ці антитіла можуть зв'язуватися з епітопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причому даний епітоп містить один або декілька амінокислотних залишків, обраних із групи, яка складається з амінокислотного залишку в положенні 45 (E45), амінокислотного залишку в положенні 46 (K46) і/або амінокислотного залишку в положенні 94 (L94) SEQ ID NO: 94.

В одному втіленні винаходу передбачені антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому зв'язування антитіл з мутантним PD-L1, у якому один або декілька амінокислотних залишків у положеннях, відповідних до положень 58 (E58) і 113 (R113) в SEQ ID NO: 94, замінені на аланін, знижується у порівнянні зі зв'язуванням з PD-L1 дикого типу, які мають амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 94; при цьому зниження зв'язування визначається як кратність зміни у зв'язуванні даного антитіла, яка менше середньої кратності змін у зв'язуванні по всіх аланінових мутантах – $1,5 \times SD$, де SD означає стандартне відхилення за всіма розрахованими змінами для зв'язування антитіла з мутантним PD-L1, а кратність змін у зв'язуванні розраховується, як описано в Прикладі 13.

Ці антитіла можуть зв'язуватися з епітопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причому даний епітоп містить амінокислотний залишок у положенні 58 (E58) і/або амінокислотний залишок у положенні 113 (R113) SEQ ID NO: 94.

У наступних втіленнях антитіла за винаходом здатні викликати дозозалежний лізис епітеліальних клітин аденокарциноми типу MDA-MB-231 за допомогою антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC).

В інших втіленнях антитіла за винаходом здатні зменшувати кількість клітин у культурі даних епітеліальних клітин щонайменше на 5 %, як от щонайменше на 6 %, 7 %, 8 %, 9 % або щонайменше на 10 % у результаті лізису клітин.

ADCC можна визначати *in vitro* за вивільненням ^{51}Cr типу методики, наведеної в прикладі 14. Зокрема, ADCC визначають *in vitro* шляхом інкубації зазначених епітеліальних клітин з композицією, яка містить антитіло й ефекторні клітини типу мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC), протягом 4 годин при 37 °C, 5 % CO₂, при цьому вміст антитіл у композиції перебуває в межах 0,1-1 мкг/мл, а співвідношення ефекторних клітин до епітеліальних клітин становить 100:1.

Лізис епітеліальних клітин можна визначати *in vitro* методом аналізу репортера – люциферази в якості показника ADCC типу люмінесцентного біоаналізу репортера ADCC, викладеного в прикладі 14.

Зокрема, ADCC можна визначати *in vitro* шляхом:

(i) контактування культури зазначених епітеліальних клітин з композицією, яка містить антитіло й Т-клітини Jurkat людини, стабільно експресуючі FcγRIIIa (CD16) і люциферазу світлячка (ефекторні клітини), при співвідношенні ефекторні клітини:епітеліальні клітини 1:1,

(ii) доведення культури епітеліальних клітин і ефекторних клітин до кімнатної температури протягом 15 хвилин,

(iii) інкубування культури епітеліальних клітин і ефекторних клітин із субстратом люциферази,

(iv) визначення продукції люциферази в даній культурі клітин;

при цьому вміст антитіл у композиції перебуває в межах 0,5-250 нг/мл, а співвідношення ефекторних клітин до епітеліальних клітин становить 1:1.

ADCC даних епітеліальних клітин можна визначити методом репортерного аналізу люциферази типу репортерного аналізу за п. 23 або 24, при цьому ADCC, яка спостерігається після інкубації культури епітеліальних клітин з досліджуваною композицією, що містить дане антитіло, щонайменше в 1,5 рази більше тієї ADCC, яка спостерігається після інкубації культури епітеліальних клітин з композицією, яка містить контрольне антитіло; ADCC визначається у відносних одиницях люмінесценції (RLU), причому концентрація антитіл у досліджуваній композиції й у композиції, яка містить контрольне антитіло, однакова й перебуває в межах від 20 до 250 нг/мл, а контрольне антитіло вибирають із:

а) антитіла, яке містить послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 74, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 78; і

b) антитіла, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 81, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 85.

В одному втіленні передбачені антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, причому послідовність CDR3 V_H обрана із групи, яка складається з послідовностей, наведених SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 і SEQ ID NO: 21.

В іншому втіленні передбачені антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 2, 3 і 4, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 6, послідовність KAS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 7, відповідно, або

(ii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 9, 10 і 11, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 16, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 17, відповідно, або

(iii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 19, 20 і 21, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 23, послідовність DDN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 24, відповідно.

В іншому втіленні передбачені антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , обраній із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 18.

В іншому втіленні передбачені антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , обраній із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 22.

У наступному втіленні передбачені антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведених в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведених в SEQ ID NO: 5, або

(ii) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведених в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведених в SEQ ID NO: 15, або

(iii) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведених в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведених в SEQ ID NO: 22.

У наступному втіленні передбачені антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає послідовності V_H і V_L , кожна з яких містить три послідовності CDR: CDR1, CDR2 і CDR3, відповідно, і чотири каркасні послідовності: FR1, FR2, FR3 і FR4, відповідно, причому відповідні сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_H щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1, FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_H , а послідовності CDR V_H не мутовані, при цьому відповідні сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_L щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1, FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_L , а послідовності CDR V_L не мутовані.

(iii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 54, 55 і 56, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 58, послідовність RDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 59, відповідно, або

(iv) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 61, 62 і 63, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 65, послідовність DDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 66, відповідно, або

(v) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 107, 108 і 109, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 111, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 113, відповідно, або

(vi) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 68, 69 і 70, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 72, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 73, відповідно.

У наступному втіленні антитіла включають:

(i) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 32, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 36, або

(ii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 46, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 50, або

(iii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 53, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 57, або

(iv) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 60, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 64, або

(v) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 106, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 110, або

(vi) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 67, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 71.

В одному втіленні антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, є моновалентними.

В іншому втіленні антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, є моноспецифічними антитілами, які містять дві або декілька ідентичні антигензв'язуючі ділянки.

У наступному втіленні антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, є бівалентними антитілами, які містять дві антигензв'язуючі ділянки, здатні зв'язуватися з PD-L1 людини, при цьому дані дві антигензв'язуючі ділянки мають ідентичні послідовності варіабельної області.

В іншому втіленні антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, є бівалентними біспецифічними антитілами, які на додаток до першої антигензв'язуючої ділянки, здатної зв'язуватися з PD-L1 людини, містять другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном, причому другим антигеном є CD3ε людини.

В іншому втіленні антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, є бівалентними біспецифічними антитілами, які на додаток до першої антигензв'язуючої ділянки, здатної зв'язуватися з PD-L1 людини, містять другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому другим антигеном не є CD3ε людини.

У наступному аспекті винаходу передбачені мультиспецифічні антитіла, які містять першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому другий антиген необов'язково не представлений CD3ε людини, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, причому послідовність CDR3 V_H обрана із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 63 і SEQ ID NO: 70. При цьому "інший епітоп" означає, що епітоп, з яким зв'язується друга антигензв'язуюча ділянка, відрізняється від того епітопа, з яким зв'язується перша антигензв'язуюча ділянка.

В одному втіленні таких мультиспецифічних антитіл дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 2, 3 і 4, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 6, послідовність KAS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 7, відповідно, або

(ii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 9, 10 і 11, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить

CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 16, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 17, відповідно, або

(iii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 19, 20 і 21, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 23, послідовність DDN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 24, відповідно, або

(iv) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 33, 34 і 35, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 37, послідовність KAS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 38, відповідно, або

(v) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 47, 48 і 49, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 51, послідовність DVI і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 52, відповідно, або

(vi) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 54, 55 і 56, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 58, послідовність RDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 59, відповідно, або

(vii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 61, 62 і 63, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 65, послідовність DDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 66, відповідно, або

(viii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 68, 69 і 70, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 72, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 73, відповідно.

В іншому втіленні таких мультиспецифічних антитіл дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , обраній із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 18.

В іншому втіленні таких мультиспецифічних антитіл дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , обраній із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 22.

В іншому втіленні таких мультиспецифічних антитіл дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведених в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведених в SEQ ID NO: 5, або

(ii) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведених в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведених в SEQ ID NO: 15, або

(iii) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведених в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведених в SEQ ID NO: 22.

В іншому втіленні таких мультиспецифічних антитіл кожна з послідовностей V_H і V_L містить три послідовності CDR: CDR1, CDR2 і CDR3, відповідно, і чотири каркасні послідовності: FR1, FR2, FR3 і FR4, відповідно, причому відповідні сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_H щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1, FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_H , а послідовності CDR V_H не мутовані, при цьому відповідні сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_L щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю

відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1, FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_L, а послідовності CDR V_L не мутовані.

В іншому втіленні таких мультиспецифічних антитіл дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

- (i) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 5, або
- (ii) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 15, або
- (iii) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22, або
- (iv) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 32, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 36, або
- (v) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 46, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 50, або
- (vi) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 53, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 57, або
- (v) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 106, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 110, або
- (vii) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 60, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 64, або
- (viii) послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 67, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 71.

У наступному аспекті винаходу передбачені мультиспецифічні антитіла, які містять першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому другий антиген необов'язково не представлений CD3ε людини, при цьому дані антитіла:

(i) конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 15, але не конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22, або

(ii) конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22, але не конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 15.

В одному втіленні таких мультиспецифічних антитіл дані антитіла конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 5.

У наступному аспекті винаходу передбачені мультиспецифічні антитіла, які містять першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому зв'язування таких антитіл з PD-L1 людини не витісняється антитілом, яке містить послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 53, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 57.

В одному з таких втілень антитіла інгібують зв'язування PD-L1 людини з PD-1 людини.

В іншому втіленні антитіла конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22.

В іншому втіленні зв'язування таких антитіл з PD-L1 людини блокується антитілом, яке містить послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22. При цьому "блокування" означає, що антитіло, яке містить послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22, конкурує з біспецифічним антитілом, але не витісняє його.

У наступному аспекті винаходу передбачені мультиспецифічні антитіла, які містять першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому другий антиген необов'язково не представлений CD3ε людини, при цьому перша антигензв'язуюча ділянка:

(i) здатна зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 5, або

(ii) здатна зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 15, або

(iii) здатна зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H, наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L, наведену в SEQ ID NO: 22.

У наступному аспекті винаходу передбачені бівалентні біспецифічні антитіла, які містять першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому другий антиген необов'язково не представлений CD3ε людини, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, причому послідовність CDR3 V_H обрана із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 і SEQ ID NO: 21.

В одному втіленні таких бівалентних біспецифічних антитіл дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 2, 3 і 4, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 6, послідовність KAS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 7, відповідно, або

(ii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 9, 10 і 11, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 16, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 17, відповідно, або

(iii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 19, 20 і 21, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 23, послідовність DDN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 24, відповідно.

В іншому втіленні таких бівалентних біспецифічних антитіл дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , обраній із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 18.

В іншому втіленні таких бівалентних біспецифічних антитіл дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , обраній із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 22.

В іншому втіленні таких бівалентних біспецифічних антитіл дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведених в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведених в SEQ ID NO: 5, або

(ii) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведених в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведених в SEQ ID NO: 15, або

(iii) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведених в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведених в SEQ ID NO: 22.

В іншому втіленні таких бівалентних біспецифічних антитіл кожна з послідовностей V_H і V_L містить три послідовності CDR: CDR1, CDR2 і CDR3, відповідно, і чотири каркасні послідовності: FR1, FR2, FR3 і FR4, відповідно, причому відповідні сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_H щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1, FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_H , а послідовності CDR V_H не мутовані, при цьому відповідні сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_L щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1, FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_L , а послідовності CDR V_L не мутовані.

В іншому втіленні таких бівалентних біспецифічних антитіл дана антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 5, або

(ii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15, або

(iii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22.

У наступному аспекті винаходу передбачені бівалентні біспецифічні антитіла, які містять першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому другий антиген необов'язково не представлений CD3ε людини, при цьому дані антитіла:

(i) конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15, але не конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22, або

(ii) конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22, але не конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15.

В одному втіленні таких бівалентних біспецифічних антитіл дані антитіла конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілами, які містять послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 5.

У наступному аспекті винаходу передбачені бівалентні біспецифічні антитіла, які містять першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому зв'язування таких антитіл з PD-L1 людини не витісняється антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 53, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 57.

В одному з таких втілень антитіла інгібують зв'язування PD-L1 людини з PD-1 людини.

В іншому втіленні антитіла конкурують за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22.

В іншому втіленні зв'язування таких антитіл з PD-L1 людини блокується антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22. При цьому "блокування" означає, що антитіло, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22, конкурує з біспецифічним антитілом, але не витісняє його.

У наступному аспекті винаходу передбачені бівалентні біспецифічні антитіла, які містять першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому другий антиген необов'язково не представлений CD3ε людини, при цьому перша антигензв'язуюча ділянка:

(i) здатна зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 5, або

(ii) здатна зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15, або

(iii) здатна зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22.

Додаткові втілення антитіл за винаходом

В одному втіленні антитіла за винаходом зв'язуються з PD-L1 людини зі значенням K_D 10^{-8} М або менше, як от 10^{-9} М або менше, напр., 10^{-10} М або менше при такому визначенні, як описано тут у Прикладі 8.

В іншому втіленні антитіла за винаходом опосередковують залежну від концентрації цитотоксичність для клітин MDA-MB-231, клітин PC-3 і/або клітин HELA при використанні очищених Т-клітин у якості ефекторних клітин при такому аналізі, як описано тут у Прикладі 11.

У кращому втіленні антитіла за винаходом не зв'язуються з PD-L2 людини.

Формати антитіл

Як описано вище, у даній області були описані різні формати антитіл. Антитіла за винаходом в принципі можуть бути будь-якого ізотипу. Вибір ізотипу зазвичай визначається необхідними Fc-опосередкованими ефекторними функціями типу індукції ADCC або потребою в антитілах, позбавлених Fc-опосередкованої ефекторної функції ("інертних" антитілах). Типовими ізотипами є IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Можна використовувати будь-які з константних областей легкого ланцюга людини, каппа або лямбда. Ефекторна функція антитіл за даним винаходом може бути змінена шляхом перемикання ізотипа, напр., на антитіла IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE або IgM, для різних терапевтичних застосувань. В одному втіленні обидва важкі ланцюги антитіл за даним винаходом мають ізотип IgG1, наприклад IgG1,к. Необов'язково важкий ланцюг може бути модифікований в шарнірній й/або ділянці CH3, як описано тут в іншому місці.

Переважаю кожну антигензв'язуючу ділянку містить варіабельну область важкого ланцюга (V_H) і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), причому кожна з даних варіабельних областей містить три послідовності CDR: CDR1, CDR2 і CDR3, відповідно, і чотири каркасні послідовності: FR1, FR2, FR3 і FR4, відповідно. Крім того, переважно, антитіло містить дві константні області важкого ланцюга (CH) і дві константні області легкого ланцюга (CL).

В одному втіленні антитіла є повнорозмірними антитілами типу повнорозмірних антитіл IgG1. В іншому втіленні антитіла є повнорозмірними антитілами IgG4, переважно зі стабілізованою шарнірною областю. У даній області описані модифікації, які стабілізують шарнірну область IgG4, як от мутація S228P у глибині шарнірі, напр., див. Labrijn et al., 2009 Nat Biotechnol. 27(8): 767-71.

В інших втіленнях антитіла за винаходом є фрагментами антитіл типу Fab'- або Fab-фрагментів, моновалентними фрагментами, які складаються із доменів V_L , V_H , C_L і C_H1 , моновалентними антитілами, описаними в WO 2007/059782 (Genmab), фрагментами $F(ab')_2$, Fd-фрагментами, FV-

фрагментами, фрагментами dAb, верблужими або нанотілами або виділеними ділянками, які визначають комплементарність (CDR).

Антитіла за винаходом переважно є людськими, гуманізованими або химерними. У тих втіленнях, у яких антитіла представлені біспецифічними антитілами, обидві половинки молекули можуть бути людськими, гуманізованими або химерними, або ж половинки молекули можуть відрізнятися за природою відносно походження послідовності.

Наприклад, в одному втіленні біспецифічне антитіло містить дві половинки молекули, кожна з яких містить антигензв'язуючу ділянку, причому:

(i) половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, є химерною, і/або

(ii) половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε (епсилон) людини, якщо вона присутня, є химерною.

Наприклад, в іншому втіленні біспецифічне антитіло містить дві половинки молекули, кожна з яких містить антигензв'язуючу ділянку, причому:

(i) половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, є гуманізованою, і/або

(ii) половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε (епсилон) людини, якщо вона присутня, є гуманізованою.

Наприклад, в іншому втіленні біспецифічне антитіло містить дві половинки молекули, кожна з яких містить антигензв'язуючу ділянку, причому:

(i) половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, є людською, і/або

(ii) половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε (епсилон) людини, якщо вона присутня, є людською.

Так, наприклад, в одному втіленні антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, є гуманізованою, і антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε (епсилон) людини, якщо вона присутня, є гуманізованою.

В іншому втіленні антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, є людською, і антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε (епсилон) людини, якщо вона присутня, є людською.

У наступному втіленні антитіло є біспецифічним антитілом, яке містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε (епсилон) людини, причому половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, є людською, гуманізованою або химерною, а половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε (епсилон) людини, є гуманізованою.

Переважно половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, є людською, а половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε (епсилон) людини, є гуманізованою.

Формати біспецифічних антитіл

У даній області відомо багато різних форматів і застосувань біспецифічних антитіл, які розглянуті в Kontermann, Drug Discov Today, 2015 Jul, 20(7): 838-47; Mabs, 2012 Mar-Apr, 4(2):182-97.

Біспецифічні антитіла за даним винаходом не обмежуються яким-небудь конкретним біспецифічним форматом або способом їх одержання.

Приклади молекул біспецифічних антитіл, які можна використовувати в даному винаході, включають: (i) єдине антитіло, яке має два плеча, що містять різні антигензв'язуючі ділянки; (ii) одноланцюгове антитіло, яке має специфічність до двох різних епітопів, напр., у вигляді двох scFv, зв'язаних у тандемі через додатковий пептидний лінкер; (iii) антитіло із двома варіабельними доменами (DVD-Ig), де кожний легкий ланцюг і важкий ланцюг містить два варіабельних домена в тандемі через короткий пептидний лінкер (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVd-igTM) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (iv) хімічно зв'язаний біспецифічний (Fab') 2-фрагмент; (v) Tandab, який є злиттям двох одноланцюгових антитіл, що приводить до тетравалентного біспецифічного антитіла із двома сайтами зв'язування для кожного із цільових антигенів; (vi) Flexibody, яке є комбінацією scFv з діатілом, утворюючи полівалентну молекулу; (vii) так звані молекули "dock and lock" на основі "домена димеризації й стикування" протеїнкінази A, що в застосуванні до Fabs може давати тривалентний біспецифічний єднальний білок, який складається із двох ідентичних Fab-фрагментів, пов'язаних з іншим Fab-фрагментом; (viii) так звані молекули-скорпіони, які містять, напр., два scFv, злиті з обома кінцями Fab-плеча людини; і (ix) діатіла.

В одному втіленні біспецифічні антитіла за даним винаходом є діатілами, зшитими антитілами або біспецифічними антитілами, отриманими шляхом контрольованого обміну Fab-плеча (типу описаних в WO 2011/131746 (Genmab)).

Приклади різних класів біспецифічних антитіл включають, без обмеження: (i) IgG-подібні молекули з комплементарними доменами C_H3 для примусової гетеродимеризації; (ii) рекомбінантні IgG-подібні молекули з подвійним наведенням, у яких кожна із двох сторін молекули містить Fab-фрагмент або частину Fab-фрагмента щонайменше із двох різних антитіл; (iii) злиті молекули IgG, у яких повнорозмірні антитіла IgG злиті з додатковим Fab-фрагментом або частинами Fab-фрагментів; (iv) злиті молекули Fc, у яких одноланцюгові молекули Fv або стабілізовані діатіла злиті з константними доменами, Fc-областями важкого ланцюга або їх частинами; (v) злиті молекули Fab, у яких злиті разом різні Fab-фрагменти, злиті з константними доменами, Fc-областями важкого ланцюга або їх частинами; і (vi) антитіла на основі scFv і діатіл і важких ланцюгів (напр., доменні антитіла, нанотіла), у яких різні одноланцюгові молекули Fv або різні діатіла або різні антитіла з важких ланцюгів (напр., доменні антитіла, нанотіла) злито один з одним або з іншим білком або з молекулою носія, злиною з константними доменами, Fc-областями важкого ланцюга або їх частинами.

Приклади IgG-подібних молекул з комплементарними доменами C_H3 включають, без обмеження, молекули Triomab/Quadromab (Trion Pharma/Fresenius Biotech; Roche, WO 2011/069104), так звані молекули "knobs-into-holes" (Genentech, WO 98/50431), CrossMAbs (Roche, WO 2011/117329) і електростатично підігнані молекули (Amgen, EP1870459 і WO 2009/089004; Chugai, US 2010/00155133; Oncomed, WO 2010/129304), молекули LUZ-Y (Genentech; Wranik et al., J. Biol. Chem. 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012, NoV 1), DIG-тіла й PIG-тіла (Pharmabcine, WO 2010/134666, WO 2014/081202), антитіла з отриманими шляхом обміну ниток доменами (SEEDbody) (EMD Serono, WO 2007/110205), молекули Biclomics (Merus, WO 2013/157953), молекули FcΔAdp (Regeneron, WO 2010/15792), біспецифічні молекули IgG1 і IgG2 (Pfizer/Rinat, WO 11/143545), молекули Azymetric scaffold (Zymeworks/Merck, WO 2012/058768), молекули mAb-Fv (Xencor, WO 2011/028952), бівалентні біспецифічні антитіла (WO 2009/080254) і молекули DuoBody® (Genmab, WO 2011/131746).

Приклади рекомбінантних IgG-подібних молекул з подвійним наведенням включають, без обмеження, молекули з подвійним наведенням (DT)-Ig (WO 2009/058383), антитіла два-в-одному (Genentech; Bostrom et al., 2009 Science 323, 1610-1614.), зшиті mAbs (Karmanos Cancer Center), mAb₂ (F-Star, WO 2008/003116), молекули Zybody (Zyngenia; LaFleur et al., MABs 2013 Mar-Apr, 5(2):208-18), підходи із загальним легким ланцюгом (Crucell/merus, US 7,262,028), κLBodies (NovImmune, WO 2012/023053) і CovX-body (CovX/Pfizer; Doppalapudi V.R. et al., 2007 Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 501-506).

Приклади злитих молекул IgG включають, без обмеження, молекули з подвійним варіабельним доменом (DVD)-Ig (Abbott, US 7,612,181), антитіла із двома доменами й двома голівками (Unilever; Sanofi Aventis, WO 2010/0226923), IgG-подібні біспецифічні молекули (Imclone/Eli Lilly, Lewis et al., Nat Biotechnol. 2014 Feb, 32(2):191-8), молекули Ts₂Ab (MedImmune/AZ; Dimasi et al., J Mol Biol. 2009 Oct 30, 393(3):672-92) і BsAb (Zymogenetics, WO 2010/111625), молекули Hercules (Biogen Idec, US 007951918), злиті молекули scFv (Novartis), злиті молекули scFv (Changzhou Adam Biotech Inc., CN 10225 0246) і молекули TvAb (Roche, WO 2012/025525, WO 2012/025530).

Приклади злитих молекул Fc включають, без обмеження, злиття scFv/Fc (Pearce et al., Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep, 42(6):1179-88), молекули SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion; Blankenship JW et al., AACR 100th Annual meeting 2009, Abstract # 5465; Zymogenetics/BMS, WO 2010/111625), молекули за технологією подвійної спорідненості з перенаведенням (Fc-DART) (MacroGenics, WO 2008/157379, WO 2010/080538) і подвійні молекули (scFv)₂-Fab (National Research Center for Antibody Medicine, Китай).

Приклади біспецифічних антитіл типу злитих Fab включають, без обмеження, молекули F(ab)₂ (Medarex/AMGEN; Deo et al., J. Immunol. 1998 Feb 15, 160(4): 1677-86), молекули подвійної дії або bis-Fab (Genentech; Bostrom et al., 2009 Science 323, 1610-1614), молекули "dock-and-lock" (DNL) (ImmunoMedics, WO 2003/074569, WO 2005/004809), бівалентні біспецифічні молекули (Biotecnol; Schoonjans, J. Immunol. 2000 Dec. 15, 165(12): 7050-7) і молекули Fab-Fv (UCB-Celltech, WO 2009/040562 A1).

Приклади антитіл на основі scFv, діатіл і доменних антитіл включають, без обмеження, біспецифічні молекули T-cell Engager (BiTE) (Micromet, WO 2005/061547), молекули тандемних діатіл (TandAb) (Affimed; Le Gall et al., Protein Eng Des Sel., 2004 Apr, 17(4): 357-66.), молекули за технологією подвійної спорідненості з перенаведенням (DART) (MacroGenics, WO 2008/157379, WO 2010/080538), одноланцюгові молекули діатіл (Lawrence, FEBS Lett. 1998 Apr 3, 425(3): 479-84), TCR-подібні антитіла (AIT, ReceptorLogics), злиті із сироватковим альбуміном людини scFv (Merrimack, WO 2010/059315) і молекули COMBODY (Epigen Biotech; Zhu et al., Immunol Cell Biol. 2010 Aug, 88(6): 667-75), нанотіла з подвійним наведенням (Ablynx; Hmila et al., FASEB J., 2010) і доменні антитіла тільки з важкими ланцюгами з подвійним наведенням.

В одному аспекті біспецифічні антитіла за винаходом включають першу послідовність Fc, яка містить першу ділянку C_H3, і другу послідовність Fc, яка містить другу ділянку C_H3, причому послідовності першої й другої ділянки C_H3 різні й такі, що гетеродимерна взаємодія між зазначеною

першою й другою ділянкою C_H3 буде більш сильною, ніж кожна з гомодимерних взаємодій зазначених першої й другої ділянок C_H3. Більш докладно про ці взаємодії і як вони досягаються викладене в WO 2011/131746 і WO 2013/060867 (Genmab), які включені сюди в якості посилання.

Як описано далі тут, стабільні біспецифічні антитіла типу біспецифічних антитіл CD3×PD-L1 можуть бути отримані з високим виходом визначеним способом на основі одного гомодимерного вихідного антитіла до PD-L1 і одного гомодимерного вихідного антитіла, здатного зв'язувати різні епітопи PD-L1 або інший антиген (типу гомодимерного вихідного антитіла до CD3), які містять лише кілька консервативних асиметричних мутацій у ділянках C_H3. Асиметричні мутації означають те, що послідовності зазначених першої й другої ділянок C_H3 містять амінокислотні заміни в неідентичних положеннях.

В одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з 366, 368, 370, 399, 405, 407 і 409, і друга ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з 366, 368, 370, 399, 405, 407 і 409, причому заміни в першій та другій ділянці C_H3 перебувають не в однакових положеннях.

В одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні 366, а друга ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з 368, 370, 399, 405, 407 і 409. В одному втіленні амінокислота в положенні 366 обрана з Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val або Gln.

В одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні 368, а друга ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з 366, 370, 399, 405, 407 і 409.

В одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні 370, а друга ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з 366, 368, 399, 405, 407 і 409.

В одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні 399, а друга ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з 366, 368, 370, 405, 407 і 409.

В одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні 405, а друга ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з 366, 368, 370, 399, 407 і 409.

В одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні 407, а друга ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з 366, 368, 370, 399, 405 і 409.

В одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з 366, 368, 370, 399, 405 і 407.

Відповідно, в одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, послідовності даних першої та другої ділянок C_H3 містять асиметричні мутації, тобто мутації в різних положеннях у двох ділянках C_H3, напр., мутацію в положенні 405 в одній з ділянок C_H3 і мутацію в положенні 409 в іншій ділянці C_H3.

В одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить амінокислотну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з 366, 368, 370, 399, 405 і 407. В одному такому втіленні перша ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Phe, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Cys, Lys або Leu у положенні 405. У наступному втіленні перша ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Phe, Arg або Gly, напр., Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 405.

В іншому втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить Phe у положенні 405 і іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Phe, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Leu, Met або Cys, у положенні 405 і Lys у положенні 409. У наступному втіленні перша ділянка C_H3 містить Phe у положенні 405 і іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Phe, Arg або Gly, напр., Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 405 і Lys у положенні 409.

В іншому втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_n3 містить Phe у положенні 405 і іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 409, а друга ділянка C_n3 містить Leu у положенні 405 і Lys у положенні 409. У наступному втіленні перша ділянка C_n3 містить Phe у положенні 405 і Arg у положенні 409, а друга ділянка C_n3 містить іншу амінокислоту, ніж Phe, Arg або Gly, напр., Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Met, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 405 і Lys у положенні 409. В іншому втіленні перша ділянка C_n3 містить Phe у положенні 405 і Arg у положенні 409, а друга ділянка C_n3 містить Leu у положенні 405 і Lys у положенні 409.

У наступному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить Lys у положенні 370, Phe у положенні 405 і Arg у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить Lys у положенні 409, Thr у положенні 370 і Leu у положенні 405.

В іншому втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить Arg у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить Lys у положенні 409 і або а) Ile у положенні 350 і Leu у положенні 405, або b) Thr у положенні 370 і Leu у положенні 405.

В іншому втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить Thr у положенні 350, Lys у положенні 370, Phe у положенні 405 і Arg у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить Ile у положенні 350, Thr у положенні 370, Leu у положенні 405 і Lys у положенні 409.

В одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser або Thr у положенні 407.

В одному втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка Cn3 містить Tyr у положенні 407 і Arg у положенні 409, а друга ділянка Cn3 містить іншу амінокислоту, ніж Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser або Thr у положенні 407 і Lys у положенні 409.

В іншому втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить Gly, Leu, Met, Asn або Trp у положенні 407.

Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser або Thr, напр., Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp або Cys у положенні 407 і Lys у положенні 409.

В іншому втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить Tyr у положенні 407 і іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val або Trp у положенні 407 і Lys у положенні 409.

В іншому втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить Tyr у положенні 407 і іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить Gly, Leu, Met, Asn або Trp у положенні 407 і Lys у положенні 409.

В іншому втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить Tyr у положенні 407 і Arg у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser або Thr, напр., Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp або Cys у положенні 407 і Lys у положенні 409.

В іншому втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить Tyr у положенні 407 і Arg у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val або Trp у положенні 407 і Lys у положенні 409.

В іншому втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить Tyr у положенні 407 і Arg у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить Gly, Leu, Met, Asn або Trp у положенні 407 і Lys у положенні 409.

В іншому втіленні біспецифічних антитіл, визначених у будь-якому з наведених тут втілень, перша ділянка C_H3 містить іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить:

(i) іншу амінокислоту, ніж Phe, Leu або Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr або Cys у положенні 368 або

(ii) Trp у положенні 370 або

(iii) іншу амінокислоту, ніж Asp, Cys, Pro, Glu або Gln, напр., Phe, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asn, Trp, Tyr або Cys у положенні 399, або

(iv) іншу амінокислоту, ніж Lys, Arg, Ser, Thr або Trp, напр., Phe, Leu, Met, Ala, Val, Gly, Ile, Asn, His, Asp, Glu, Gln, Pro, Tyr або Cys у положенні 366.

В одному втіленні перша ділянка C_H3 містить Arg, Ala, His або Gly у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить:

(i) Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val або Trp у положенні 368 або

(ii) Trp у положенні 370 або

(iii) Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg або Tyr у положенні 399 або

(iv) Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln, Phe, Gly, Ile, Leu, Met або Tyr у положенні 366.

В одному втіленні перша ділянка C_H3 містить Arg у положенні 409, а друга ділянка C_H3 містить:

(i) Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val або Trp у положенні 368 або

(ii) Trp у положенні 370 або

(iii) Phe, His, Lys, Arg або Tyr у положенні 399 або

(iv) Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val або Gln у положенні 366.

У кращому втіленні біспецифічне антитіло містить перший і другий важкий ланцюг, причому кожен з даних першого й другого важких ланцюгів містить щонайменше шарнірну ділянку й ділянки C_H2 і C_H3, при цьому (i) амінокислота в положенні, що відповідає F405 (за нумерацією EU), представлена L у даному першому важкому ланцюзі, а амінокислота в положенні, що відповідає K409 (за нумерацією EU), представлена R у даному другому важкому ланцюзі, або ж (ii) амінокислота в положенні, що відповідає K409 (за нумерацією EU), представлена R у даному першому важкому ланцюзі, а амінокислота в положенні, що відповідає F405 (за нумерацією EU), представлена L у даному другому важкому ланцюзі.

Поряд з наведеними вище амінокислотними замінами дані перший та другий важкі ланцюги можуть містити й інші амінокислотні заміни, делеції або вставки щодо послідовностей важких ланцюгів дикого типу.

У наступному втіленні дані перші й другі Fab-плечі (або константні домени важкого ланцюга) містять, крім зазначених мутацій, послідовність C_H3, обрану незалежно з наступного: IgG1m(a) (SEQ ID NO: 96), IgG1m(f) (SEQ ID NO: 97) і IgG1m(ax) (SEQ ID NO: 98).

В одному втіленні ні перша, ні друга послідовність Fc не містить послідовності Cys-Pro-Ser-Cys в (основній) шарнірній ділянці.

В іншому втіленні й перша, і друга послідовність Fc містить послідовність Cys-Pro-Ser-Cys в (основній) шарнірній ділянці.

Способи одержання біспецифічних антитіл

При одержанні біспецифічних антитіл за винаходом можна використовувати традиційні методи типу гібридної гібридоми й методи хімічної кон'югації (Marvin and Zhu (2005) *Acta Pharmacol. Sin.* 26: 649). Спільна експресія в клітинах хазяїна двох антитіл, які складаються із різних важких і легких ланцюгів, приводить до суміші можливих продуктів антитіл на додаток до необхідних біспецифічних антитіл, які потім можна виділити, напр., методом афінної хроматографії або подібними методами.

Також можна використовувати стратегії, які сприяють утворенню функціонального біспецифічного продукту при спільній експресії різних конструкцій антитіл, напр., метод, описаний Lindhofer et al. (1995 *J Immunol* 155: 219). Злиття щурячих і мишачих гібридом, які виробляють різні антитіла, дає обмежене число гетеродимерних білків внаслідок кращого спарювання важких/легких ланцюгів від одного виду. Іншою стратегією, що сприяє утворенню гетеродимерів перед гомодимерами, є стратегія "knob-into-hole", при якій уводиться виступ у поліпептид першого важкого ланцюга й відповідна порожнина в поліпептид другого важкого ланцюга для того, щоб виступ входив у порожнину на границі між цими двома важкими ланцюгами, сприяючи утворенню гетеродимера й перешкоджаючи утворенню гомодимера. "Виступи" конструюються шляхом заміни невеликих бічних ланцюгів амінокислот на границі розподілу першого поліпептиду на більші бічні ланцюги. А на границі розподілу другого поліпептиду створюються компенсаторні "порожнини" такого ж або близького виступам розміру шляхом заміни великих бічних ланцюгів амінокислот на більш дрібні (US Patent 5,731,168). В EP 1870459 (Chugai) і WO 2009/089004 (Amgen) описані інші стратегії, що сприяють утворенню гетеродимерів при спільній експресії різних доменів антитіл у клітинах хазяїна. У цих методах один або кілька залишків, що становлять границю розподілу C_{H3} - C_{H3} в обох доменах C_{H3} , замінюються зарядженими амінокислотами для того, щоб утворення гомодимерів було електростатично не вигідно, а гетеродимеризація була електростатично вигідна. Ще одна стратегія описана в WO 2007/110205 (Merck), при якій для посилення гетеродимеризації використовуються відмінності між доменами C_{H3} в IgA і IgG.

Інший метод одержання біспецифічних антитіл *in vitro* описаний в WO 2008/119353 (Genmab), у якому біспецифічні антитіла утворюються шляхом обміну "Fab-плеча" або "половинки молекули" (перестановки важкого ланцюга й приєднаного легкого ланцюга) між двома моноспецифічними антитілами IgG4 або IgG4-подібними при інкубації у відновлювальних умовах. Отриманий продукт є біспецифічним антитілом, яке містить два Fab-плеча, які можуть мати різні послідовності.

Кращий спосіб одержання біспецифічних антитіл типу біспецифічних антитіл до CD3×PD-L1 за даним винаходом включає способи, описані в WO 2011/131746 і WO 2013/060867 (Genmab), які включають наступні стадії:

a) одержання першого антитіла, яке містить Fc-область, причому дана Fc-область містить першу ділянку C_{H3} ;

b) одержання другого антитіла, яке містить Fc-область, причому дана Fc-область містить другу ділянку C_{H3} ;

причому перше антитіло є антитілом до PD-L1 за винаходом, а друге антитіло є антитілом, яке здатне зв'язуватися з іншим епітопом PD-L1 або з іншим антигеном типу CD3 людини, або навпаки;

при цьому послідовності даних першої й другої ділянок C_{H3} різні й такі, що гетеродимерні взаємодії між першою й другою ділянкою C_{H3} будуть сильніші, ніж кожна з гомодимерних взаємодій даних перших і других ділянок C_{H3} ;

c) інкубації даного першого антитіла разом із другим антитілом при відновлювальних умовах; і

d) одержання даного біспецифічного антитіла, напр., біспецифічного антитіла до CD3×PD-L1.

Також передбачений спосіб одержання антитіл за винаходом, що включає стадії:

a) культивування клітин-хазяїв, які виробляють перше антитіло, яке містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, як визначено тут, і очищення даного першого антитіла з культури;

b) культивування клітин-хазяїв, які виробляють друге антитіло, яке містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з іншим епітопом PD-L1 або з іншим антигеном, напр., ділянка зв'язування CD3ε людини, як визначено тут, і очищення даного другого антитіла з культури;

c) інкубації даного першого антитіла разом із другим антитілом у відновлювальних умовах, достатніх для того, щоб цистеїни в шарнірній області піддалися ізомеризації в дисульфідний зв'язок; і

d) одержання даного біспецифічного антитіла.

В одному втіленні дане перше антитіло разом із другим антитілом інкубують у відновлювальних умовах, достатніх для того, щоб цистеїни в шарнірній області піддалися ізомеризації в дисульфідний зв'язок, причому гетеродимерна взаємодія між першим і другим антитілом в гетеродимерному антитілі, що утворюється така, що не відбувається заміни Fab-плеча при 0,5 mM GSH через 24 години при 37 °C.

Не обмежуючись теорією, на стадії c) відновлюються дисульфідні зв'язки важкого ланцюга в шарнірних ділянках вихідних антитіл, а отримані цистеїни потім здатні утворювати дисульфідний зв'язок між важкими ланцюгами із залишками цистеїна молекули іншого вихідного антитіла (первинно з іншою специфічністю). В одному втіленні цього способу відновлювальні умови на стадії c) включають

додавання відновлювача, напр., відновлювача, обраного із групи, яка складається з 2-меркаптоетиламіна (2-MEA), дитіотреїтола (DTT), дитіоеритритрола (DTE), глутатіона, трис(2-карбоксиетил)фосфіну (TCPE), L-цистеїна й β -меркаптоетанола, переважно відновлювача, обраного із групи, яка складається з 2-меркаптоетиламіна, дитіотреїтола й трис(2-карбоксиетил)фосфіну. В іншому втіленні стадія с) включає повернення умов до невідновлювальних або менш відновлювальних, приміром, шляхом видалення відновлювача, напр., шляхом знесолення.

Для цього способу можна використовувати будь-які з антитіл, напр., антитіла до CD3 і PD-L1, описані вище, включаючи перше й друге антитіло до CD3 і PD-L1, відповідно, які містять першу й/або другу Fc-область. Приклади таких першої й другої Fc-областей, включаючи комбінації таких першої й другої Fc-областей, можуть містити в собі будь-які з описаних вище. У конкретному втіленні перше й друге антитіло, напр., антитіла до CD3 і PD-L1, відповідно, можна вибрати так, щоб одержати біспецифічне антитіло, як описано тут.

В одному втіленні цього способу дане перше й/або друге антитіло є повнорозмірними антитілами.

Fc-області першого й другого антитіла можуть бути будь-якого ізотипа, включаючи, без обмеження, IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. В одному втіленні цього способу Fc-області й першого, і другого антитіла мають ізотип IgG1. В іншому втіленні одна з Fc-областей даних антитіл має ізотип IgG1, а інша – ізотип IgG4. В останньому втіленні отримане біспецифічне антитіло містить послідовність Fc з IgG1 і послідовність Fc з IgG4 і тому може мати цікаві проміжні властивості відносно активації ефektorних функцій.

У наступному втіленні один з вихідних білків антитіл зазнав інженерії для того, щоб він не зв'язував білок А, що дозволяє відокремити гетеродимерний білок від гомодимерного вихідного білка пропущенням продукту через стовпчик з білком А.

Як описано вище, послідовності перших і других ділянок C_{H3} у гомодимерних вихідних антитіл різні й такі, що гетеродимерні взаємодії між першою й другою ділянкою C_{H3} будуть сильніші, ніж кожна з гомодимерних взаємодій даних перших і других ділянок C_{H3} . Більш докладно про ці взаємодії і як вони досягаються викладене в WO 2011/131746 і WO 2013/060867 (Genmab), які включені сюди шляхом посилання у всій повноті.

Зокрема, стабільні біспецифічні антитіла, напр., біспецифічні антитіла CD3×PD-L1, можуть бути отримані з високим виходом вищенаведеним способом за винаходом на основі двох гомодимерних вихідних антитіл, які зв'язують PD-L1 і інший епітоп PD-L1 або інший антиген, напр., CD3, відповідно, і містять лише кілька консервативних асиметричних мутацій у ділянках C_{H3} . Асиметричні мутації означають, що послідовності даних першої й другої ділянки C_{H3} містять амінокислотні заміни в неідентичних положеннях.

Біспецифічні антитіла за винаходом також можуть бути отримані шляхом спільної експресії конструкцій, які кодують перший і другий поліпептид в одній клітині. Так, у наступному аспекті винаходу передбачений спосіб одержання біспецифічних антитіл, який включає наступні стадії:

a) одержання першої конструкції з нуклеїнової кислоти, яка кодує перший поліпептид, який містить першу послідовність Fc і першу антигензв'язуючу ділянку важкого ланцюга першого антитіла, причому дана перша послідовність Fc містить першу ділянку C_{H3} ;

b) одержання другої конструкції з нуклеїнової кислоти, яка кодує другий поліпептид, який містить другу послідовність Fc і другу антигензв'язуючу ділянку важкого ланцюга другого антитіла, причому дана друга послідовність Fc містить другу ділянку C_{H3} ,

причому послідовності даних першої й другої ділянок C_{H3} різні й такі, що гетеродимерні взаємодії між першою й другою ділянкою C_{H3} будуть сильніші, ніж кожна з гомодимерних взаємодій даних перших і других ділянок C_{H3} , при цьому перший гомодимерний білок містить іншу амінокислоту, ніж Lys, Leu або Met у положенні 409, а другий гомодимерний білок містить амінокислотну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з: 366, 368, 370, 399, 405 і 407,

при цьому необов'язково дані перша й друга конструкції з нуклеїнової кислоти кодують послідовності легкого ланцюга даних першого й другого антитіла;

c) спільна експресія даних першої й другої конструкцій з нуклеїнової кислоти в клітинах хазяїна; і

d) одержання даного гетеродимерного білка із клітинної культури.

Матеріали й методи для одержання антитіл за винаходом

У наступних аспектах винаходу передбачені матеріали й методи для рекомбінантного одержання антитіл за винаходом. Придатні експресуючі вектори, включаючи промотори, енхансери і т.д., а також придатні клітини хазяїна для одержання антитіл добре відомі в даній області.

Так, в одному аспекті передбачені конструкції з нуклеїнової кислоти, які включають:

(i) послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує послідовність важкого ланцюга антитіла, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, як визначено тут, і/або

(ii) послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує послідовність легкого ланцюга антитіла, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, як визначено тут.

В одному втіленні конструкція з нуклеїнової кислоти додатково включає:

(i) послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність важкого ланцюга антитіла, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з іншим епітопом PD-L1 або з іншим антигеном, напр., CD3ε людини, як визначено тут, і/або

(ii) послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність легкого ланцюга антитіла, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з іншим епітопом PD-L1 або з іншим антигеном, напр., CD3ε людини, як визначено тут.

У наступному аспекті винаходу передбачені експресуючі вектори, які містять конструкції з нуклеїнової кислоти, як визначено вище.

Експресуючим вектором у контексті даного винаходу може бути будь-який придатний вектор, включаючи хромосомні, нехромосомні й синтетичні вектори з нуклеїнової кислоти (послідовності нуклеїнової кислоти, які містять придатний набір контролюючих експресію елементів). Приклади таких векторів включають похідні SV40, бактеріальні плазмиди, фагові ДНК, бакуловіруси, дріжджові плазмиди, вектори, отримані з комбінацій плазмід і фагової ДНК, і вектори з вірусної нуклеїнової кислоти (PHK або ДНК). В одному втіленні нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло, напр., нуклеїнова кислота, що кодує антитіло до PD-L1 або CD3, утримується у векторі з "голої" ДНК або PHK, включаючи, приміром, лінійні експресуючі елементи (як описано, приміром, в Sykes and Johnston, *Nat Biotech.* 17, 355-59 (1997)), вектори з компактної нуклеїнової кислоти (як описано, приміром, в US 6,077,835 і/або WO 00/70087), плазмідні вектори типу pBR322, pUC19/18 або pUC118/119, вектори з нуклеїнової кислоти мінімального розміру "midge" (як описано, приміром, в Schakowski et al., *Mol Ther.* 3, 793-800 (2001)) або у вигляді осадженої конструкції вектора з нуклеїнової кислоти типу осаджених Са₃(PO₄)₂ конструкцій (як описано, приміром, в WO 2000/46147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), і Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Такі вектори з нуклеїнової кислоти і їх застосування добре відомі в даній області (приміром, див. US 5,589,466 і US 5,973,972).

В одному втіленні вектор підходить для експресії антитіл, напр., антитіл до PD-L1 і/або антитіл до CD3 у бактеріальних клітинах. Приклади таких векторів включають такі експресуючі вектори, як BlueScript (Stratagene), вектори pIN (Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem.* 264, 5503-5509 (1989), вектори pET (Novagen, Madison, WI) і ін.

Експресуючим вектором також або альтернативно може бути вектор, що підходить для експресії в дріжджовій системі. Можна використовувати будь-який вектор, що підходить для експресії в дріжджовій системі. Придатні вектори включають, приміром, вектори, які містять конститутивні або індукцйбельні промотори типу α-фактора, алкогольоксидази й PGH (див. огляди F. Ausubel et al., Ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); і Grant et al., *Methods in Enzymol.* 153, 516-544 (1987)).

Експресуючим вектором також або альтернативно може бути вектор, який підходить для експресії в клітинах ссавців, напр., вектор, що містить глутамінсинтетазу в якості селектованого маркера, типу векторів, описаних в Bebbington (1992) *Biotechnology (NY)* 10: 169-175.

Нуклеїнова кислота й/або вектор також може містити послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує послідовність секреції/локалізації, яка може направляти поліпептид типу поліпептидного ланцюга, що з'являється, у периплазматичний простір або в середовище для культивування клітин. Такі послідовності відомі в даній області й включають лідери секреції або сигнальні пептиди.

Експресуючий вектор може містити або бути пов'язаний з будь-яким придатним промотором, енхансером і іншими сприятливими експресії елементами. Приклади таких елементів включають сильні промотори експресії (напр., промотор/енхансер IE CMV людини, а також промотори LTR RSV, SV40, SL3-3, MMTV і B1L), ефективні послідовності термінації полі(A), початку реплікації для плазмідних продуктів в *E. coli*, гени стійкості до антибіотиків у якості селектованих маркерів і/або зручні сайти клонування (напр., полілінкери). Нуклеїнові кислоти також можуть містити індукцйбельні промотори, на відміну від конститутивних промоторів типу IE CMV.

В одному втіленні експресуючий вектор, який кодує антитіло, напр., який кодує антитіло до PD-L1 і/або CD3 експресуючий вектор, може бути розташований і/або доставлений у клітини хазяїна або організм тварини через вірусний вектор.

У наступному аспекті винаходу передбачені клітини-хазяї, які містять одну або декілька конструкцій з нуклеїнової кислоти або експресуючих векторів, наведених вище.

Так, даним винаходом також передбачені рекомбінантні еукаріотичні або прокаріотичні клітини-хазяї типу трансфектоми, які виробляють антитіла даного винаходу.

Приклади клітин-хазяїв включають дріжджові, бактеріальні клітини, рослинні й клітини ссавців, як от клітини CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 або NS0 або лімфоцитарні клітини. Кращими клітинами хазяїна є клітини CHO-K1.

Наприклад, в одному втіленні клітини хазяїна можуть містити першу й другу конструкцію з нуклеїнової кислоти, стабільно вбудовані в клітинний геном. В іншому втіленні даного винаходу передбачені клітини, які містять не вбудовану нуклеїнову кислоту типу плазмиди, косміди, фагеміди

або лінійного експресуючого елемента, які містять першу й другу конструкцію з нуклеїнової кислоти, як зазначено вище.

У наступному аспекті винаходу передбачені гібридами, які виробляють антитіла до PD-L1, як визначено тут.

Fc-області

У деяких втіленнях антитіла за даним винаходом, поряд з антигензв'язуючими ділянками, містять Fc-область, яка складається з послідовностей Fc двох важких ланцюгів.

Перші й другі послідовності Fc можуть бути будь-якого ізотипа, включаючи, без обмеження, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4, і можуть містити одну або кілька мутацій або модифікацій. В одному втіленні й перша, і друга послідовність Fc має ізотип IgG4 або його похідне, необов'язково з однією або декількома мутаціями або модифікаціями. В іншому втіленні й перша, і друга послідовність Fc має ізотип IgG1 або його похідне, необов'язково з однією або декількома мутаціями або модифікаціями. В іншому втіленні одна з послідовностей Fc має ізотип IgG1, а інша – ізотип IgG4, або ж це похідні таких відповідних ізотипів, необов'язково з однією або декількома мутаціями або модифікаціями.

В одному втіленні одна або обидві послідовності Fc дефектні за ефекторною функцією. Наприклад, послідовності Fc можуть мати ізотип IgG4 або інший ізотип, напр., IgG1, IgG2 або IgG3, який зазнав мутації для того, щоб зменшити або навіть усунути здатність опосередковувати ефекторні функції типу ADCC. Такі мутації, напр., описані в Dall'acqua WF et al., J. Immunol. 177(2): 1129-1138 (2006); і Hezareh M, J. Virol. 75(24): 12161-12168 (2001). В іншому втіленні одна або обидві послідовності Fc містять послідовність IgG1 дикого типу.

Антитіла за даним винаходом можуть містити модифікації в області Fc. Коли антитіло містить такі модифікації, воно може стати інертним або не активуючим антитілом. При цьому термін “інертність”, “інертний” або “неактивуючий” відноситься до такої Fc-області, яка, щонайменше, нездатна зв'язуватися з будь-яким Fcγ-рецептором, індукувати Fc-опосередковане зшивання FcR або індукувати Fcγ-опосередковане перехресне зшивання цільових антигенів через дві Fc-області індивідуальних антитіл або не здатна зв'язувати C1q. Інертність Fc-області антитіл, напр., гуманізованих або химерних антитіл проти CD3, переважно перевіряється з використанням антитіл у моноспецифічному форматі.

Можна сконструювати кілька варіантів, щоб зробити Fc-область антитіла неактивною для взаємодій з Fcγ-рецепторами (гама) і C1q для розробки терапевтичних антитіл. Приклади таких варіантів описані тут.

Так, в одному втіленні антитіл за винаходом антитіло містить перший і другий важкий ланцюг, причому один або обидва важкі ланцюги модифіковані для того, щоб антитіло індукувало Fc-опосередковану ефекторну функцію меншою мірою в порівнянні з таким антитілом, яке ідентичне за винятком того, що містить немодифікований перший і другий важкий ланцюг. Така Fc-опосередкована ефекторна функція може бути виміряна за опосередкованою Fc експресією CD69, за зв'язуванням з Fcγ-рецепторами, за зв'язуванням з C1q або за індукцією Fc-опосередкованого перехресного зшивання FcR.

В одному такому втіленні константні послідовності важкого ланцюга зазнають модифікації таким чином, щоб у даного антитіла Fc-опосередкована експресія CD69 знижувалася щонайменше на 50 %, на 60 %, на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 99 % або 100 % у порівнянні з антитілом дикого типу (немодифікованим), при цьому така Fc-опосередкована експресія CD69 визначається при функціональному аналізі на основі PBMC, напр., як описано в прикладі 3 з WO 2015/001085.

В іншому такому втіленні константні послідовності важкого й легкого ланцюга зазнають модифікації таким чином, щоб зв'язування C1q з антитілом знижувалося в порівнянні з немодифікованим антитілом, щонайменше, на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 95 %, на 97 % або на 100 %, при цьому зв'язування C1q визначається методом ELISA.

В іншому втіленні антитіло містить Fc-область, яка зазнала модифікації для того, щоб у даного антитіла Fc-опосередкована проліферація Т-клітин у порівнянні з немодифікованим антитілом знижувалася щонайменше на 50 %, на 60 %, на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 99 % або на 100 %, при цьому проліферацію Т-клітин вимірюють при функціональному аналізі на основі мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC).

Таким чином, амінокислоти в Fc-області, які відіграють домінуючу роль у взаємодіях з C1q і Fcγ-рецепторами, можуть зазнати модифікації.

Приклади положень амінокислот, які можуть зазнати модифікації, напр., в антитілах ізотипа IgG1, включають положення L234, L235 і P331. Їхні комбінації типу L234F/L235E/P331S можуть викликати сильне зниження зв'язування з CD64, CD32, CD16 і C1q людини.

Так, в одному втіленні амінокислоти щонайменше в одному положенні, що відповідає L234, L235 і P331, можуть бути представлені A, A і S, відповідно (Xu et al., 2000, Cell Immunol. 200(1): 16-26; Oganesyan et al., 2008, Acta Cryst. (D64):700-4). Крім того, при амінокислотних замінах L234F і L235E можуть відбуватися порушення взаємодій Fc-області з Fcγ-рецепторами й C1q (Canfield et al., 1991, J. Exp. Med. (173): 1483-91; Duncan et al., 1988, Nature (332):738-40). Тому в одному втіленні

амінокислоти в положеннях, що відповідають L234 і L235, можуть бути представлені F і E, відповідно. При амінокислотній заміні D265A може зменшитися зв'язування з усіма Fcγ-рецепторами й запобігається ADCC (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276): 6591-604). Тому в одному втіленні амінокислота в положенні, що відповідає D265, може бути представлена A. Зв'язування з C1q може усуватися при введенні мутацій у положення D270, K322, P329 і P331. Мутації в цих положеннях типу D270A або K322A або P329A або P331A можуть зробити антитіло дефектним за активністю CDC (Idusogie EE et al., 2000, J. Immunol. 164: 4178-84). Тому в одному втіленні амінокислоти щонайменше в одному положенні, що відповідає D270, K322, P329 і P331, можуть бути представлені A, A, A і A, відповідно.

Альтернативний підхід до мінімізації взаємодії Fc-області з Fcγ-рецепторами й C1q полягає у видаленні сайту глікозилювання антитіла. При мутації положення N297, напр., в Q, A або E видалається сайт глікозилювання, який важливий для взаємодій IgG з Fcγ-рецепторами. Тому в одному втіленні амінокислота в положенні, що відповідає N297, може бути представлена G, Q, A або E (Leabman et al., 2013, Mabs 5(6): 896-903). Інший альтернативний підхід до мінімізації взаємодії Fc-області з Fcγ-рецепторами може полягати в наступних мутаціях: P238A, A327Q, P329A або E233P/L234V/L235A/G236del (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604).

З іншого боку, вважається, що в підкласів IgG2 і IgG4 людини за природою ослаблені взаємодії з C1q і Fcγ-рецепторами, хоча й відзначалися взаємодії з Fcγ-рецепторами (Parren et al., 1992, J. Clin Invest. 90: 1537-1546; Bruhns et al., 2009, Blood 113: 3716-3725). В обох ізотипів можна проробити мутації, які усувають ці залишкові взаємодії, що приводить до зменшення небажаних побічних ефектів, зв'язаних зі зв'язуванням FcR. Для IgG2 вони включають L234A і G237A, а для IgG4 – L235E. Тому в одному втіленні амінокислоти в положеннях, що відповідають L234 і G237 у важкому ланцюзі IgG2 людини, можуть бути представлені A і A, відповідно. В одному втіленні амінокислота в положенні, що відповідає L235 у важкому ланцюзі IgG4 людини, може бути представлена E.

Інші підходи до подальшої мінімізації взаємодії з Fcγ-рецепторами й C1q в антитіл IgG2 включають підходи, описані в WO 2011/066501 і Lightle S. et al., 2010, Protein Science (19): 753-62.

Шарнірна область антитіла також може мати значення відносно взаємодій з Fcγ-рецепторами й комплементом (Brekke et al., 2006, J Immunol. 177: 1129-1138; Dall'acqua WF et al., 2006, J Immunol 177: 1129-1138). Відповідно, мутації або делеції в шарнірній області можуть впливати на ефекторні функції антитіла.

Так, в одному втіленні антитіло містить перший і другий важкий ланцюг імуноглобуліну, причому щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів імуноглобуліну одна або кілька амінокислот у положеннях, відповідних до положень L234, L235, D265, N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, не представлені L, L, D, N і P, відповідно.

В одному втіленні й у першому, і в другому важкому ланцюзі одна або кілька амінокислот у положеннях, відповідних до положень L234, L235, D265, N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, не представлені L, L, D, N і P, відповідно.

В одному втіленні й у першому, і в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, відповідному до положення D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, не представлена D.

Так, в одному втіленні й у першому, і в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, відповідному до положення D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, обрана із групи, яка складається з A і E.

В іншому втіленні щонайменше в одному з даних першого й другого важкого ланцюга амінокислоти в положеннях, відповідних до положень L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, не представлені L і L, відповідно.

У кращому втіленні щонайменше в одному з даних першого й другого важкого ланцюга амінокислоти в положеннях, відповідних до положень L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F і E, відповідно.

В одному втіленні й у першому, і в другому важкому ланцюзі амінокислоти в положеннях, відповідних до положень L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F і E, відповідно.

У кращому втіленні щонайменше в одному з даних першого й другого важкого ланцюга амінокислоти в положеннях, відповідних до положень L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

В особливо кращому втіленні й у першому, і в другому важкому ланцюзі амінокислоти в положеннях, відповідних до положень L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

В іншому особливо кращому втіленні антитіло є біспецифічним антитілом, яке містить перший і другий важкий ланцюг, причому положення, відповідні до положень L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU і в першому важкому ланцюзі, і в другому важкому ланцюзі представлені F і E, відповідно, при цьому (i) положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у першому важкому ланцюзі представлене L, а положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у другому важкому ланцюзі представлене R,

або ж (ii) положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у першому важкому ланцюзі представлено R, а положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у другому важкому ланцюзі представлено L.

В іншому особливо кращому втіленні антитіло є біспецифічним антитілом, яке містить перший і другий важкий ланцюг, причому положення, відповідні до положень L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU і в першому важкому ланцюзі, і в другому важкому ланцюзі представлені F, E і A, відповідно, при цьому (i) положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у першому важкому ланцюзі представлено L, а положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у другому важкому ланцюзі представлено R, або ж (ii) положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у першому важкому ланцюзі представлено R, а положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у другому важкому ланцюзі представлено L.

Варіанти антитіл, які містять комбінацію трьох амінокислотних замінів L234F, L235E і D265A поряд з мутацією K409R або F405L, позначаються тут суфіксом "FEAR" або "FEAL", відповідно.

При цьому huCD3-H1L1 означає гуманізоване антитіло SP34 проти CD3, у якого послідовності V_H і V_L наведені в SEQ ID NOs: 25 і 29.

У кращому втіленні біспецифічні антитіла за винаходом містять:

(i) половинку молекули антитіла, яка походить з IgG1-huCD3-H1L1-FEAL, і половинку молекули антитіла, яка походить з IgG1-PDL1-338-FEAR, IgG1-PDL1-511-FEAR або IgG1-PDL1-547-FEAR, або

(ii) половинку молекули антитіла, яка походить з IgG1-huCD3-H1L1-FEAL, і половинку молекули антитіла, яка походить з IgG1-PDL1-338-FEAL, IgG1-PDL1-511-FEAL або IgG1-PDL1-547-FEAL.

У наступному втіленні перший важкий ланцюг або половинка молекули містить послідовність, наведену в SEQ ID NO: 90, а другий важкий ланцюг містить послідовність, наведену в SEQ ID NO: 89.

У наступному втіленні винаходу одне або обидва антитіла, що входять до складу біспецифічного антитіла, зазнали інженерії для зниження або підвищення зв'язування з неонатальним Fc-рецептором (FcRn) з метою зміни часу напівжиття біспецифічного антитіла в сироватці. Способи збільшення або зменшення часу напівжиття в сироватці добре відомі в даній області. Приміром, див. Dall'acqua et al., 2006, J. Biol. Chem., 281:23514-24; Hinton et al., 2006, J. Immunol., 176:346-56; і Zalevsky et al., 2010, Nat. Biotechnol., 28:157-9.

Кон'югати

У наступному аспекті даного винаходу передбачені антитіла, які зв'язані або кон'юговані з однією або декількома терапевтичними молекулами типу цитокінів, імунодепресантів, імуностимуляторів і/або радіоізотопів. Такі кон'югати приводяться тут як "імунокон'югати" або "лікарські кон'югати". імунокон'югати, що включають один або декілька цитотоксинів, іменуються "імунотоксинами".

В одному втіленні перша й/або друга послідовність Fc кон'югована з лікарським препаратом або проліками або містить акцепторну групу для нього. Такою акцепторною групою, напр., може бути неприродна амінокислота.

Композиції

У наступному аспекті винаходу передбачені фармацевтичні композиції, які містять антитіло відповідно до будь-якого з наведених тут втілень і фармацевтично прийнятний носій.

Фармацевтичні композиції даного винаходу можуть містити одне антитіло за даним винаходом або комбінацію різних антитіл за даним винаходом.

Фармацевтичні композиції можуть бути складені за традиційними методиками типу наведених в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть містити, напр., розріджувачі, наповнювачі, солі, буфери, детергенти (напр., неіонні детергенти типу Tween-20 або Tween-80), стабілізатори (напр., цукри або позбавлені білків амінокислоти), консерванти, фіксатори тканин, солюбілізатори й/або інші матеріали, придатні для включення у фармацевтичні композиції.

Фармацевтично прийнятні носії включають усілякі придатні розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні й протигрибкові засоби, засоби для підтримки ізотонічності, антиоксиданти й засоби, які сповільнюють усмоктування, і т.п., які фізіологічно сумісні з антитілами даного винаходу. Приклади придатних водних і неводних носіїв, які можна використовувати у фармацевтичних композиціях даного винаходу, включають воду, сольовий розчин, фізрозчин з фосфатним буфером, етанол, декстрозу, поліолі (як от гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь і ін.) і придатні суміші з них, рослинні олії, колоїдні розчини карбоксиметилцелюлози, трагакантову камедь і органічні складні ефіри для ін'єкцій типу етилолеата й/або різні буфери. Фармацевтично прийнятні носії включають стерильні водяні розчини або дисперсії й стерильні порошки для приготування ex tempore стерильних розчинів або дисперсій для ін'єкцій. Належну плинність можна підтримувати, приміром, за допомогою матеріалів для покриття типу лецитина, шляхом підтримки необхідного розміру часток у випадку дисперсій і використання поверхнево-активних речовин.

Фармацевтичні композиції даного винаходу також можуть містити фармацевтично прийнятні антиоксиданти, наприклад: (1) водорозчинні антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота, цистеїн

гідрохлорид, бісульфат натрію, метабісульфіт натрію, сульфід натрію й ін.; (2) жиророзчинні антиоксиданти, такі як аскорбілпальмітат, бутильований гідроксианізол, бутильований гідрокситолуол, лецитин, пропілгалат, α -токоферол і ін.; і (3) хелатори металів, такі як лимонна кислота, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), сорбіт, винна кислота, фосфорна кислота й ін.

Фармацевтичні композиції даного винаходу також можуть містити у своєму складі засоби для підтримки ізотонічності типу цукрів, поліспиртів, як от маніт, сорбіт, гліцерин або хлорид натрію.

Фармацевтичні композиції даного винаходу також можуть містити одну або декілька допоміжних речовин, придатних для обраного способу введення, як от консерванти, змочуючі речовини, емульгуючі, диспергуючі речовини, консерванти або буфери, які можуть збільшити строк придатності або ефективність фармацевтичної композиції. Антитіла за даним винаходом можуть бути складені з носіями, які будуть захищати антитіло від швидкого вивільнення, типу складу з контрольованим вивільненням, включаючи імплантати, трансдермальні пластири й мікрокапсульовані системи доставки. Такі носії можуть включати желатин, гліцерилмоностеарат, гліцерилдистеарат, біорозкладані, біосумісні полімери, такі як етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоефіри й полімолочна кислота, самі по собі або ж з воском або з іншими матеріалами, добре відомими в даній області. Способи одержання таких складів у загальному відомі фахівцям у даній області.

Стерильні розчини для ін'єкцій можуть бути приготовлені шляхом включення активної сполуки в необхідній кількості в придатний розчинник з одним або з комбінацією інгредієнтів, напр., перерахованих вище, як буде потрібно, з наступною стерилізацією мікрофільтруванням. Дисперсії зазвичай одержують шляхом включення активної сполуки в стерильний носій, що містить основне дисперсійне середовище й інші необхідні інгредієнти, напр., з перерахованих вище. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних розчинів для ін'єкцій приклади способів одержання включають вакуумне сушіння й сублімаційне сушіння (ліофілізацію), які дають порошок активного інгредієнта плюс будь-яких необхідних додаткових інгредієнтів з попередньо стерилізованого фільтруванням розчину.

Фактичні рівні дозування активних інгредієнтів у фармацевтичних композиціях можуть варіюватися для того, щоб одержати кількість активного інгредієнта, яка ефективна для досягнення необхідної терапевтичної відповіді для даного пацієнта, композиції й способу введення без токсичності для пацієнта. Обраний рівень дозування буде залежати від багатьох фармакокінетичних факторів, включаючи активність конкретної композиції за даним винаходом або її аміді, способу введення, часу введення, швидкості виведення даної сполуки, тривалості лікування, інших ліків, сполук і/або матеріалів, використовуваних у комбінації з даною композицією, віку, статі, ваги, захворювання, загального стану здоров'я, історії хвороби даного пацієнта й тому подібних факторів, добре відомих в області медицини.

Фармацевтичні композиції можна вводити будь-яким придатним способом і за будь-якою схемою. В одному втіленні фармацевтичні композиції даного винаходу вводяться парентерально. При цьому "уводиться парентерально" означає способи введення, відмінні від ентерального й місцевого введення, зазвичай за допомогою ін'єкції, і включає епідермальні, внутрішньовенні, внутрішньом'язові, внутрішньоартеріальні, інтратекальні, інтракапсулярні, внутрішньоочочові, внутрішньосерцеві, інтрадермальні, внутрішньоочеревинні, інтратендонні, транстрахеальні, підшкірні, субкутикулярні, внутрішньосуглобні, субкапсулярні, субарахноїдальні, інтраспинальні, внутрішньочерепні, внутрішньогрудні, епідуральні й інтрастернальні ін'єкції й інфузії.

В одному втіленні такі фармацевтичні композиції вводяться за допомогою внутрішньовенної або підшкірної ін'єкції або інфузії.

Застосування

В одному аспекті винаходу передбачені антитіла відповідно до будь-якого з наведених тут втілень або наведені тут фармацевтичні композиції для застосування як лікарських засобів.

В іншому аспекті винаходу передбачені антитіла відповідно до будь-якого з наведених тут втілень або наведені тут фармацевтичні композиції для застосування при лікуванні захворювань типу раку.

У наступному аспекті винаходу передбачений спосіб лікування захворювань, який включає введення суб'єктові, який цього потребує ефективної кількості антитіла відповідно до будь-якого з наведених тут втілень або наведеної тут фармацевтичної композиції.

Зокрема, біспецифічні антитіла за винаходом можуть бути корисними в терапевтичних умовах, при яких потрібне специфічне наведення й опосередковане Т-клітинами знищення клітин, експресуючих PD-L1, причому при деяких таких показаннях і умовах вони можуть бути більш ефективними в порівнянні зі звичайними антитілами проти PD-L1.

Антитіла за винаходом також мають додаткове застосування в терапії й діагностиці різних захворювань, пов'язаних з PD-L1. Наприклад, антитіла можна використовувати для виявлення *in vivo* або *in vitro* однієї або декількох з наступних біологічних активностей: інгібування росту й/або диференціювання клітин, експресуючих PD-L1; знищення клітин, експресуючих PD-L1; опосередкування фагоцитозу або ADCC клітин, експресуючих PD-L1, у присутності ефекторних клітин

людини; опосередкування CDC клітин, експресуючих PD-L1, у присутності комплементу; опосередкування апоптозу клітин, експресуючих PD-L1; і/або індукування транслокації у ліпідні острівці при зв'язуванні PD-L1.

В одному аспекті винаходу передбачені антитіла відповідно до будь-якого з наведених тут втілень або наведені тут фармацевтичні композиції для застосування при лікуванні раку.

В іншому аспекті винаходу передбачені антитіла відповідно до будь-якого з наведених тут втілень або наведені тут фармацевтичні композиції для застосування при лікуванні ракових захворювань, що характеризуються наявністю солідних пухлин.

У наступному аспекті винаходу передбачені антитіла відповідно до будь-якого з наведених тут втілень або наведені тут фармацевтичні композиції для застосування при лікуванні ракових захворювань, обраних із групи, яка складається з меланоми, раку яєчників, раку легенів, колоректального раку, раку голови й шиї, раку шлунка, раку молочної залози, раку нирок, раку сечового міхура, раку стравоходу, раку підшлункової залози, раку печінки, тімоми й карциноми тимуса, раку мозку, гліоми, адренкортикального раку, раку щитовидної залози, різних раків шкіри, саркоми, множинної мієломи, лейкемії, лімфоми, мієлодиспластичних синдромів, раку яєчників, раку ендометрію, раку простати, раку статевого члена, лімфоми Ходжкіна, неходжкінської лімфоми, карциноми клітин Меркеля й мезотеліоми.

У наступному аспекті винаходу передбачене застосування антитіл відповідно до будь-якого з наведених тут втілень для виготовлення лікарських засобів типу лікарських засобів для лікування раку, напр., ракових захворювань, що характеризуються наявністю солідних пухлин, або ракових захворювань, обраних із групи, яка складається з меланоми, раку яєчників, раку легенів, раку товстої кишки й раку голови й шиї.

Даним винаходом також передбачений спосіб інгібування росту й/або проліферації однієї або декількох пухлинних клітин, експресуючих PD-L1, що включає введення особі, яка цього потребує, антитіла за даним винаходом.

Даним винаходом також передбачений спосіб лікування раку, що включає:

- а) вибір суб'єкта, який страждає на рак, який включає пухлинні клітини, експресуючі PD-L1, і
- б) введення суб'єктові антитіла за даним винаходом або фармацевтичної композиції за даним винаходом.

Схеми дозування у вищенаведених способах лікування й застосування підбираються так, щоб забезпечити оптимальну бажану відповідь (напр., терапевтичну відповідь). Наприклад, можна вводити одним болюсом, можна вводити кілька дробових доз за часом або ж пропорційно знижувати або підвищувати дозу залежно від вимог терапевтичної ситуації. Парентеральні композиції можуть бути складені у вигляді стандартної дозової форми для легкості введення й однорідності дозування.

Ефективні дозування й схеми дозування антитіл залежать від захворювання або стану, що підлягає лікуванню, й можуть бути визначені фахівцями в даній області. Типовий необмежувальний діапазон для терапевтично ефективної кількості сполук даного винаходу становить від 0,001 до 10 мг/кг, як от від 0,001 до 5 мг/кг, приміром, від 0,001 до 2 мг/кг, як от від 0,001 до 1 мг/кг, наприклад, приблизно 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 або 10 мг/кг. Інший типовий необмежувальний діапазон для терапевтично ефективної кількості антитіл даного винаходу становить від 0,1 до 100 мг/кг, як от від 0,1 до 50 мг/кг, приміром, від 0,1 до 20 мг/кг, як от від 0,1 до 10 мг/кг, наприклад, приблизно 0,5, 0,3, 1,0, 3, 5 або 8 мг/кг.

Лікар або ветеринар з рядовою кваліфікацією в даній області може легко визначити й призначити ефективну кількість необхідної фармацевтичної композиції. Наприклад, лікар або ветеринар може почати дозування антитіла, використововуваного у фармацевтичній композиції, з меншого рівня, ніж потрібно для досягнення необхідного терапевтичного ефекту, і поступово збільшувати дозування доти, поки не буде досягнутий необхідний ефект. Загалом добовою додатною дозою антитіл даного винаходу буде така кількість сполуки, яка становить найменшу дозу, ефективну для одержання терапевтичного ефекту. Уведення може здійснюватися, напр., парентерально, як от внутрішньовенно, внутрішньом'язово або підшкірно. В одному втіленні антитіла можна вводити уливанням за щотижневою схемою в перерахуванні на мг/м². Такі дозування, приміром, можуть ґрунтуватися на наведених вище дозуваннях у мг/кг за наступним правилом: доза (мг/кг) × 70:1,8. Таке введення може повторюватися, напр., від 1 до 8 разів, як от від 3 до 5 разів. Уведення може проводитися шляхом безперервної інфузії протягом від 2 до 24 годин, як от від 2 до 12 годин. В одному втіленні антитіла можна вводити шляхом повільного безперервного уливання протягом тривалого часу типу більше 24 годин, щоб зменшити токсичні побічні ефекти.

В одному втіленні антитіла можна вводити за щотижневою схемою в перерахуванні на фіксовану дозу аж до 8 разів, як от від 4 до 6 разів при введенні 1 раз на тиждень. Такий режим можна повторювати один або кілька разів у міру необхідності, приміром, через 6 місяців або 12 місяців. Такі фіксовані дозування, приміром, можуть ґрунтуватися на наведених вище дозуваннях у мг/кг, з оцінкою маси тіла 70 кг. Дозування можна визначати або підбирати шляхом вимірювання кількості антитіл даного винаходу в крові після введення, наприклад, шляхом відбору біологічних зразків і використання

антіідиотипічних антитіл, спрямованих на антигензв'язуючу область антитіл даного винаходу, що зв'язують антиген PD-L1.

В одному втіленні антитіла можна вводити в якості підтримуючої терапії, як от, напр., один раз на тиждень протягом 6 місяців або більше.

Антитіла також можна вводити профілактично для зниження ризику виникнення раку, затримки початку виникнення події при прогресуванні раку й/або зниження ризику рецидиву, якщо рак перебуває в стадії ремісії.

Антитіла за винаходом також можна вводити при комбінованій терапії, тобто в комбінації з іншими терапевтичними засобами, що відносяться до захворювання або стану, який підлягає лікуванню. Відповідно, в одному втіленні лікарський засіб, який містить антитіло призначається в комбінації з одним або декількома іншими терапевтичними засобами типу цитотоксичних, хіміотерапевтичних або антиангіогенних засобів.

У наступному аспекті винаходу передбачені антіідиотипічні антитіла, які зв'язуються з ділянкою зв'язування PD-L1, як визначено в кожному з наведених тут втілень.

Додаткові пункти даного опису

1. Антитіло, яке містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому антитіло інгібує зв'язування PD-L1 людини з PD-1 людини й

(i) конкурує за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, що містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15 [511], але не конкурує за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22 [547], або

(ii) конкурує за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22 [547], але не конкурує за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15 [511].

2. Антитіло за п. 1, при цьому дане антитіло конкурує за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 5 [338].

3. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому зв'язування даного антитіла з PD-L1 людини не зміщується антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 53, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 57 [476].

4. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому зв'язування даного антитіла з PD-L1 людини не блокується при зв'язуванні антитіла, що містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 106, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 110 [625].

5. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому зв'язування даного антитіла з PD-L1 людини блокується антитілом, що містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22 [547].

6. Антитіло за п. 1, при цьому дане антитіло:

(i) здатне зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 5 [338], або

(ii) здатне зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15 [511], або

(iii) здатне зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22 [547].

7. Антитіло за будь-яким із пп. 1-4 і 6, при цьому зв'язування антитіла з мутантним PD-L1, у якому один або кілька амінокислотних залишків у положеннях, відповідних до положень 113 (R113), 123 (Y123) і 125 (R125) в SEQ ID NO: 94, замінені на аланін, знижується в порівнянні зі зв'язуванням з PD-L1 дикого типу, що мають амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 94; причому зниження зв'язування визначається як кратність зміни у зв'язуванні даного антитіла, яка менше середньої кратності змін у зв'язуванні по всіх аланінових мутантах – $1,5 \times SD$, де SD означає стандартне відхилення по всіх розрахованих змінах для зв'язування антитіла з мутантним PD-L1, а кратність змін у зв'язуванні розраховується, як описано в Прикладі 13 [338].

8. Антитіло за будь-яким із пп. 1-2 і 6, при цьому дане антитіло зв'язується з епітопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причому даний епітоп містить амінокислотний залишок у положенні 113 (R113), амінокислотний залишок у положенні 123 (Y123) і/або амінокислотний залишок у положенні 125 (R125) SEQ ID NO: 94.

9. Антитіло за будь-яким із пп. 1, 3, 4 і 6, при цьому зв'язування антитіла з мутантним PD-L1, у якому один або кілька амінокислотних залишків у положеннях, відповідних до положень 19 (F19), 42 (F42), 45 (E45), 46 (K46), 94 (L94) і 116 (I116) в SEQ ID NO: 94, замінені на аланін, знижується в порівнянні з PD-L1 дикого типу, що мають амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 94; причому зниження зв'язування визначається як кратність зміни у зв'язуванні даного антитіла, яка менше середньої кратності змін у зв'язуванні по всіх аланінових мутантах – $1,5 \times SD$, де SD означає

стандартне відхилення по всіх розрахованих змінах для зв'язування антитіла з мутантним PD-L1, а кратність змін у зв'язуванні розраховується, як описано в Прикладі 13 [511].

10. Антитіло за будь-яким із пп. 1, 3, 4 і 6, при цьому дане антитіло зв'язується з епітопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причому даний епітоп містить амінокислотний залишок у положенні 45 (E45), амінокислотний залишок у положенні 46 (K46) і/або амінокислотний залишок у положенні 94 (L94) SEQ ID NO: 94.

11. Антитіло за будь-яким із пп. 1, 5 і 6, при цьому зв'язування антитіла з мутантним PD-L1, у якому один або кілька амінокислотних залишків у положеннях, відповідних до положень 58 (E58) і 113 (R113) в SEQ ID NO: 94, замінені на аланін, знижується в порівнянні з PD-L1 дикого типу, що мають амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 94; причому зниження зв'язування визначається як кратність зміни у зв'язуванні даного антитіла, яка менше середньої кратності змін у зв'язуванні по всіх аланінових мутантах – $1,5 \times SD$, де SD означає стандартне відхилення по всіх розрахованих змінах для зв'язування антитіла з мутантним PD-L1, а кратність змін у зв'язуванні розраховується, як описано в Прикладі 13 [547].

12. Антитіло за будь-яким із пп. 1, 5 і 6, при цьому дане антитіло зв'язується з епітопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причому даний епітоп містить амінокислотний залишок у положенні 58 (E58) і/або амінокислотний залишок у положенні 113 (R113) SEQ ID NO: 94.

13. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, причому послідовність CDR3 V_H обрана із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 і SEQ ID NO: 21.

14. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 2, 3 і 4, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 6, послідовність KAS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 7, відповідно [338], або

(ii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 9, 10 і 11, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 16, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 17, відповідно [511], або

(iii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 19, 20 і 21, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 23, послідовність DDN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 24, відповідно [547].

15. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , обраній із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 18.

16. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , обраній із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 22.

17. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведений в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведений в SEQ ID NO: 5 [338], або

(ii) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведений в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведений в SEQ ID NO: 15 [511], або

(iii) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведений в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведений в SEQ ID NO: 22.

щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведений в SEQ ID NO: 22 [547].

18. Антитіло за п. 17, при цьому кожна з послідовностей V_H і V_L містить три послідовності CDR: CDR1, CDR2 і CDR3, відповідно, і чотири каркасні послідовності: FR1, FR2, FR3 і FR4, відповідно, причому відповідні сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_H щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1, FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_H , а послідовності CDR V_H не мутовані, при цьому відповідні сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_L щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1, FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_L , а послідовності CDR V_L не мутовані.

19. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому дане антитіло здатне індукувати дозозалежний лізис епітеліальних клітин аденокарциноми типу MDA-MB-231 за допомогою антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC).

20. Антитіло за п. 19, при цьому дане антитіло здатне зменшити кількість клітин у культурі даних епітеліальних клітин щонайменше на 5 %, як от щонайменше на 6 %, 7 %, 8 %, 9 % або щонайменше на 10 % у результаті лізису клітин.

21. Антитіло за п. 19 або 20, при цьому ADCC визначається *in vitro* за вивільненням ^{51}Cr типу методики, наведеної в прикладі 14.

22. Антитіло за будь-яким із пп. 19-20, при цьому ADCC визначається *in vitro* шляхом інкубації епітеліальних клітин з композицією, яка містить антитіло й ефektorні клітини типу мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC), протягом 4 годин при 37 °C, 5 % CO_2 , при цьому вміст антитіл у композиції перебуває в межах 0,1-1 мкг/мл, а співвідношення ефektorних клітин до епітеліальних клітин становить 100:1.

23. Антитіло за п. 19 або 20, при цьому лізис епітеліальних клітин визначається *in vitro* методом аналізу репортера-люциферази в якості показника ADCC типу люмінесцентного біоаналіза репортера ADCC, викладеного в прикладі 14.

24. Антитіло за п. 23, при цьому ADCC визначається *in vitro* шляхом:

(i) контактування культури епітеліальних клітин з композицією, яка містить антитіло й Т-клітини Jurkat людини, стабільно експресуючі FcγRIIIa (CD16) і люциферазу світлячка (ефektorні клітини), при співвідношенні ефektorні клітини:епітеліальні клітини 1:1,

(ii) доведення культури епітеліальних клітин і ефektorних клітин до кімнатної температури протягом 15 хвилин,

(iii) інкубування культури епітеліальних клітин і ефektorних клітин із субстратом люциферази,

(iv) визначення продукції люциферази в даній культурі клітин;

при цьому вміст антитіл у композиції перебуває в межах 0,5-250 нг/мл, а співвідношення ефektorних клітин до епітеліальних клітин становить 1:1.

25. Антитіло за будь-яким із пп. 19, 20, 23 і 24, при цьому ADCC епітеліальних клітин визначається методом аналізу репортера-люциферази типу репортерного аналізу за п. 23 або 24, при цьому ADCC, яка спостерігається після інкубації культури епітеліальних клітин з досліджуваною композицією, яка містить дане антитіло, щонайменше в 1,5 рази більше тієї ADCC, яка спостерігається після інкубації культури епітеліальних клітин з композицією, яка містить контрольне антитіло; ADCC визначається у відносних одиницях люмінесценції (RLU), причому концентрація антитіл у досліджуваній композиції й у композиції, яка містить контрольне антитіло, однакова й перебуває в межах від 20 до 250 нг/мл, а контрольне антитіло обране з:

а) антитіла, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 74, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 78; і

б) антитіла, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 81, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 85.

26. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 5 [338], або

(ii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15 [511], або

(iii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22 [547].

27. Антитіло, яке містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, причому дане антитіло включає:

(i) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 33, 34 і 35, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить

CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 37, послідовність KAS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 38, відповідно [321], або

(ii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 47, 48 і 49, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 51, послідовність DVI і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 52, відповідно [421], або

(iii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 54, 55 і 56, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 58, послідовність RDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 59, відповідно [476], або

(iv) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 61, 62 і 63, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 65, послідовність DDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 66, відповідно [516], або

(v) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 107, 108 і 109, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 111, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 113, відповідно [625], або

(vi) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 68, 69 і 70, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 72, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 73, відповідно [632].

28. Антитіло за п. 27, при цьому дане антитіло включає:

(i) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 32, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 36 [321], або

(ii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 46, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 50 [421], або

(iii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 53, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 57 [476], або

(iv) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 60, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 64 [516], або

(v) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 106, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 110 [625], або

(vi) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 67, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 71 [632].

29. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому дане антитіло є моновалентним.

30. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому дане антитіло є бівалентне антитіло, яке містить дві антигензв'язуючі ділянки, здатні зв'язуватися з PD-L1 людини, при цьому дані дві антигензв'язуючі ділянки мають ідентичні послідовності варіабельної області.

31. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому дане антитіло є бівалентне біспецифічне антитіло, яке на додаток до першої антигензв'язуючої ділянки, здатної зв'язуватися з PD-L1 людини, містить другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому другим антигеном не є CD3ε людини.

32. Біспецифічне антитіло, яке містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε (епсilon) людини, причому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, має ознаки, наведені в будь-якому з попередніх пунктів.

33. Біспецифічне антитіло за п. 32, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε людини, включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно.

34. Біспецифічне антитіло за п. 32 або 33, яке включає:

(i) антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, що включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 2, 3 і 4, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 6, послідовність KAS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 7 [338], відповідно, і антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, що включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(ii) антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, що включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 9, 10 і 11, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 16, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 17 [338], відповідно, і антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, що включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(iii) антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, що включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 19, 20 і 21, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 23, послідовність DDN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 24 [547], відповідно, і антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, що включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно.

35. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 32-34, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε людини, включає послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 25, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29.

36. Біспецифічне антитіло за п. 32, при цьому дане біспецифічне антитіло:

(i) має більш низьку спорідненість зв'язування з CD3ε людини в порівнянні з антитілом, яке містить антигензв'язуючу ділянку, що включає послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 25, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, причому переважно дана спорідненість щонайменше в 2 рази нижче, напр., щонайменше в 5 разів нижче, як от щонайменше в 10 разів нижче, напр., щонайменше в 25 разів нижче, напр., щонайменше в 50 разів нижче, і

(ii) здатне опосередковувати залежну від концентрації цитотоксичність для клітин MDA-MB-231, клітин PC-3 і/або клітин HELA при використанні PBMC або очищених Т-клітин у якості ефektorних клітин, напр., при такому аналізі, як описано тут у Прикладі 11.

37. Біспецифічне антитіло за п. 36, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε людини, включає:

(i) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), яка містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 99, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(ii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 100, 27 і 28, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(iii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 101, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(iv) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 102, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(v) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 103, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(vi) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 104, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно, або

(vii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NOs: 26, 27 і 105, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 30, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 31, відповідно.

38. Біспецифічне антитіло за п. 36 або 37, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε людини, включає:

- (i) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 39, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, або
- (ii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 40, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, або
- (iii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 41, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, або
- (iv) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 42, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, або
- (v) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 43, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, або
- (vi) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 44, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29, або
- (vii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 45, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 29.

39. Мультиспецифічне антитіло, яке містить першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, має ознаки, наведені в будь-якому з пунктів 1-31.

40. Мультиспецифічне антитіло за п. 39, при цьому антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, причому послідовність CDR3 V_H обрана із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 4 [338], SEQ ID NO: 11 [511] і SEQ ID NO: 21 [547].

41. Мультиспецифічне антитіло за п. 40, при цьому перша антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 2, 3 і 4, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 6, послідовність KAS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 7, відповідно [338], або

(ii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 9, 10 і 11, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 16, послідовність EDS і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 17, відповідно [511], або

(iii) варіабельну область важкого ланцюга (V_H), що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3, наведені в SEQ ID NOs: 19, 20 і 21, відповідно, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), що містить CDR1, CDR2 і CDR3, що мають послідовність, наведену в SEQ ID NO: 23, послідовність DDN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 24, відповідно [547].

42. Мультиспецифічне антитіло за п. 40 або 41, при цьому перша антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , обраній із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 1 [338], SEQ ID NO: 8 [511] і SEQ ID NO: 18 [547].

43. Мультиспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 40-42, при цьому перша антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , обраній із групи, яка складається з послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 5 [338], SEQ ID NO: 15 [511] і SEQ ID NO: 22 [547].

44. Мультиспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 40-43, при цьому перша антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведений в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведений в SEQ ID NO: 5 [338], або

(ii) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведений в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведений в SEQ ID NO: 15 [511], або

(iii) послідовність V_H , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_H , наведений в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , яка щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності V_L , наведений в SEQ ID NO: 22 [547].

45. Мультиспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 40-44, при цьому кожна з послідовностей V_H і V_L містить три послідовності CDR: CDR1, CDR2 і CDR3, відповідно, і чотири каркасні послідовності: FR1, FR2, FR3 і FR4, відповідно, причому відповідні сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_H щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1,

FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_H , а послідовності CDR V_H не мутовані, при цьому відповідні сукупні каркасні послідовності FR1, FR2, FR3 і FR4 з V_L щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 97 % або щонайменше на 99 % ідентичні за амінокислотною послідовністю відповідним сукупним каркасним послідовностям FR1, FR2, FR3 і FR4 з даних послідовностей V_L , а послідовності CDR V_L не мутовані.

46. Мультиспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 40-45, при цьому перша антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, включає:

(i) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 5 [338], або

(ii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15 [511], або

(iii) послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22 [547].

47. Мультиспецифічне антитіло, яке містить першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому дане антитіло:

(i) конкурує за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15, але не конкурує за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22, або

(ii) конкурує за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22, але не конкурує за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15.

48. Мультиспецифічне антитіло за п. 47, при цьому дане антитіло конкурує за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 5.

49. Мультиспецифічне антитіло, яке містить першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому зв'язування даного антитіла з PD-L1 людини не витісняється антитілом, що містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 53, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 57.

50. Мультиспецифічне антитіло за п. 49, при цьому антитіло інгібує зв'язування PD-L1 людини з PD-1 людини.

51. Мультиспецифічне антитіло за п. 49 або 50, при цьому антитіло конкурує за зв'язування з PD-L1 людини з антитілом, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22.

52. Мультиспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 49-51, при цьому зв'язування даного антитіла з PD-L1 людини блокується антитілом, що містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22.

53. Мультиспецифічне антитіло, яке містить першу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, і другу антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися із другим антигеном або з іншим епітопом PD-L1 людини, причому перша антигензв'язуюча ділянка:

(i) здатна зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 1, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 5 [338], або

(ii) здатна зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 8, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 15 [511], або

(iii) здатна зв'язуватися з тим же епітопом PD-L1 людини, що й антитіло, яке містить послідовність V_H , наведену в SEQ ID NO: 18, і послідовність V_L , наведену в SEQ ID NO: 22 [547].

54. Мультиспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 40-53, при цьому антитіло є біспецифічним.

55. Мультиспецифічне антитіло за п. 54, при цьому антитіло є бівалентним.

56. Мультиспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 40-55, при цьому антитіло здатне зв'язуватися із другим антигеном, причому другий антиген не представлений CD3 ϵ людини.

57. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антитіло є повнорозмірним антитілом.

58. Антитіло за п. 57, при цьому антитіло є повнорозмірним антитілом IgG1.

59. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антитіло є фрагментом антитіла.

60. Антитіло за будь-яким із пп. 32-59, при цьому антитіло містить дві половинки молекули, кожна з яких містить антигензв'язуючу ділянку, причому:

(i) половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, є химерною, і/або

(ii) половинка молекули, яка містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3 ϵ (епсилон) людини, якщо вона присутня, є химерною.

61. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому:

- (i) антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, є гуманізованою, і/або
- (ii) антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε (епсилон) людини, якщо вона присутня, є гуманізованою.

62. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому:

- (i) антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з PD-L1 людини, є людською, і/або
- (ii) антигензв'язуюча ділянка, здатна зв'язуватися з CD3ε (епсилон) людини, якщо вона присутня, є людською.

63. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому кожна антигензв'язуюча ділянка включає варіабельну область важкого ланцюга (V_H) і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), причому кожна з даних варіабельних областей містить три послідовності CDR: CDR1, CDR2 і CDR3, відповідно, і чотири каркасні послідовності: FR1, FR2, FR3 і FR4, відповідно.

64. Антитіло за п. 63, при цьому антитіло містить дві константні області важкого ланцюга (C_H) і дві константні області легкого ланцюга (C_L).

65. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антитіло містить перший і другий важкий ланцюг, причому кожен з даних першого й другого важких ланцюгів включає щонайменше шарнірну ділянку й ділянки CH2 і CH3, причому в першого важкого ланцюга була замінена, щонайменше, одна з амінокислот у положенні, відповідному до положення, обраного із групи, яка складається з T366, L368, K370, D399, F405, Y407 і K409 (за нумерацією EU), і в другого важкого ланцюга була замінена, щонайменше, одна з амінокислот у положенні, відповідному до положення, обраного із групи, яка складається з T366, L368, K370, D399, F405, Y407 і K409 (за нумерацією EU), при цьому в даних першому й другому важких ланцюгах заміни перебувають не в однакових положеннях.

66. Антитіло за п. 65, при цьому (i) амінокислота в положенні, що відповідає F405 (за нумерацією EU), представлена L у даному першому важкому ланцюзі, а амінокислота в положенні, що відповідає K409 (за нумерацією EU), представлена R у даному другому важкому ланцюзі, або ж (ii) амінокислота в положенні, що відповідає K409 (за нумерацією EU), представлена R у даному першому важкому ланцюзі, а амінокислота в положенні, що відповідає F405 (за нумерацією EU), представлена L у даному другому важкому ланцюзі.

67. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому дане антитіло містить перший і другий важкий ланцюг, причому один або обидва важкі ланцюги модифіковані для того, щоб антитіло індукувало Fc-опосередковану ефекторну функцію меншою мірою в порівнянні з таким антитілом, яке ідентичне за винятком того, що містить немодифікований перший і другий важкий ланцюг.

68. Антитіло за п. 67, при цьому Fc-опосередкована ефекторна функція вимірюється за опосередкованою Fc експресією CD69, за зв'язуванням з Fcγ-рецепторами, за зв'язуванням з C1q або за індукцією Fc-опосередкованого перехресного зшивання FcR.

69. Антитіло за п. 67 або 68, при цьому константні послідовності важкого й легкого ланцюга були модифіковані для того, щоб у даного антитіла Fc-опосередкована експресія CD69 знижувалася щонайменше на 50 %, на 60 %, на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 99 % або 100 % у порівнянні з антитілом дикого типу, при цьому така Fc-опосередкована експресія CD69 визначається при функціональному аналізі на основі PBMC.

70. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому дане антитіло містить перший і другий важкий ланцюг, причому щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів одна або декілька амінокислот у положеннях, відповідних до положень L234, L235, D265, N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, не представлені L, L, D, N і P, відповідно.

71. Антитіло за п. 70, при цьому положення, відповідні до положень L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, представлені F і E, відповідно, у даних першому й другому важких ланцюгах.

72. Антитіло за п. 71, при цьому антитілом є біспецифічне антитіло, яке містить перший і другий важкий ланцюг, причому положення, відповідні до положень L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, і в першому важкому ланцюзі, і в другому важкому ланцюзі представлені F і E, відповідно, при цьому (i) положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, в першому важкому ланцюзі представлене L, а положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у другому важкому ланцюзі представлене R, або ж (ii) положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у першому важкому ланцюзі представлене R, а положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у другому важкому ланцюзі представлене L.

73. Антитіло за п. 70, при цьому положення, відповідні до положень L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, представлені F, E і A, відповідно, у даних першому й другому важких ланцюгах.

74. Антитіло за п. 73, при цьому антитілом є біспецифічне антитіло, яке містить перший і другий важкий ланцюг, причому положення, відповідні до положень L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, і в першому важкому ланцюзі, і в другому важкому ланцюзі представлені F

і Е, відповідно, при цьому (і) положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у першому важкому ланцюзі представлене L, а положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у другому важкому ланцюзі представлене R, або ж (ii) положення, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у першому важкому ланцюзі представлене R, а положення, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини за нумерацією EU, у другому важкому ланцюзі представлене L.

75. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антитіло не зв'язується з PD-L2 людини.

76. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антитіло зв'язується з PD-L1 людини зі значенням K_D 10^{-8} М або менше, як от 10^{-9} М або менше, напр., 10^{-10} М або менше при такому визначенні, як описано тут у Прикладі 8.

77. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, при цьому антитіло опосередковує залежну від концентрації цитотоксичність для клітин MDA-MB-231, клітин PC-3 і/або клітин HELA при використанні очищених Т-клітин у якості ефektorних клітин при такому аналізі, як описано тут у Прикладі 11.

78. Конструкція з нуклеїнової кислоти, яка включає:

(i) послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність важкого ланцюга антитіла, який містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, як визначено в кожному із пп. 1-31, і/або

(ii) послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність легкого ланцюга антитіла, який містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, як визначено в кожному із пп. 1-31.

79. Конструкція з нуклеїнової кислоти за п. 78, яка додатково включає:

(i) послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність важкого ланцюга антитіла, який містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, як визначено в кожному із пп. 33-38, і/або

(ii) послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність легкого ланцюга антитіла, який містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з CD3ε людини, як визначено в кожному із пп. 33-38.

80. Експресуючий вектор, який містить конструкцію з нуклеїнової кислоти за п. 78 або 79.

81. Клітина-хазяїн, яка містить конструкцію з нуклеїнової кислоти за п. 78 або 79 або експресуючий вектор за п. 80.

82. Клітина-хазяїн за п. 81, яка є клітиною ссавців типу клітин яєчників китайського хом'яка.

83. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за будь-яким із пп. 1-77 і фармацевтично прийнятний носій.

84. Антитіло за будь-яким із пп. 1-77 або фармацевтична композиція за п. 83 для застосування як лікарського засобу.

85. Антитіло за будь-яким із пп. 1-80 або фармацевтична композиція за п. 70 для застосування при лікуванні раку.

86. Антитіло за будь-яким із пп. 1-77 або фармацевтична композиція за п. 70 для застосування при лікуванні ракових захворювань, що характеризуються наявністю солідних пухлин.

87. Антитіло за будь-яким із пп. 1-78 або фармацевтична композиція за п. 70 для застосування при лікуванні ракового захворювання, обраного із групи, яка складається з меланоми, раку яєчників, раку легенів, раку товстої кишки й раку голови й шиї.

88. Спосіб лікування захворювань, який включає введення суб'єктові, який цього потребує антитіла за будь-яким із пп. 1-75 або фармацевтичної композиції за п. 83.

89. Застосування антитіла за будь-яким із пп. 1-77 для виготовлення лікарського засобу типу лікарського засобу для лікування раку, напр., ракового захворювання, що характеризується наявністю солідних пухлин, або ракового захворювання, обраного із групи, яка складається з меланоми, раку яєчників, раку легенів, раку товстої кишки й раку голови й шиї.

90. Спосіб або застосування за будь-яким із пп. 83-89, при цьому спосіб або застосування включає комбінування з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами типу хіміотерапевтичних засобів.

91. Спосіб одержання антитіла за будь-яким із пп. 1-77, що включає стадії:

а) культивування клітин-хазяїв, що виробляють перше антитіло, яке містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з PD-L1 людини, як визначено в кожному із пп. 1-13, і очищення даного першого антитіла з культури;

б) культивування клітин-хазяїв, що виробляють друге антитіло, яке містить антигензв'язуючу ділянку, здатну зв'язуватися з іншим епітопом PD-L1 або з іншим антигеном, напр., ділянку зв'язування CD3ε людини, як визначено в кожному із пп. 14-19, і очищення даного другого антитіла з культури;

с) інкубації даного першого антитіла разом із другим антитілом у відновлювальних умовах, достатніх для того, щоб цистеїни в шарнірній області піддалися ізомеризації в дисульфідний зв'язок; і

д) одержання даного біспецифічного антитіла.

92. Антиідіотипічне антитіло, яке зв'язується з антигензв'язуючою ділянкою, здатною зв'язуватися з PD-L1 людини, як визначено в кожному із пп. 1-77.

Далі даний винахід розкривається на наступних прикладах, які не слід сприймати як обмежуючі обсяг винаходу.

Приклади

Приклад 1. Одержання антитіл до PD-L1

Імунізація тварин OmniRat і одержання гібридоми

Імунізацію й одержання гібридоми проводили на фірмі Aldevron GmbH (Freiburg, Німеччина). кДНК, що кодує амінокислоти 19-238 PD-L1 людини, клонували в експресуючі плазмиди фірми Aldevron. Групи тварин OmniRat (трансгенних пацюків, експресуючих різноманітний репертуар антитіл з повністю людськими ідіотипами; Ligand Pharmaceuticals Inc., San Diego, США) імунізували шляхом внутрішньокірного введення покритих ДНК часток золота за допомогою ручного обладнання для бомбардування частками ("генної гармати"). Експресію на клітинній поверхні короточасно трансфікованих клітин НЕК перевіряли за допомогою антитіла проти PD-L1 на основі MPDL3280A фірми Genentech. Збирали зразки сироватки після серії імунізацій і тестували методом проточної цитометрії на клітинах НЕК, тимчасово трансфікованих вищезгаданими експресуючими плазмідами. Виділяли клітини, які виробляють антитіла, й зливали із клітинами мієломи миші (Ag8) за стандартними методиками. Ідентифікували гібридоми, які виробляють антитіла, специфічні до PD-L1, при скринінгу таким же методом, як описано вище. Одержували клітинні осадки позитивних клітин гібридом за допомогою захищаючого РНК реагенту (RnAlater, ThermoFisher Scientific, кат. № AM7020), а потім обробляли їх для секвенування варіабельних доменів антитіл.

Аналіз послідовностей варіабельних доменів антитіл до PD-L1 і клонування в експресуючих векторах

Виділяли тотальну РНК із $0,2-5 \times 10^6$ клітин гібридоми й одержували з неї 5'-RACE-комплементарну ДНК (кДНК) за допомогою набору для ампліфікації кДНК Smart RACE (Clontech) відповідно до інструкцій виробника. Кодуючі області V_H і V_L ампліфікували методом ПЦР і клонували в одній рамці зчитування прямо в експресуючі вектори pOMTG1f-FEAR-LIC (IgG1 людини) і pEFC33D-Kappa (каппа людини) або pOMTL-LIC (лямбда людини) методом незалежного від клонування лігування (Aslanidis C. and PJ de Jong, Nucleic Acids Res 1990, 18(20): 6069-74). У цих плазмідах послідовності антитіл експресуються за допомогою промотору CMV. Для кожного антитіла секвенували 8 клонів V_L і 8 клонів V_H . Послідовності CDR визначали згідно з визначеннями IMGT [Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999; Brochet X., Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)]. Відбирали клони із правильною відкритою рамкою зчитування (ORF) для подальшого вивчення й експресії. Продукти LEE PCR від усіх комбінацій важких ланцюгів і легких ланцюгів, які були виявлені в кожній культурі гібридом, піддавали короткостроковій спільній експресії в клітинах Expi293F за допомогою ExpiFectamine. Для кожної гібридоми відбирали пару HC/LC, яка проявляє найкраще зв'язування при скринінгу методом гомогенної дози-відповіді, у якості провідного кандидата.

Три антитіла проти PD-L1 під номерами 338, 511 і 547, відповідно, були відібрані для подальших експериментів. Послідовності їх варіабельних областей представлені тут у Переліку послідовностей.

Для антитіла IgG1-PDL1-511-FEAR створювали варіант із точковою мутацією у варіабельних доменах для того, щоб вилучити залишок цистеїну, який потенційно міг би утворювати небажані дисульфідні містки: IgG1-PDL1-511-FEAR-LC33S. Цей мутант одержували шляхом синтезу генів (Geneart).

LEE PCR

Лінійні елементи експресії (LEE) одержували шляхом ампліфікації фрагмента, який містить елементи, які містять промотор CMV, кодуючи області HC або LC і сигнал полі-А з експресуючих плазмід. Для цього ці ділянки ампліфікували за допомогою ДНК-полімерази Accuprime Taq (Life Technologies) і праймерів CMVPf(BsaI)2 і TkpA(BsaI)r, виконуючи 35 циклів по 45 секунд при 94 °C, 30 секунд при 55 °C і 2 (LC) або 3 (HC) хвилини при 68 °C, використовуючи в якості ДНК-матриці розведений в 50 разів матеріал препаратів плазмід типу miniprep.

Короткострокова експресія LEE-фрагментів у клітинах Expi293F

Для експресії LEE антитіл змішували 1,11 мкл продуктів реакції ПЦР для LEE HC і 1,11 мкл продуктів реакції ПЦР для LC і трансфікували цією сумішшю клітини Expi293F у загальному обсязі 125 мкл за допомогою ExpiFectamine 293 у якості реагенту для трансфекції згідно з інструкціями виробника (Thermo Fisher Scientific, США), використовуючи 96-ямові планшети як посудину.

Експресія антитіл

Антитіла експресували у вигляді IgG1-каппа (для 338) або IgG1-лямбда (для 511 і 547). Суміші плазмідної ДНК, які кодують важкі й легкі ланцюги антитіл, піддавали короткостроковій експресії на платформі для експресії Expi293F (Thermo Fisher Scientific, США), в основному як описано виробником.

Гомогенний аналіз зв'язування

Антитіла тестували на зв'язування гомогенним методом скринінгу доза-відповідь, використовуючи клітини CHO, трансфіковані PDL1, PDL1mm або PDL1Mf (також див. приклад 2). У якості негативного контролю використовували нетрансфіковані клітини CHO.

Клітини ($2,5 \times 10^5$ клітин/мл) змішували з козячим антитілом проти IgG людини з Alexa 647, специфічним для Fc γ -фрагмента (0,2 мкг/мл; Jackson ImmunoResearch Laboratories, 109-605-098). Готували серійні розведення досліджуваних і контрольних антитіл (від 0,001 до 3 мкг/мл при 2-кратних розведеннях) і по 2 мкл розведень антитіл додавали до 5 мкл суміші клітин з кон'югатом в 1536-ямкових планшетах (Greiner, 789866). Планшети інкубували за кімнатної температури протягом 9 годин, після чого визначали інтенсивність флуоресценції на лазерному скануючому цитометрі ImageXpress Velos (Molecular Devices).

Очищення антитіл

Супернатанти культур фільтрували через заглушені фільтри на 0,2 мкм, наносили на стовпчики MabSelect Sure 5 мол (GE Healthcare) і елюювали 0,1 М цитратом натрію-NaOH, pH 3. Елюат відразу ж нейтралізували 2М трис-HCl, pH 9 і діалізували протягом ночі до 8,7 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ NaH₂PO₄, 140,3 мМ NaCl, pH 7,4 (B.Braun або GE Healthcare). У якості альтернативи після очищення елюат наносили на стовпчик для знесолення HiPrep і антитіло переводили в буфер 8,7 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ NaH₂PO₄, 140,3 мМ NaCl, pH 7,4 (B.Braun або GE Healthcare). Після діалізу або заміни буфера зразки стерилізували фільтруванням через заглушені фільтри на 0,2 мкм. Чистоту визначали методом CE-SDS за допомогою LabChip GXII (Caliper Life Sciences, MA), а концентрацію IgG вимірювали на спектрофотометрі Nanodrop ND-1000 (Isogen Life Science, Maarssen, Нідерланди). Очищені антитіла зберігали при 4 °C.

Приклад 2. Одержання матеріалу для скринінгу

Експресуючі конструкції для PD-L1

Розробили наступні оптимізовані за кодонами конструкції для експресії повнорозмірного PD-L1: PD-L1 людини (*Homo sapiens*) (№ доступу в Genbank NP_054862), PD-L1 макаки-крабоїда (*Macaca fascicularis*) (№ доступу в Genbank XP_005581836), PD-L1 миші (*Mus musculus*) (№ доступу в Genbank NP_068693).

Крім того, розробили наступні оптимізовані за кодонами конструкції для ECD PD-L1: позаклітинний домен (ECD) PD-L1 людини (а.к. 1-238) з С-кінцевою His-міткою й С-міткою (PDLoneECDHisCtag).

Конструкції містили придатні рестрикційні сайти для клонування й оптимальну послідовність Kozak (GCCGCCACC) [Kozak et al. (1999) Gene 234: 187-208]. Конструкції клонували в експресуючому векторі рМА для ссавців (Geneart).

Експресуюча конструкція для PD-L2

Також розробили наступну оптимізовану за кодонами конструкцію для експресії повнорозмірного PD-L2: PD-L2 людини (*Homo sapiens*) (№ доступу в Genbank NP_079515).

Експресія в клітинах CHO-S

Клітини CHO-S піддавали короткостроковій трансфекції вектором рМА, що містить кодуєчу послідовність для повного PD-L1 людини, макаки-крабоїда й миші, відповідно.

Очищення PD-L1 з His-міткою

Експресували PDLoneECDHisCtag у клітинах HEK-293F. His-мітка дозволяє проводити очищення методом афінної хроматографії з іммобілізованим металом. При цьому хелатор, фіксований на хроматографічній смолі, заряджається катіонами Co²⁺. Супернатанти, які містять білок з His-міткою, інкубували зі смолою в порціонному режимі (тобто в розчині). Білок з His-міткою міцно зв'язується із гранулами смоли, тоді як інші білки, присутні в супернатанті культури, не зв'язуються або слабо зв'язуються в порівнянні з білками, які містять His-мітку. Після інкубації кульки витягали із супернатанта й упаковували в стовпчик. Колонку промивали для видалення зв'язаних білків. Потім міцно зв'язані білки з His-міткою елюювали буфером, що містить імідазол, який конкурує за зв'язування His з Co²⁺. Елюент видаляли з білка шляхом заміни буфера на колонці для знесолення.

Приклад 3. Гуманізоване антитіло до CD3 для одержання біспецифічних антитіл до CD3×PDL1

Одержання гуманізованого антитіла IgG1-huCD3-H1L1 описано в прикладі 1 з WO 2015/001085. Антитіло huCD3-H1L1-FEAL є його варіантом, що містить наступні заміни: L234F, L235E, D265A і F405L, як описано вище.

Приклад 4. Одержання біспецифічних антитіл методом індукованого 2-MEA обміну Fab-плеча

Біспецифічні антитіла типу IgG1 одержували шляхом обміну Fab-плеча в контрольованих відновлювальних умовах. Основою цього методу є використання комплементарних доменів CH3, які сприяють утворенню гетеродимерів за певних умов аналізу, як описано в WO 2011/131746. У відповідні антитіла вводили мутації F405L і K409R (за нумерацією EU) для одержання пар антитіл з комплементарними доменами CH3.

Для одержання біспецифічних антитіл два вихідні комплементарні антитіла, кожне в кінцевій концентрації 0,5 мг/мл, інкубували з 75 мМ меркаптоетиламін-HCl (2-MEA) у загальному обсязі 100 мкл ТІ при 31 °C протягом 5 год. Реакцію відновлення зупиняли, видаляючи відновлювач 2-MEA на центрифужних колонках (центрифужні фільтри Microcon, 30k, Millipore) за методикою виробника.

Наступні антитіла використовували в прикладах.

Антитіла до CD3

IgG1-huCD3-H1L1-FEAL (містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 25 і SEQ ID NO: 29, відповідно).

bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×b12-FEAR – біспецифічне антитіло, у якому у якості другого плеча використовується антитіло b12, яке є антитілом, специфічним до gp120 (Barbas CF., J Mol Biol. 1993 Apr 5, 230(3):812-23).

Антитіла до PDL1 і біспецифічні антитіла до CD3×PDL1

IgG1-338-FEAR (містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 5, відповідно).

IgG1-338-F405L.

bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR.

bslgG1-b12-FEAL×338-FEAR.

IgG1-511-LC33S-FEAR (містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 15, відповідно).

IgG1-511-F405L-LC33S.

bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR.

bslgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR.

IgG1-547-FEAR (містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 18 і SEQ ID NO: 22, відповідно).

IgG1-547-F405L.

bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR.

bslgG1-b12-FEAL×547-FEAR.

IgG1-321-FEAR (містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 32 і SEQ ID NO: 36, відповідно).

IgG1-421-LC91S-FEAR (містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 46 і SEQ ID NO: 50, відповідно).

IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR (містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 53 і SEQ ID NO: 57, відповідно).

IgG1-625-FEAR (містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 106 і SEQ ID NO: 110, відповідно).

IgG1-632-FEAR (містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 67 і SEQ ID NO: 71, відповідно).

IgG1-516-FEAR (містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 60 і SEQ ID NO: 64, відповідно).

IgG1-MPDL3280A-FEAR (на основі антитіла до PDL1 MPDL3280A фірми Genentech; містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 74 і SEQ ID NO: 78, відповідно).

IgG1-MPDL3280A-K409R.

IgG1-MEDI4736-FEAR (на основі антитіла до PDL1 MEDI4736 фірми Medimmune; містить послідовності V_H і V_L , наведені в SEQ ID NO: 81 і SEQ ID NO: 85, відповідно).

IgG1-MEDI4736-F405L.

Приклад 5. Зв'язування антитіл до PD-L1 або біспецифічних антитіл CD3×PD-L1 або b12×PD-L1 з пухлинними клітинами

Аналізували зв'язування антитіл до PD-L1 і біспецифічних антитіл CD3×PD-L1 і b12×PD-L1 із клітинами ракових ліній людини SK-MES-1 (плоскоклітинна карцинома легенів; ATCC; кат. № HTB-58), MDA-MB-231 (аденокарцинома молочної залози; ATCC; кат. № HTB-26), PC-3 (аденокарцинома простати; ATCC; кат. № CRL-1435) і HELA (аденокарцинома шийки матки; ATCC; кат. № CCL-2) методом проточної цитометрії.

Клітини ($3-5 \times 10^4$ клітин на лунку) інкубували в полістиролових 96-ямкових круглодонних планшетах (Greiner Bio-one, кат. № 650101) із серійними розведеннями антитіл (від 0,0001 до 10 мкг/мл при 5-кратних розведеннях) в 50 мкл PBS/0,1 % BSA/0,02 % азиду (буфер, що забарвлює) при 4 °C протягом 30 хв.

Після відмивання двічі в буфері, що забарвлює, клітини інкубували в 50 мкл вторинного антитіла при 4 °C протягом 30 хв. У якості вторинного антитіла у всіх експериментах використовували кон'югований з R-фікоеритрином (PE) козячий F(ab')₂ проти IgG людини (кат. № 109-116-098, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA), розведений 1:500 у буфері, що забарвлює. Потім клітини двічі відмивали в буфері, що забарвлює, ресуспендували в 20 мкл буфера, що забарвлює, і аналізували на приладі iQue Screener (Intellicyt Corporation, США). Криві зв'язування аналізували методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism V75.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, США).

Проводили кількісну проточну цитометрію (QIFIKIT®, Dako; кат. № K0078), як описано (Ponlace and Carayon, 1985, J. Immunol. Meth. 85:65-74), для кількісної оцінки експресії мішені на плазматичній мембрані клітин MDA-MB-231, PC-3 і HELA, а також для визначення кількості молекул, що зв'язалися,

PDL1. Було встановлено, що клітинні лінії мають наступну щільність антигену PD-L1 (ABC, здатність до зв'язування антитіл):

- SK-MES-1: прибіл. 30 000 ABC на клітину,
- MDA-MB-231: прибіл. 21 000 ABC на клітину,
- клітини PC-3: прибіл. 6 000 ABC на клітину,
- клітини HELA: прибіл. 2 000 ABC на клітину.

Зв'язування із клітинами MDA-MB-231

З Фіг. 1 видно, що bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR (A), bslgG1-b12-FEAL×338-FEAR (D), bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR (B) і bslgG1-b12-FEAL×547-FEAR (E) проявляли залежне від дози зв'язування із клітинами MDA-MB-231 з більшим максимальним рівнем зв'язування, ніж в моноспецифічних, бівалентних антитіл до PD-L1 IgG1-338-FEAR і IgG1-547-FEAR. Максимальне зв'язування в bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR (C) і bslgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR (F) було нижче, ніж у бівалентного моноспецифічного антитіла до PD-L1 IgG1-511-LC33S-FEAR.

Зв'язування із клітинами PC-3

З Фіг. 2 видно, що bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR (A), bslgG1-b12-FEAL×338-FEAR (D), bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR (B) і bslgG1-b12-FEAL×547-FEAR (E) проявляли залежне від дози зв'язування із клітинами PC3. Максимальне зв'язування в bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR (C) і bslgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR (F) було нижче, ніж у бівалентного моноспецифічного антитіла до PD-L1 IgG1-511-LC33S-FEAR.

Зв'язування із клітинами HELA

З Фіг. 3 видно, що bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR (A) і bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR (B) проявляли залежне від дози зв'язування із клітинами HELA. Максимальне зв'язування в моноспецифічних, двовалентних антитіл до PD-L1 IgG1-338-FEAR і IgG1-547-FEAR було неможливо визначити у використовуваному діапазоні концентрацій. (C) bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR і IgG1-511-LC33S-FEAR не зв'язувалися із клітинами HELA.

Зв'язування із клітинами SK-MES-1

З Фіг. 4 видно, що bslgG1-b12-FEAL×338-FEAR (A) і bslgG1-b12-FEAL×547-FEAR (B) проявляли залежне від дози зв'язування із клітинами SK-MES-1 з більшим максимальним рівнем зв'язування, ніж в моноспецифічних бівалентних антитіл до PD-L1 IgG1-338-FEAR і IgG1-547-FEAR. Максимальне зв'язування в bslgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR (C) було нижче, ніж у бівалентного моноспецифічного антитіла до PD-L1 IgG1-511-LC33S-FEAR.

Приклад 6. Зв'язування з PD-L2 людини

Щоб показати специфічне зв'язування з PD-L1, але не з PD-L2 людини, визначали зв'язування bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR і IgG1-338-FEAR, bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR і IgG1-547-FEAR, bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR і IgG1-511-LC33S-FEAR із клітинами CHO, експресуючими PD-L2 людини, методом проточної цитометрії таким же способом, як описано вище. У якості позитивного контролю використовували кон'юговане з PE антитіло, специфічне до PD-L2 (Mylteni, клон M1H18; кат. № 130-098-651). Жодне з досліджуваних антитіл не зв'язувалося із клітинами CHO-PD-L2.

Приклад 7. Зв'язування антитіл до PD-L1 або біспецифічних антитіл CD3×PD-L1 або b12×PD-L1 з PD-L1 макаки-крабїда

Визначали зв'язування із клітинами CHO, експресуючими PD-L1 макаки-крабїда, методом проточної цитометрії таким же способом, як описано вище. З Фіг. 5 видно, що bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR (A), bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR (B), bslgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR (C), b8G-FEAR (D), bslgG1-b12-FEAL×547-FEAR (E) і bslgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR (F) проявляли залежне від дози зв'язування із клітинами CHO, експресуючими PD-L1 макаки-крабїда, з більшим максимальним рівнем зв'язування, ніж в моноспецифічних, бівалентних антитіл до PD-L1 IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR і IgG1-511-LC33S-FEAR.

Приклад 8. Визначення спорідненості до PD-L1 людини й макаки-крабїда методом інтерферометрії в біошарі

У першій серії експериментів визначали спорідненість до рекомбінантного білку PD-L1 людини методом інтерферометрії в біошарі (BLI) на приладі Octet HTX (ForteBio). Біосенсиори захоплення Fc проти IgG людини (AHC) (ForteBio) навантажували антитілами (1 мкг/мл) протягом 900 с. Після базового рівня (100 с) визначали асоціацію (1000 с) і дисоціацію (2000 с) PDLoneECDHisCtag у розріджувачі для зразків (ForteBio) у діапазоні концентрацій від 2,67 мкг/мл до 0,14 мкг/мл (від 100 нМ до 1,56 нМ) при 2-кратних розведеннях. Експерименти проводили зі струшуванням при 1000 об/хв. при 30 °C. Дані аналізували за допомогою програми для аналізу даних V9.0.0.12 (ForteBio) на моделі 1:1 з повною глобальною апроксимацією з часом асоціації 1000 з і часом дисоціації 200 або 1000 с. Записи даних піддавали корекції шляхом вирахування контрольного буфера, вісь Y сполучали з останніми 10 з базової лінії й застосовували міжкрокову корекцію, а також фільтрацію Savitzky-Golay. Записи даних з відповіддю <0,05 нм виключали з аналізу. За замовчуванням використовували апроксимацію за

часом дисоціації в 1000 с. Для IgG1-511-FEAR-LC33S використовували час дисоціації 200 с, виходячи зі значення R^2 і візуального огляду апроксимації.

Результати представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Спорідненість зв'язування моноспецифічних бівалентних антитіл до PD-L1 людини при визначенні методом інтерферометрії в біошарі

Антитіло	Асоціація: k_a (1/М·сек)	Дисоціація: k_d (1/сек)	K_D (М)
IgG1-338-FEAR	7,3E+05	6,4E-05	8,8E-11
IgG1-547-FEAR	1,2E+06	3,6E-05	2,9E-11
IgG1-511-LC33S-FEAR	1,2E+06	4,5E-03	3,8E-09

У другій серії експериментів ($n = 3$) порівнювали спорідненість антитіл до PD-L1 людини й PD-L1 макаки-краббії при визначенні методом BLI. Постановка експериментів була така ж, як описано вище, за винятком:

- час навантаження біосенсорів АНС антитілами: 600 с;
- базова лінія: 300 с;
- у якості антигену, поряд з PDLoneECD-HisCtag (PD-L1 людини, теоретична молекулярна маса 29 кДа), використовували білок PD-L1/B7-H1 макаки-краббії (Acro Biosystems, кат. № PD1-C52H4-100, теоретична молекулярна маса 27,1 кДа);
- діапазон концентрацій антигену: 0,156-10 нМ (у першому експерименті) або 0,39-25 нМ (у другому й третьому експерименті).

Результати представлені в табл. 2 (середні з 3 експериментів). Спорідненість зв'язування IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR і IgG1-511-LC33S-FEAR для PD-L1 людини було в тому ж діапазоні, що й у табл. 1, з відхиленнями, імовірно, обумовленими мінливістю умов аналізу. Спорідненість зв'язування цих антитіл для PD-L1 макаки було дуже близьке до такого для PD-L1 людини. Також визначали спорідненість зв'язування в IgG1-MEDI4738-FEAR і IgG1-MPDL3280A-FEAR. IgG1-MEDI4738-FEAR проявляло близьку спорідненість зв'язування для PD-L1 людини й макаки. А IgG1-MPDL3280A-FEAR проявляло велику відмінність у спорідненості зв'язування, у середньому воно було в 19,7 разів нижче (більш високе значення K_D) для PD-L1 макаки, ніж для PD-L1 людини.

Таблиця 2

Спорідненість зв'язування (середнє з 3 незалежних експериментів) моноспецифічних бівалентних антитіл до PD-L1 людини й PD-L1 макаки-краббії при визначенні методом інтерферометрії в біошарі

Антитіло	Біол. вид PD-L1	Асоціація: k_a (1/М·сек)	Дисоціація: k_d (1/сек)	K_D (М)	Відмінності за K_D (рази)
IgG1-338-FEAR	людина	8,0E+05	2,5E-04	3,1E-10	2,3
	макака	3,9E+05	2,8E-04	7,3E-10	
IgG1-547-FEAR	людина	9,7E+05	1,1E-04	1,2E-10	2,3
	макака	4,4E+05	1,2E-04	2,7E-10	
IgG1-511-LC33S-FEAR	людина	9,6E+05	4,8E-03	5,1E-09	2,3
	макака	4,5E+05	5,2E-03	1,2E-08	
IgG1-MEDI4738-FEAR	людина	8,8E+05	3,3E-04	3,7E-10	2,3
	макака	4,3E+05	3,8E-04	8,6E-10	
IgG1-MPDL3280A-FEAR	людина	7,2E+05	3,3E-04	4,6E-10	19,7
	макака	3,6E+05	3,0E-03	9,0E-09	

Приклад 9. Класичний сендвіч-аналіз перехресного блокування PD-L1

Проводили перевірку перехресного блокування антитіл методом інтерферометрії в біошарі (BLI) на приладі Octet HTX (ForteBio). Антитіла (20 мкг/мл в 10 мМ Na-ацетатному буфері, pH 6,0 (ForteBio)) іммобілізували на біосенсорах Amine-Reactive 2nd Generation (AR2G) (ForteBio) відповідно до інструкцій виробника. Після базової лінії (50 с) у розріджувачі для зразків (ForteBio) біосенсори, які містять іммобілізовані антитіла, навантажували протягом 500 с PDLoneECDHisCtag (100 нМ або 2,7 мкг/мл), після чого відслідковували реакцію асоціації другого антитіла (10 мкг/мл) протягом 500 с. Біосенсори регенерували 3 рази по 5 с по черзі в 10 мМ гліцину pH 2,5 і розріджувачі для зразків. Експеримент повторювали з новим набором других антитіл, починаючи з базової лінії. Кожний

біосенсор використовували 6 разів. Експерименти проводили при 30 °C зі струшуванням при 1000 об/хв. Дані аналізували за допомогою програми для аналізу даних v9.0.0.12 (ForteBio). Вісь Y сполучали зі стадією асоціації й застосовували фільтрацію Savitzky-Golay. Із сигналу асоціації другого антитіла віднімали середній сигнал буфера для корекції на дисоціацію PDLoneECDHisCtag з іммобілізованого антитіла. Скоректовані сигнали асоціації наносили на графіки в матричному форматі. Сигнали $\geq 0,1$ нм уважалися не блокувальними парами антитіл (результати зазначені у вигляді простих чисел у таблиці на Фіг. 6), сигнали менше 0,1 уважалися блокувальними парами антитіл (результати представлені жирним шрифтом у таблиці на Фіг. 6). Деякі пари антитіл проявляли витісняючу поведінку (зазначені зірочкою (*)) у таблиці на Фіг. 6). Представлені типові графіки для витісняючих (А), блокувальних (В) і неблокувальних (С) пар антитіл.

Експерименти з перехресного блокування проводили для антитіл IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR, IgG1-511-LC33S-FEAR, IgG1-321-FEAR, IgG1-421-LC91S-FEAR, IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR, IgG1-632-FEAR, IgG1-516-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR і IgG1-MEDI4736-FEAR. Результати представлені на Фіг. 6.

Дані показують, що антитіло IgG1-511-LC33S-FEAR визначає унікальну групу перехресного блокування, тому що воно блокує IgG1-321-FEAR, IgG1-338-FEAR, IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR, IgG1-632-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR і IgG1-MEDI4736-FEAR, але не блокує зв'язування IgG1-547-FEAR, IgG1-421-LC91S-FEAR або IgG1-516-FEAR з PDL1 людини.

Антитіло IgG1-547-FEAR також визначає унікальну групу перехресного блокування, тому що воно блокує IgG1-321-FEAR, IgG1-338-FEAR, IgG1-421-LC91S-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR і IgG1-MEDI4736-FEAR, але не блокує зв'язування IgG1-511-LC33S-FEAR, IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR, IgG1-632-FEAR, IgG1-516-FEAR з PD1 людини.

Крім того, антитіло IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR проявляє витісняючу поведінку в комбінації з IgG1-321-FEAR, IgG1-338-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR і IgG1-MEDI4736-FEAR, указуючи на те, що антитіла IgG1-321-FEAR, IgG1-338-FEAR, IgG1-MEDI4736-FEAR і IgG1-MPDL3280A-FEAR зв'язуються з PD-L1 людини інакше, ніж IgG1-421-LC91S-FEAR, IgG1-547-FEAR, IgG1-LC33S-FEAR, IgG1-632-FEAR і IgG1-516-FEAR.

Приклад 10. Вплив антитіл до PD-L1 на взаємодію PD-1/PD-L1

Визначали вплив бівалентних і моновалентних антитіл до PD-L1 на взаємодію PD-1 і PD-L1 методом біоаналіза блокування PD-1/PD-L1, розробленим фірмою Promega (Madison, США). Це біоломінесцентний метод на клітинах, які складаються із двох генно-інженерних ліній клітин: ефекторних клітин PD-1, що представляють собою Т-клітини Jurkat, експресуючі PD-1 людини й репортер-люциферазу під управлінням елемента відгуку NFAT (NFAT-RE), і клітин PD-L1 аAPC/CHO-K1, які представляють собою клітини CHO-K1, експресуючі PD-L1 людини й інженерний білок клітинної поверхні, призначений для активації когнатних TCRs незалежним від антигену чином. При спільному культивуванні двох типів клітин взаємодія PD-1/PD-L1 інгібує сигналізацію TCR і опосередковану NFAT-RE люмінесценцію. Додавання антитіл, що блокують взаємодію PD-1/PD-L1, вивільняє інгібуючий сигнал і веде до активації TCR і опосередкованої NFAT-RE люмінесценції.

Клітини PD-L1 аAPC/CHO-K1 (Promega, кат. № J109A) відтавали за методикою виробника, ресуспендували в середовищі Ham's F12 (Promega, кат. № J123A), що містить 10 % фетальної телячої сироватки (FBS; Promega, кат. № J121A) і вносили в 96-яткові плоскодонні планшети для культивування (CulturPlate-96, Perkin Elmer, кат. № 6005680). Планшети інкубували 16 годин при 37 °C, 5 % CO₂. Супернатанти видаляли й додавали серійні розведення антитіл (кінцеві концентрації від 5 до 0,001 мкг/мл; 4-кратні розведення в середовищі RPMI 1640 [Lonza, кат. № BE12-115F], що містить 1 % фетальної телячої сироватки [FBS; Promega, кат. № J121A]). Додавали ефекторні клітини PD-1 (Promega, кат. № J115A), розморожені за методикою виробника й ресуспендовані в RPMI/1 % FBS. Планшети інкубували 6 годин при 37 °C, 5 % CO₂. Після доведення до кімнатної температури в кожен лунку додавали 40 мкл реагенту Bio-Glo (субстрату для аналізу люциферази Bio-Glo [Promega, кат. № G720B], розчиненого в буфері для аналізу люциферази Bio-Glo [Promega, кат. № G7198] за методикою виробника). Планшети інкубували 5-10 хв. за кімнатної температури й вимірювали люмінесценцію на приладі Envision Multilabel Reader (Perkinelmer). Розраховували вплив на взаємодію PD-1 з PD-L1 щодо контролю (без додавання антитіл) у такий спосіб:

кратність ефекту = RLU (ефект – тло) / RLU (контроль без антитіл – тло), де RLU – відносні одиниці люмінесценції.

З Фіг. 7 видно, що бівалентні моноспецифічні антитіла IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR і IgG1-511-LC33S-FEAR ефективно блокують взаємодію між PD1 і PD-L1 дозозалежним чином. Моновалентні антитіла bsIgG1-b12-FEAL×338-FEAR і bsIgG1-b12-FEAL×547-FEAR також ефективно блокують взаємодію PD1-PD-L1. bsIgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR також блокувало цю взаємодію, хоча й менш ефективно.

Приклад 11. Цитотоксичність біспецифічних антитіл CD3×PD-L1 in vitro

Перевіряли біспецифічні антитіла до CD3×PD-L1 на цитотоксичність in vitro, використовуючи клітини ракових ліній як клітин мішені й очищені Т-клітини або моноклеарні клітини периферичної

крові (PBMC) у якості ефektorних клітин. Т-клітини виділяли з лейкоцитних плівки донорів (Sanquin, Amsterdam, Нідерланди) за допомогою коктейлю RosetteSep для збагачення Т- клітин людини (кат. № 15021C.1, Stemcell Technologies, Франція) відповідно до інструкцій виробника. PBMCs виділяли з 40 мл лейкоцитної плівки (Sanquin) у градієнті фікола (Lonza; середовище для виділення лімфоцитів, кат. № 17-829E) відповідно до інструкцій виробника.

У плоскодонні 96-ямкові планшети (кат. № 655180, Greiner Bio-one, Нідерланди) висівали клітини MDA-MB-231 (16 000 клітин на лунку), клітини PC-3 (16 000 клітин на лунку) або клітини HELA (10 000 клітин на лунку) і культивували протягом ночі при 37 °C. До ракових клітин додавали Т-клітини при співвідношенні Е:Т = 4:1 для клітин MDA-MB-231 або PC-3 і Е:Т = 8:1 для клітин HELA. PBMC додавали до ракових клітин при співвідношенні Е:Т = 10:1. Додавали серійні розведення антитіл (кінцеві концентрації від 1000 до 0,06 нг/мл; 4-кратні розведення) і інкубували планшети 48 годин при 37 °C. Потім супернатанти відкидали, а адгезовані клітини двічі промивали PBS. У лунки додавали 150 мкл 10 % розчину Alamar Blue (кат. № DAL1100, Life Technologies, Нідерланди) у середовищі RPMI-1640 (кат. № BE12-115F, Lonza, Швейцарія), що містить 10 % бичачої сироватки із залізом (кат. № 10371-029, Life Technologies, Нідерланди) і інкубували 5 годин при 37 °C. Вимірювали поглинання на приладі Envision Multilabel Plate Reader (Perkinelmer, США). Життєздатність оброблених стауроспорином (кат. № S6942, Sigma-Aldrich, США) клітин приймали за 0 %, а життєздатність неопрацьованих клітин – за 100 %. “Вміст життєздатних клітин” розраховували в такий спосіб:

% життєздатних клітин = (поглинання зразка – поглинання оброблених стауроспорином клітин мішені)/(поглинання неопрацьованих клітин мішені – поглинання оброблених стауроспорином клітин мішені) × 100.

Цитотоксичність біспецифічних антитіл CD3×PD-L1 на клітинах MDA-MB-231

З Фіг. 8 видно, що bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR і bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR індують залежну від концентрації цитотоксичність на клітинах MDA-MB-231, експресуючих PD-L1 на порівняно високому рівні, при використанні як очищених Т-клітин (А), так і PBMCs (В) у якості ефektorних клітин.

Цитотоксичність біспецифічних антитіл CD3×PD-L1 на клітинах PC-3

З Фіг. 9 видно, що bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR і bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR індують залежну від концентрації цитотоксичність на клітинах PC-3 при використанні як очищених Т-клітин (А), так і PBMCs (В) у якості ефektorних клітин. bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR найменш ефективно індукуює цитотоксичність на клітинах PC-3, експресуючих PD-L1 на помірному рівні.

Цитотоксичність біспецифічних антитіл CD3×PD-L1 на клітинах HELA

З Фіг. 10 видно, що bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR здатне індукувати цитотоксичність на клітинах HELA, експресуючих PD-L1 на низькому рівні, при використанні Т-клітин у якості ефektorних клітин, а для одного донора також при використанні PBMCs. bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR було менш здатне індукувати цитотоксичність на клітинах HELA, а bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR не індукувало цитотоксичності на клітинах HELA.

Приклад 12. Активація й проліферація Т-клітин біспецифічними антитілами CD3×PD-L1

Перевіряли біспецифічні антитіла до CD3×PD-L1 на активацію й проліферацію Т-клітин in vitro, використовуючи клітини MDA-MB-231 у якості клітин мішені й очищені Т-клітини в якості ефektorних клітин. У якості негативного контролю використовували IgG1-b12 (з Fc-областю, здатною взаємодіяти з Fcγ-рецепторами й C1q). PBMCs виділяли з 40 мл лейкоцитної плівки (Sanquin) у градієнті фікола (Lonza; середовище для виділення лімфоцитів, кат. № 17-829E) відповідно до інструкцій виробника. З очищених PBMCs виділяли Т-клітини за допомогою коктейлю RosetteSep для збагачення Т-клітин людини (кат. № 15021C.1, Stemcell Technologies, Франція) відповідно до інструкцій виробника.

Клітини MDA-MB-231 мітили 0,07 мкМ CellTrace CFSE (ThermoFisher Scientific, кат. № C34554) відповідно до інструкції виробника й висівали (5000 клітин на лунку) у плоскодонні 96-ямкові планшети (Greiner Bio-one, Нідерланди, кат. № 655180) для адгезування до лунок на 4 години при 37 °C. До ракових клітин додавали Т-клітини в співвідношенні Е:Т = 8:1, тобто 40 000 клітин на лунку. Додавали серійні розведення антитіл (кінцеві концентрації від 10000 до 1,5 нг/мл; 3-кратні розведення) і інкубували планшети 4 дні при 37 °C.

Потім супернатанти (які містять неадгезовані клітини) переносили в 96-ямковий планшет з U-подібним дном (Greiner Bio-one), а клітини, що залишилися, збирали шляхом обробки трипсином-ЕДТА (Lonza) і поєднували із супернатантом в 96-ямковому планшеті з U-подібним дном. Клітини промивали PBS (B.Braun) і фарбували протягом 30 хв. при 4 °C за допомогою коктейлю антитіл: 1:200 проти huCD4 з PacificBlue (Biolegend, кат. № 300521), 1:50 проти huCD8 з FITC (BD, кат. № 345772), 1:100 проти huCD25 з PE-Cy7 (eBiosciences, кат. № 25-0259-42) і проти huCD69 з PE (BD, кат. № 555531). Клітини промивали один раз крижаним буфером FACS і ресуспендували в 80 мкл буфера FACS з додаванням розведеного 1:6000 Topro-3-йоду (ThermoFisher Scientific, кат. № T3605).

Проліферацію Т-клітин визначали шляхом підрахунку загального числа Т-клітин CD4^{pos} і CD8^{pos} у фіксованому обсязі 50 мкл на проточному цитометрі. Активацію Т-клітин вимірювали шляхом

підрахунку числа клітин CD69^{pos} (раннього маркера активації Т-клітин) і CD25^{pos} (пізньої активації Т-клітин) у фіксованому обсязі 50 мкл на проточному цитометрі. З Фіг. 11 видно, що всі біспецифічні антитіла CD3×PD-L1 індукували проліферацію Т-клітин (про що свідчить збільшення загального числа Т-клітин). Однак спостерігалися відмінності за кількістю активованих і загальним числом Т-клітин між різними біспецифічними антитілами до CD3×PD-L1, причому bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR було менш ефективним, а bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR було найбільш ефективним.

Приклад 13. Визначення внеску амінокислотних залишків PD-L1 у зв'язування антитіл методом аланінового сканування

Конструювання бібліотеки

Синтезували бібліотеку PD-L1 (Uniprot Q9NZQ7) з одиночними залишками аланіна (Geneart), у якій усі залишки амінокислот у позаклітинному домені PD-L1 людини були поодиночі мутовані на аланін, за винятком положень, що вже містять аланін або цистеїн. Цистеїни не піддавали мутації, щоб мінімізувати ймовірність руйнування структури антигену. Бібліотеку клонували в експресуючому векторі рMAC, що містить експресійну касету CMV/TK-polyA, ген стійкості до Amp і початок реплікації рBR322.

Одержання й скринінг бібліотеки

PD-L1 дикого типу й аланінові мутанти експресували індивідуально в клітинах HEK293 FreeStyle відповідно до інструкцій виробника (Thermo Scientific). Через день після трансфекції клітини збирали. Приблизно 100 000 клітин інкубували з 20 мкл кон'югованого з Alexa488 антитіла в буфері FACS (табл. 3). Клітини інкубували 1 годину за кімнатної температури. Потім додавали 150 мкл буфера FACS і промивали клітини центрифугуванням. Клітини суспендували в 20 мкл свіжого буфера FACS (PBS [без Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ і Phenol Red]/1 % BSA фракції V/0,02 % NaN₃) і зберігали при 4 °C до аналізу методом проточної цитометрії на приладі iQue Screener.

Увесь експеримент повторювали 4 рази.

Таблиця 3

Антитіла, які використовувалися при визначенні внеску амінокислотних залишків PD-L1 у зв'язування антитіл методом аланінового сканування

Антитіло	Вихідна концентрація	Кон'югат
BsG1-b12-FEAL×547-FEAR-A488	3 мкг/мл	Alexa488
BsG1-b12-FEAL×338-FEAR-A488		
IgG1-511-FEAR-LC33S-A488		
BsG1-b12-FEAL×MPDL3280A-FEAR-A488		
IgG1-MEDI4736-FEAR		
IgG1-625-FEAR-A488 (контрольне)		

Аналіз даних

Для кожного зразка визначали середнє зв'язування антитіл на 1 клітину у вигляді середнього геометричного значення інтенсивності флуоресценції (gMFI) для нестробованої популяції клітин. На gMFI впливає спорідненість антитіла до мутанта PD-L1 і рівень експресії мутанта PD-L1 на 1 клітину. Оскільки певні аланінові мутації можуть впливати на рівень поверхневої експресії мутанта PD-L1 і для корекції на відмінності в експресії для кожного мутанта PD-L1 взагалі, дані піддавали нормуванню за інтенсивністю зв'язування неблокувального контрольного антитіла до PD-L1 (IgG1-625-FEAR-A488; містить варіабельну область важкого ланцюга (V_H), наведену в SEQ ID NO: 106, і варіабельну область легкого ланцюга (V_L), наведену в SEQ ID NO: 110) за наступним рівнянням:

$$\text{Нормалізоване gMFI}_{\text{положення а.к.}} = \frac{\text{gMFI}_{\text{дослід. Ab}}}{\text{gMFI}_{\text{контроль. Ab}}},$$

де “положення а.к.” відноситься або до певного Ala-мутанта PD-L1, або до PD-L1 дикого типу (wt).

Для вираження зменшення або посилення зв'язування антитіл за лінійною шкалою кратності змін використовували наступну формулу:

$$\text{Кратність змін} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{нормалізоване gMFI}_{\text{Ala-мутант}}}{\text{нормалізоване gMFI}_{\text{дикий тип}}} \right).$$

Посилення зв'язування в більшості випадків викликається зменшенням зв'язування контрольного антитіла з певними Ala-мутантами.

Після цих обчислень ті положення амінокислот, у яких після заміни амінокислоти на аланін відсутнє зменшення або посилення зв'язування з певним антитілом, дають у результаті "0", посилення зв'язування дає ">0", а зменшення зв'язування дає "<0". Для корекції на мінливість зразків тільки ті амінокислотні залишки PD-L1, у яких кратність змін зв'язування була менша, ніж середня кратність змін – $1,5 \times SD$ (позначене пунктирною лінією на Фіг. 12), де SD означає стандартне відхилення розрахункової кратності змін із чотирьох незалежних експериментів для даного антитіла, уважалися "мутантами із втратою зв'язування".

У тому випадку, якщо gMFI контрольного антитіла для певного мутанта PD-L1 було нижче, ніж середнє значення gMFI – $2,5 \times SD$ середнього значення gMFI у контрольного антитіла, дані виключалися з аналізу (типу тих мутантів PD-L1, у яких рівні експресії були недостатні).

На Фіг. 12 представлена кратність змін у зв'язуванні антитіл до PD-L1 з варіантами PD-L1 з Ala-мутаціями в положеннях 42-131 (згідно SEQ ID No: 94). Результати показують, що:

- зв'язування антитіла 338 залежить щонайменше від а.к. R113, Y123 і R125 в PD-L1 людини,
- зв'язування антитіла 511 залежить щонайменше від а.к. F19, F42, E45, K46, L94 і I116 в PD-L1 людини; причому амінокислоти E45, K46 і L94 безпосередньо беруть участь у зв'язуванні антитіла, а F19, F42 і I116 побічно беруть участь у зв'язуванні антитіла через свої занурені бічні ланцюги,
- зв'язування антитіла 547 залежить щонайменше від а.к. E58 і R113 в PD-L1 людини,
- зв'язування антитіла MEDI4736 залежить щонайменше від а.к. R113 і R125 в PD-L1 людини й
- зв'язування антитіла MPDL3280A залежить щонайменше від а.к. R125 і I126 в PD-L1 людини, причому I126 через свій занурений бічний ланцюг може лише побічно брати участь у зв'язуванні антитіла.

Приклад 14. Антитілозалежна клітинна цитотоксичність (ADCC)

Визначення ADCC за вивільненням ^{51}Cr

Клітини MDA-MB-231 (ATCC, кат. № HTB-26) збирали (одержуючи 7×10^6 клітин), промивали (двічі в PBS, 1500 об/хв., 5 хв.) і вносили в 2 мл середовища RPMI 1640 з додаванням 10 % косметичної телячої сироватки (CCS) (HyClone, Logan, UT, США), у яку додавали 200 мкКи ^{51}Cr (хром-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Нідерланди). Суміш інкубували 1 годину при 37 °C зі струшуванням. Після промивання (двічі в PBS, 1500 об/хв., 5 хв.) клітини ресуспендували в середовищі RPMI 1640 з 10 % CCS і підраховували за виключенням трипанового синього. Клітини доводили до концентрації 1×10^5 клітин/мл.

У той же час виділяли мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) зі свіжої лейкоцитної плівки (Sanquin, Amsterdam, Нідерланди) стандартним методом центрифугування в градієнті щільності фікола відповідно до інструкцій виробника (середовище для виділення лімфоцитів; Lonza, Verviers, Франція). Після ресуспендування клітин у середовищі RPMI 1640 з 10 % CCS клітини підраховували за виключенням трипанового синього й доводили до 1×10^7 клітин/мл.

У лунки мікропланшета вносили 50 мкл мічених ^{51}Cr клітин мішені й додавали 50 мкл антитіла до PD-L1 при 30 мкг/мл (розведеного в RPMI/10 % CCS). У якості позитивного контролю використовували антитіло проти сторонньої мішені, експресованої на клітинах MDA-MB-231. Клітини інкубували 15 хв. за кімнатної температури й додавали 50 мкл ефекторних клітин (PBMC), одержуючи співвідношення ефектор:мішень = 100:1. Для визначення максимального ступеня лізису клітин додавали 100 мкл 5 % Triton-X100 замість ефекторних клітин. Для визначення ступеня спонтанного лізису додавали 100 мкл RPMI 1640/10 % CCS замість ефекторних клітин і антитіл. Крім того, для визначення рівня незалежного від антитіл лізису клітин додавали 50 мкл ефекторних клітин і 50 мкл середовища (замість антитіла). Зразки інкубували 4 години при 37 °C, 5 % CO_2 . Для визначення ступеня лізису клітин мішені зразки центрифугували (1200 об/хв., 3 хв.) і переносили 75 мкл супернатанта в мікропробірки, після чого прораховували вивільнений ^{51}Cr на гамма-лічильнику. Ступінь опосередкованого антитілами лізису розраховували в такий спосіб:

$$\frac{(\text{імпульсиза хвилину [срт]} \text{ у зразку} - \text{срт при незалежному відантитіллізисі})}{(\text{срт при максималььмулізисі} - \text{срт при спонтанноу лізисі})} \times 100\%.$$

З Фіг. 13 видно, що антитіло IgG1-547-F405L викликало дозозалежний лізис клітин MDA-MB-231 на ~10 % за допомогою ADCC. Антитіло позитивного контролю викликало лізис максимум лише на 20 %, що свідчить про те, що загальний лізис у цьому експерименті був досить низьким. IgG1-511-F405L-LC33S і IgG1-338-F405L не викликали лізису MDA-MB-231.

Визначення ADCC люмінесцентним методом біоаналіза репортера ADCC

Також визначали здатність антитіл до PD-L1 індукувати зшивання FcγRIIIa (CD16) у якості показника ADCC люмінесцентним методом біоаналіза репортера ADCC (Promega, кат. № G7018) на клітинах MDA-MB-231 відповідно до рекомендацій виробника. У якості ефекторних клітин набір містить

Т-клітини Jurkat людини, настроєні на стабільну експресію високоафінного FcγRIIIa (V158) і елемента відгуку на ядерний фактор активованих Т-клітин (NFAT), керуючий експресією люциферази світлячка. Коротко, клітини MDA-MB-231 (по 12500 клітин на лунку) висівали в планшети OptiPlates (Perkin Elmer) у буфері для аналізу ADCC [середовище RPMI-1640 (Lonza, кат. № BE12-115F) з додаванням 3,5 % сироватки з низьким рівнем IgG] і інкубували 6 годин при 37 °C/5 % CO₂ у загальному обсязі 75 мкл, що містить серійні розведення антитіл (кінцеві концентрації 0,5-250 нг/мл в 3,5-кратних розведеннях) і розморожені ефекторні клітини для біоаналіза ADCC. Після доведення планшетів протягом 15 хв. до кімнатної температури (RT) додавали 75 мкл реагенту Bio Glo для аналізу люциферази й інкубували планшети 5 хв. за кімнатної температури. Визначали продукцію люциферази за люмінесценцією на зчитувальному приладі EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer). Рівень тла визначали в тих лунках, у які додавали тільки клітини мішені й антитіло (без ефекторних клітин). У якості негативного контролю використовували лунки, які містять тільки клітини мішені й ефекторні клітини (без антитіл).

З Фіг. 14 видно, що IgG1-547-F405L дуже ефективно індукує ADCC при визначенні репортерним методом. IgG1-MEDI4736-F405L і IgG1-MPDL3280A-K409R теж індукували ADCC, але не в такому ж ступені, як IgG1-547-F405L. IgG1-511-F405L-LC33S і IgG1-338-F405L не індукували ADCC.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO	MITKA	ПОСЛІДОВНІСТЬ
1	VH-338	EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRFWMSWVRQAPGKGL EWVANIKQDGGEEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRGEDT AVYYCARDNDN WNGH FDYWGQGGLTVTVSS
2	VH-338-CDR1	GFTFSRFW
3	VH-338-CDR2	IKQDGGEEK
4	VH-338-CDR3	ARDDNWNHGFHDY
5	VK-338	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPNLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYYGSY I TFGQGTRLEIK
6	VK-338-CDR1	QSISSW
	VK-338-CDR2	KAS
7	VK-338-CDR3	QQYYGSYIT
8	VH-511	QVQLVQSGSELKKPGASVMVSCKASGYTFTSYVMNWVRQAPGQGL EWMGWINSYTGNTSAQGGFTGRFVFSFDTSVNTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGYCTSTSCYLDYWGQGGLTVTVSS
9	VH-511-CDR1	GYTFTSYV
10	VH-511-CDR2	INSYTGNT
11	VH-511-CDR3	ARGYCTSTSCYLDY
12	VL-511	SYELTQPPSVSVSPGHTARITCSGDALPKKYACWFQQKSGQAPVLVI YEDSKRPSGIPERFSGSTSGTMATLTISGAQVEDETYYCYADTSG THRVFGGGTKLTVL
13	VL-511-CDR1	ALPKKY
	VL-511-CDR2	EDS
14	VL-511-CDR3	YSADTSGTHRV
15	VL-511-LC33S	SYELTQPPSVSVSPGHTARITCSGDALPKKYASWFQQKSGQAPVLVI YEDSKRPSGIPERFSGSTSGTMATLTISGAQVEDETYYCYADTSG THRVFGGGTKLTVL
16	VL-511-LC33S- CDR1	ALPKKY
	VL-511-LC33S- CDR2	EDS
17	VL-511-LC33S- CDR3	YSADTSGTHRV
18	VH-547	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFSTYAMSWVRQAPGKGLE WVSGFSGSGGFTFYADSVRGRFTISRDSKNTLFLQMSSLRAEDTAV YYCAI PARGYN YGS FQ H WGQGGLTVTVS S
19	VH-547-CDR1	GSTFSTYA
20	VH-547-CDR2	FSGSGGFT
21	VH-547-CDR3	AIPARGYNYGSFQH

SEQ ID NO	MITKA	ПОСЛІДОВНІСТЬ
22	VL-547	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDDNDRPSGLPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDS SSDHVVFEGGGTKLTVL
23	VL-547-CDR1	NIGSKS
	VL-547-CDR2	DDN
24	VL-547-CDR3	QVWDSSSDHV
25	VH-huCD3-HI	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
26	VH-huCD3-HI- CDR1	GFTFNTYA
27	VH-huCD3-HI- CDR2	IRSKYNNYAT
28	VH-huCD3-HI- CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
29	VL-huCD3-LI	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTGQAF RGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWY SNLWVFGGGTKLTVL
30	VL-huCD3-LI- CDR1	TGAVTTSNY
	VL-huCD3-LI- CDR2	GTN
31	VL-huCD3-LI- CDR3	ALWYSNLWV
32	VH-321	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGL E WVANIKQDGNKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYVQMNSLRAEDTA VYYCARDLYYGSCTYPPEFDYWGQGLTVTVSS
33	VH-321-CDR1	GFTFSSYW
34	VH-321-CDR2	IKQDGNK
35	VH-321-CDR3	ARDLYYGSCTYPPEFDY
36	VK-321	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYLQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFAFYCCQYHSSS YTFGQGTKEIK
37	VK-321-CDR1	QSISSW
	VK-321-CDR2	KAS
38	VK-321-CDR3	QQYHSSSYT
39	VH-huCD3-HI- T31P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNPYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
40	VH-huCD3-HI- T31M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNMYAMNWVRQAPGKGL E WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
41	VH-huCD3-HI- Y114V	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
42	VH-huCD3-HI- Y114M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAMWGQGLTVTVSS
43	VH-huCD3-HI- Y116R	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFARWGQGLTVTVSS
44	VH-huCD3-HI- S110A	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVAWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO	MITKA	ПОСЛІДОВНІСТЬ
45	VH-huCD3-HI-H101G	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRGGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
46	VH-421	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQGP G K G L E WVSGIRWNSGSMHYADSVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDTA LYYCARAPWYSGAWH PDYWGQGLTVTVSS
47	VH-421-CDR1	GFTFDDYA
48	VH-421-CDR2	IRWNSGSM
49	VH-421-CDR3	ARAPWYSGAWHPDY
50	VL-421-C91S	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGTYNYSWYQQHPGKAP KLMIYDVIKRPSPGVPDRFSGSKSGNTASLTLSGLQAEDEADYYCSSY AGTYTLLFGGGTKLTVL
51	VL-421-C91S- CDR1	SSDVGTyny
	VL-421-C91S- CDR2	DVI
52	VL-421-C91S- CDR3	SSYAGTYTLL
53	VH-476-N101Q	EVQMLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMSWVRQAPGKGL E WVSGIGDSGGSTYHADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKLGQSSGWYDHYYYYGMDVWGQGT TVTVSS
54	VH-476-N101Q- CDR1	GFTFRSYA
55	VH-476-N101Q- CDR2	IGDSGGST
56	VH-476-N101Q- CDR3	AKLGQSSGWYDHYYYYGMDV
57	VL-476-C33S	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKYVSWFQQKPGQSPVLVI YRDSERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADFYCQAWDSST VVFGGGTKLTVL
58	VL-476-C33S- CDR1	KLGNKY
	VL-476-C33S- CDR2	RDS
59	VL-476-C33S- CDR3	QAWDSSTVV
60	VH-516	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSDYISSNDWWGWIRQPPGKGL E WIG IYYSGTG YYN PS LKS RVTISIDTS KNQFSLKLN S VTAVDTAVY YCARTRVGARRAFDYWGQGLTVTVSS
61	VH-516-CDR1	DYISSNDW
62	VH-516-CDR2	IYYSGTG
63	VH-516-CDR3	ARTRVGARRAFDY
64	VL-516	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDS SSDHVVFGGGTKLTVL
65	VL-516-CDR1	NIGSKS
	VL-516-CDR2	DDS
66	VL-516-CDR3	QVWDSSSDHVV
67	VH-632	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLE WVSYIGSSNTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAV YSCARDRVKYGSPGSLFDYWGQGLTVTVSS
68	VH-632-CDR1	GFTFSDYY
69	VH-632-CDR2	IGSSNTI
703	VH-632-CDR3	ARDRVKYGSPGSLFDY

SEQ ID NO	MITKA	ПОСЛІДОВНІСТЬ
71	VL-632	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAFWYQQKSGQAPVLVI YEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMTLTISGAQVEDEADYYCYSTASSG DHRVFEGGGTKLTVL
72	VL-632-CDR1	ALPKKY
	VL-632-CDR2	EDS
73	VL-632-CDR3	YSTASSGDHRV
74	VH-MPDL3280A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWYRQAPGKGLE WYAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS
75	VH-MPDL3280A- CDR1	GFTFSDSW
76	VH-MPDL3280A- CDR2	ISPYGGST
77	VH-MPDL3280A- CDR3	ARRHWPGGFDY
78	VL-MPDL3280A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYH P ATFGQGGTKVEIK
79	VL-MPDL3280A- CDR1	QDVSTA
	VL-MPDL3280A- CDR2	SAS
80	VL-MPDL3280A- CDR3	QQYLYHPAT
81	VH-MEDI4736B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGL E WVANIKQDGSEKYYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSS
82	VH-MEDI4736B- CDR1	GFTFSRYW
83	VH-MEDI4736B- CDR2	IKQDGSEK
84	VH-MEDI4736B- CDR3	AREGGWFGELAFDY
85	VL-MEDI4736B	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSL PWTFGQGGTKVEIK
86	VL-MEDI4736B- CDR1	QRVSSSY
	VL-MEDI4736B- CDR2	DAS
88	VL-MEDI4736B- CDR3	QQYGSLPWT
89	IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE V TCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

SEQ ID NO	MITKA	ПОСЛІДОВНІСТЬ
90	IgGI-FEAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE V TCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
91	Kappa-C	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
92	Lambda-C	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS P VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS
		TVEKTVAPTECS
93	IgGlm(f) - VH - aa 118-447 EU нумерація	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	PD-L1 (Генбанк номер доступу NP_054862.1)	MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQL DLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEECLKVQHSSYRQARLLKDQLSLGN AALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFN VTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLV ILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
95	Зріла людина CD3E	QDGNEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGG DEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLR ARVCENCMEMDMVSVATIVIVDICITGGLLLLVIYWSKNRKAKAKPV TRGAGAGGRQGRGQNKERPPVPNPDYEPKRGQRDLYSGLNQRRI
96	IgGlm(a) CH3 ділянка	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
97	IgGlm(f) CH3 ділянка	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ P ENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
98	IgGlm(ax) CH3 ділянка	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLH NHYTQKSLSLSPGK
99	VH-huCD3-HI- CDR1-T31P	GFTFNPYA
100	VH-huCD3-HI- CDR1-T31M	GFTFNMYA
101	VH-huCD3-HI- CDR3-Y114V	VRHGNFGNSYVSWFAV
102	VH-huCD3-HI- CDR3-Y114M	VRHGNFGNSYVSWFAM
103	VH-huCD3-HI- CDR3-Y116R	VRHGNFGNSYVSWFAR
104	VH-huCD3-HI- CDR3-S110A	VRHGNFGNSYVAWFAY
105	VH-huCD3-HI- CDR3-H101G	VRGGNFGNSYVSWFAY

SEQ ID NO	MITKA	ПОСЛІДОВНІСТЬ
106	VH-7717-625	HMQLVESGGGVAQPGRSRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGRGL EWLAVMSYDGETKYYADSVKGRFTISRDNSENTLFLQMNSLRAEDTA VYYCAKDT SNGWNYYFYGM DVWVGQTTTVTVSS
107	VH-7717-625_CDR1	GFTFSNYG
108	VH-7717-625_CDR2	MSYDGETK
109	VH-7717-625_CDR3	AKDTSNGWNYYFYGM DV
110	VL-7717-625	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKFASWYQQKSGQAPVLVI YEDSKRPSGIPERVSGSSSGTMTLTISGAQTEDEADYYCYSTDRSG YHWVFGGGTKLTVL
111	VL-7717-625_CDR1	ALPKKF
	VL-7717-625_CDR2	EDS
112	VL-7717-625_CDR3	YSTDRSGYHWV
113	IgGlm(f)_константний	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	IgGi-K409R_константний домен	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFLLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	igGi-F405L_константний домен	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV T CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Генмаб А/С
 <120> АНТИТІЛА ПРОТИ PD-L1
 <130> P/0115-WO-РСТ
 <160> 115
 <170> Патентна версія 3.5
 <210> 1
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Asp Asn Trp Asn Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe Trp
1 5

<210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 3

Ile Lys Gln Asp Gly Gly Glu Lys
1 5

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 4

Ala Arg Asp Asp Asn Trp Asn Gly His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Gly Ser Tyr Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 6

Gln Ser Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 7

Gln Gln Tyr Tyr Gly Ser Tyr Ile Thr
1 5

<210> 8
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Met Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Ser Tyr Thr Gly Asn Pro Thr Ser Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Phe Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Cys Thr Ser Thr Ser Cys Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 9

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val
1 5

<210> 10
<211> 8

<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 10

Ile Asn Ser Tyr Thr Gly Asn Pro
1 5

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 11

Ala Arg Gly Tyr Cys Thr Ser Thr Ser Cys Tyr Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 12

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly His
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

Cys Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Ala Asp Thr Ser Gly Thr His
85 90 95

Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 13

Ala Leu Pro Lys Lys Tyr
1 5

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 14

Tyr Ser Ala Asp Thr Ser Gly Thr His Arg Val
1 5 10

<210> 15
<211> 108
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> N/A

<400> 15

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly His
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Ala Asp Thr Ser Gly Thr His
85 90 95

Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 16

Ala Leu Pro Lys Lys Tyr
1 5

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 17

Tyr Ser Ala Asp Thr Ser Gly Thr His Arg Val
1 5 10

<210> 18

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 18

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

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

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

Ser Gly Phe Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ile Pro Ala Arg Gly Tyr Asn Tyr Gly Ser Phe Gln His Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 19

Gly Ser Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 20

Phe Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr
1 5

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 21

Ala Ile Pro Ala Arg Gly Tyr Asn Tyr Gly Ser Phe Gln His
1 5 10

<210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 22

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Leu Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 23

Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1 5

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 24

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val
1 5 10

<210> 25
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 25

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala
1 5

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 27

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
1 5 10

<210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 28

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 29
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 29

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 30

Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 31

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 32
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Asn Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Val Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

			85					90						95			
Ala	Arg	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Thr	Tyr	Pro	Pro	Phe	Asp	Tyr		
			100					105					110				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120										

<210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 33

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp
1				5			

<210> 34
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 34

Ile	Lys	Gln	Asp	Gly	Asn	Glu	Lys
1				5			

<210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 35

Ala	Arg	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Thr	Tyr	Pro	Pro	Phe	Asp	Tyr
1				5					10					15	

<210> 36
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 36

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Trp
		20						25					30		

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

Tyr	Lys	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

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

Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	His	Ser	Ser	Ser	Tyr
				85					90					95	

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

<210> 37
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 37

Gln Ser Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 38

Gln Gln Tyr His Ser Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 39

<211> 125

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> N/A

<400> 39

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 40

<211> 125

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<400> 40

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 41
<211> 126
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> N/A

<400> 41

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 42
<211> 125
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> N/A

<400> 42

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Met Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 43
<211> 125
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> N/A

<400> 43

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 44
<211> 125
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> N/A

<400> 44

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ala Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 45
<211> 125
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> N/A

<400> 45

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg Gly Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 46
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Arg Trp Asn Ser Gly Ser Met His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Pro Trp Tyr Ser Gly Ala Trp His Pro Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47
<211> 8
<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 47

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 48

Ile Arg Trp Asn Ser Gly Ser Met
1 5

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 49

Ala Arg Ala Pro Trp Tyr Ser Gly Ala Trp His Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 50

<211> 110

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> N/A

<400> 50

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Thr Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ile Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Leu Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Thr
85 90 95

Tyr Thr Leu Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 51

Ser Ser Asp Val Gly Thr Tyr Asn Tyr
1 5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> N/A

<400> 52

Ser Ser Tyr Ala Gly Thr Tyr Thr Leu Leu
1 5 10

<210> 53

<211> 127

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> N/A

<400> 53

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

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

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

Ser Gly Ile Gly Asp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr His Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Leu Gly Gln Ser Ser Gly Trp Tyr Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 54

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Ala
1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 55

Ile Gly Asp Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> N/A

<400> 56

Ala Lys Leu Gly Gln Ser Ser Gly Trp Tyr Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15
Gly Met Asp Val
20

<210> 57

<211> 106

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> N/A

<400> 57

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Tyr Val
20 25 30
Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Arg Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Val
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 58

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 58

Lys Leu Gly Asn Lys Tyr
1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 59

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
1 5

<210> 60

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 60

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Asp
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Asp Tyr Ser Ile Ser Ser Asn

	20		25		30										
Asp	Trp	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
	35		40									45			
Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
	50		55								60				
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65					70					75					80
Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Val	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Thr	Arg	Val	Gly	Ala	Arg	Arg	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
	115						120								

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 61
 Asp Tyr Ser Ile Ser Ser Asn Asp Trp
 1 5

<210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 62
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Gly
 1 5

<210> 63
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 63
 Ala Arg Thr Arg Val Gly Ala Arg Arg Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 64
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 64
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 65
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 65

Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1 5

<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 66

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val
1 5 10

<210> 67
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 67

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Ser Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Val Lys Tyr Gly Ser Pro Gly Ser Leu Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 69

Ile Gly Ser Ser Ser Asn Thr Ile
1 5

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 70

Ala Arg Asp Arg Val Lys Tyr Gly Ser Pro Gly Ser Leu Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 71

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 71

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Ala Ser Ser Gly Asp His
85 90 95

Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 72

Ala Leu Pro Lys Lys Tyr
1 5

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 73

Tyr Ser Thr Ala Ser Ser Gly Asp His Arg Val
1 5 10

<210> 74

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 74

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Tyr
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 75
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 75

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp
 1 5

<210> 76
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 76

Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 77
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 77

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 78
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 78

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50		55		60
Ser 65	Gly	Ser	Gly	Thr 70
		Asp 70	Phe	Thr
			Leu	Thr 75
			Ile 75	Ser
			Ser	Leu
			Gln	Pro 80
Glu	Asp	Phe	Ala 85	Thr
			Tyr	Tyr
			Cys	Gln 90
			Gln 90	Tyr
			Leu	Tyr
			His	Pro 95
			Ala	
Thr	Phe	Gly	Gln 100	Gly
			Thr	Lys
			Val	Glu 105
			Ile	Lys

<210> 79
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 79

Gln Asp Val Ser Thr Ala
 1 5

<210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 80

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
 1 5

<210> 81
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 81

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 82
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 82

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp
 1 5

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 83

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 84
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 84

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 85
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 85

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

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

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

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 86

Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 87
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 87

Asp Ala Ser
1

<210> 88
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 88

Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 89
<211> 330
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> N/A

<400> 89

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 90
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 90
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 91
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 91

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 92
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 92

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 93
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 93

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 94

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens (Людина розумна)

<400> 94

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220
Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240
Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255
Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270
Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285
Glu Thr
290

<210> 95

<211> 186

<212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 95

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15
Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
20 25 30

Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
 35 40 45
 Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
 50 55 60
 Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
 65 70 75 80
 Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
 85 90 95
 Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile
 100 105 110
 Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr
 115 120 125
 Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly
 130 135 140
 Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro
 145 150 155 160
 Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 180 185

<210> 96
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 96

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 97
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 97

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 98
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 98

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 99
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> N/A

<400> 99

Gly Phe Thr Phe Asn Pro Tyr Ala
1 5

<210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> N/A

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Asn Met Tyr Ala
1 5

<210> 101
 <211> 16

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> N/A

<400> 101

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Val
1 5 10 15

<210> 102
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> N/A

<400> 102

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Met
1 5 10 15

<210> 103
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> N/A

<400> 103

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Arg
1 5 10 15

<210> 104
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> N/A

<400> 104

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 105
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> N/A

<400> 105

Val Arg Gly Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 106
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 106

His Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Ala Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Val Met Ser Tyr Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Thr Ser Asn Gly Trp Asn Tyr Tyr Phe Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 107
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 107

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
1 5

<210> 108
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 108

Met Ser Tyr Asp Gly Glu Thr Lys
1 5

<210> 109
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 109

Ala Lys Asp Thr Ser Asn Gly Trp Asn Tyr Tyr Phe Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val

<210> 110
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 110

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Phe Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Val Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Thr Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Arg Ser Gly Tyr His
 85 90 95
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 111
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 111

Ala Leu Pro Lys Lys Phe
1 5

<210> 112
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 112

Tyr Ser Thr Asp Arg Ser Gly Tyr His Trp Val
1 5 10

<210> 113
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 113

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325					330						

<210> 114
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> N/A

<400> 114

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 115
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

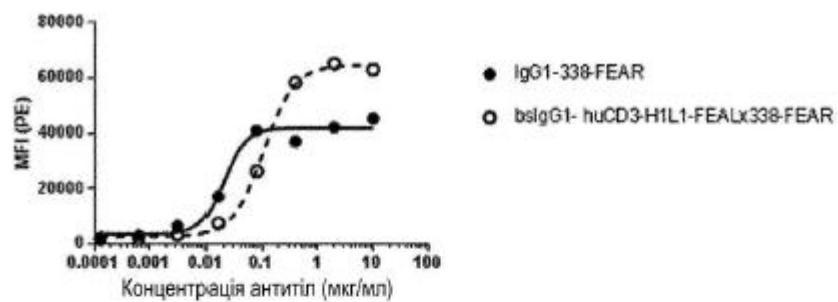
<220>
 <223> N/A

<400> 115

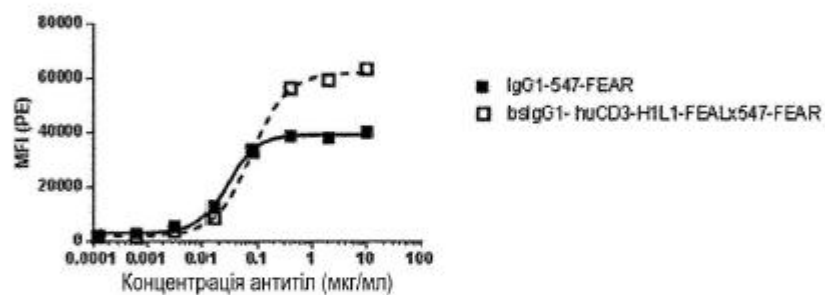
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145	150								155				160			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165					170					175		
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
			180					185					190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195					200					205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210					215					220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
225					230					235					240	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245					250					255		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
			260					265					270			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Leu	
		275					280					285				
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
	290					295					300					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
305					310					315					320	
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
				325					330							

A



B



C

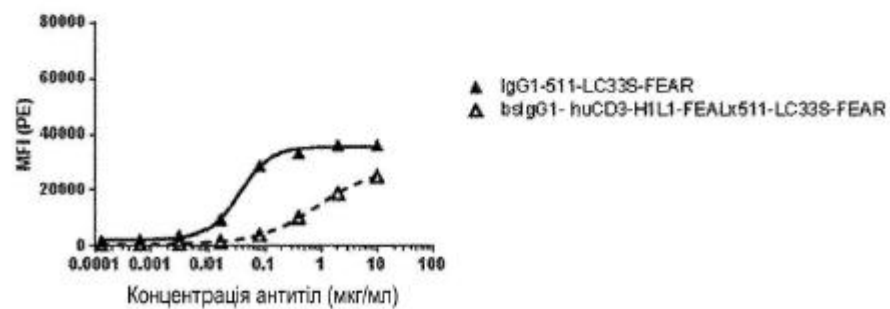
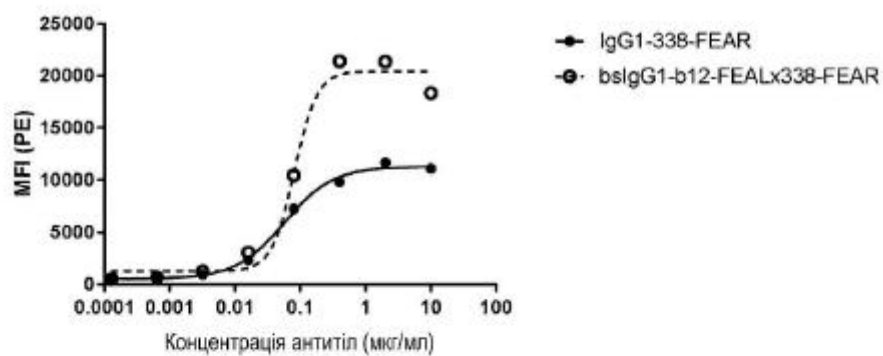
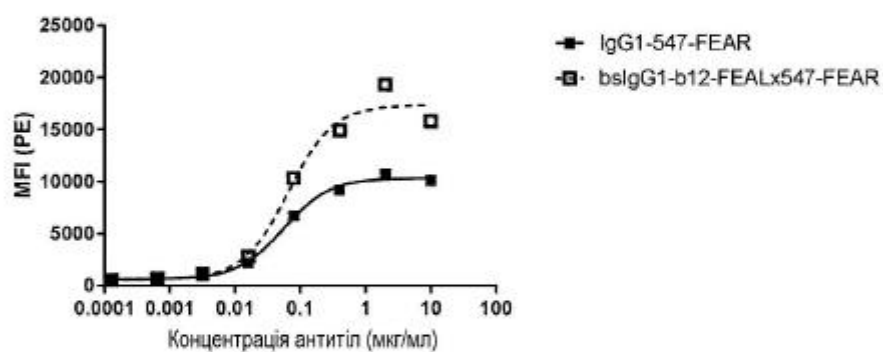


Fig. 1

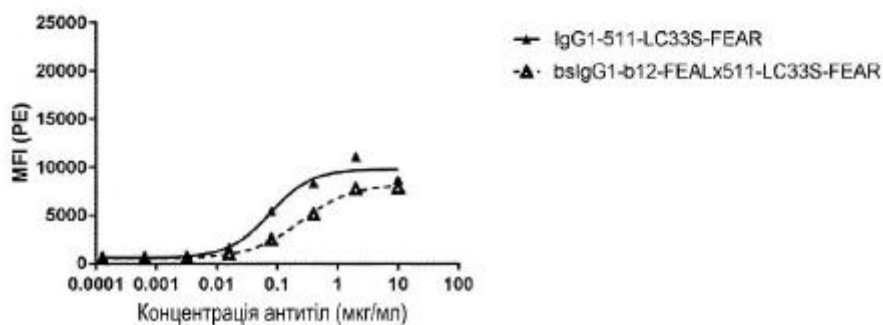
D



E

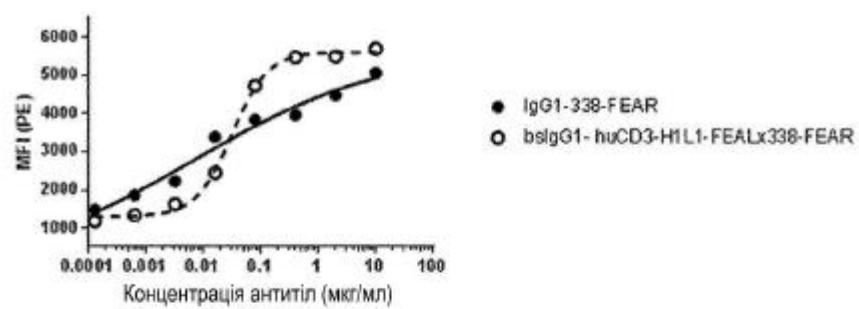


F

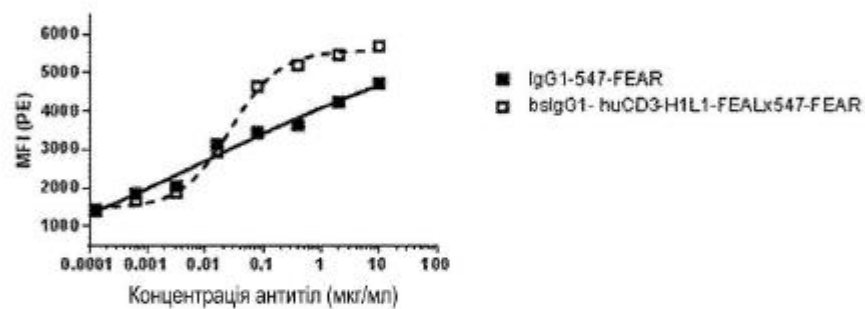


Фіг. 1 продовження

A



B



C

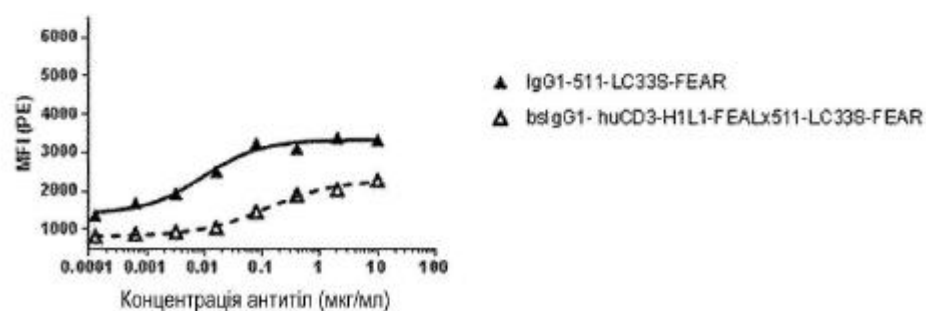
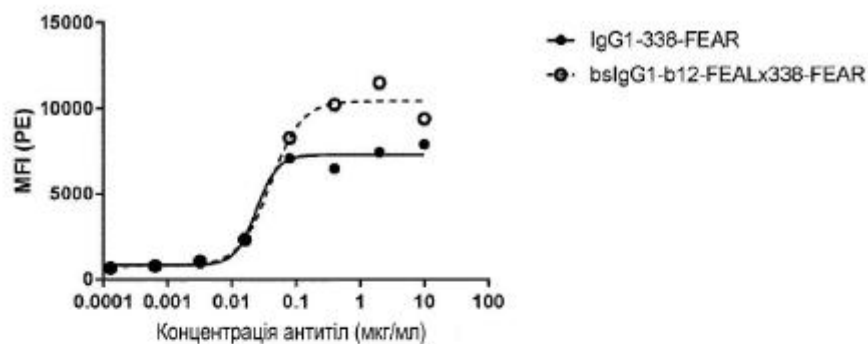
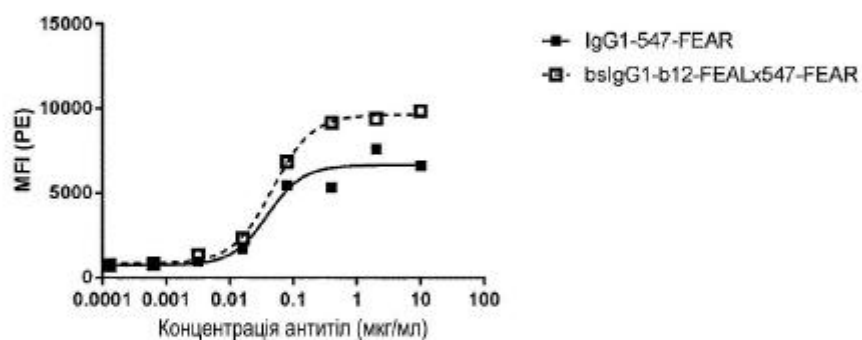


Fig. 2

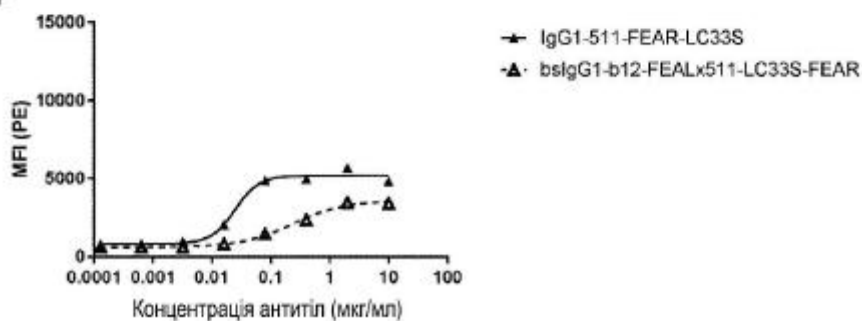
D



E

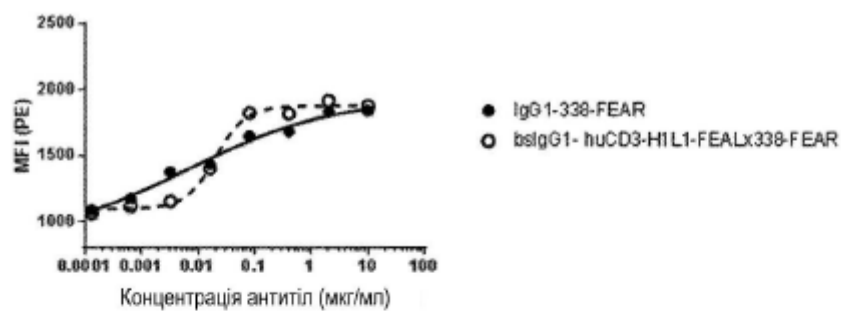


F

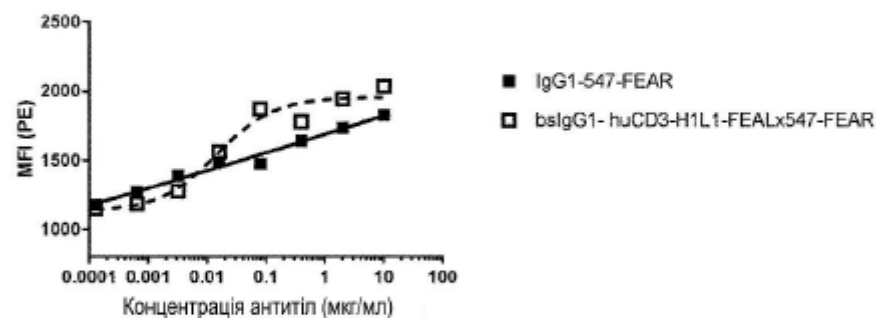


Фіг. 2 продовження

A



B



C

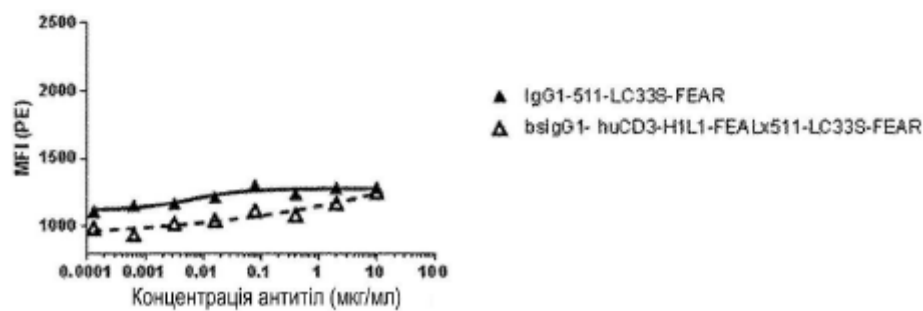
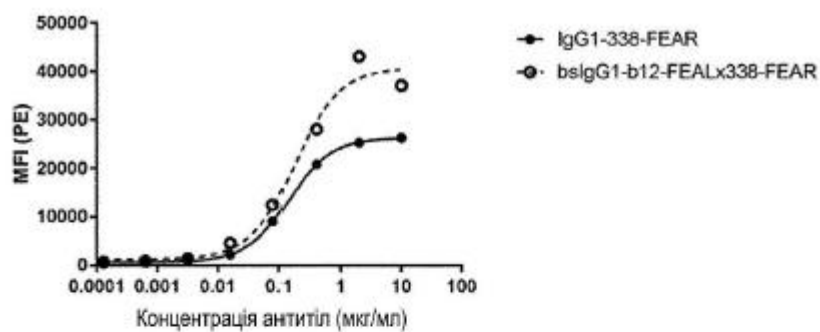
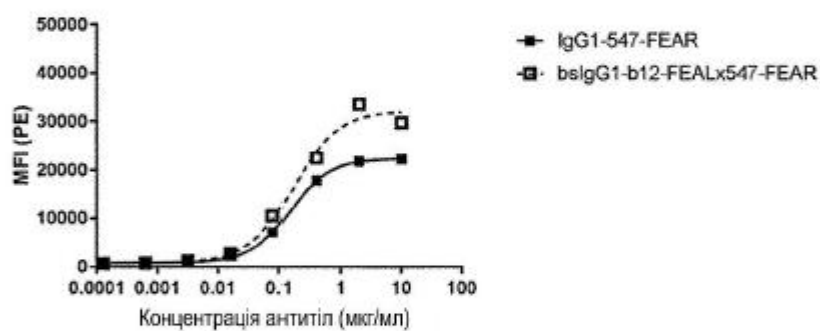


Fig. 3

A



B



C

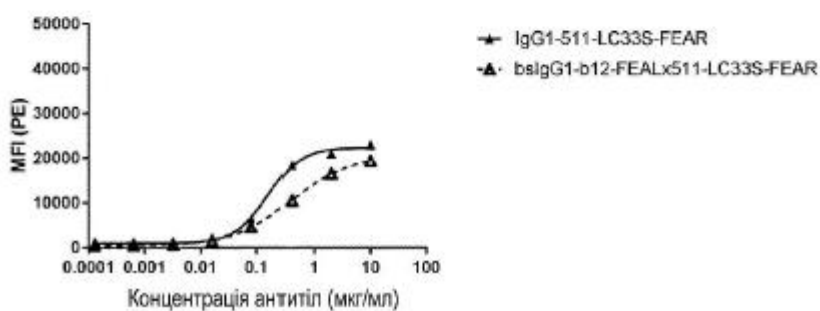
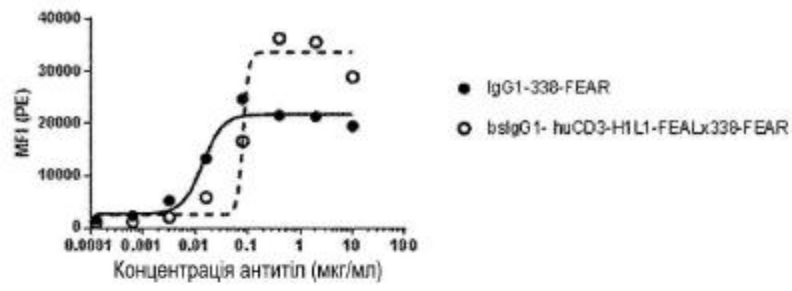
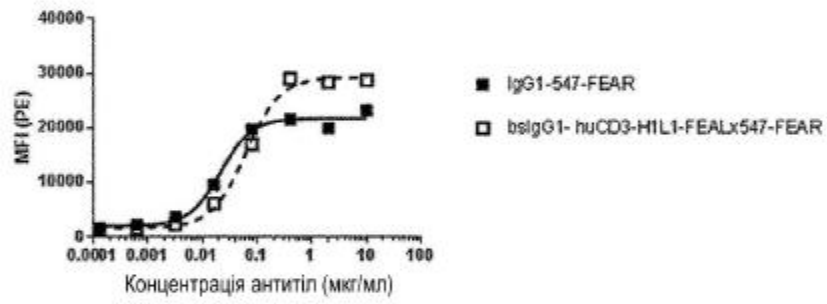


Fig. 4

A



B



C

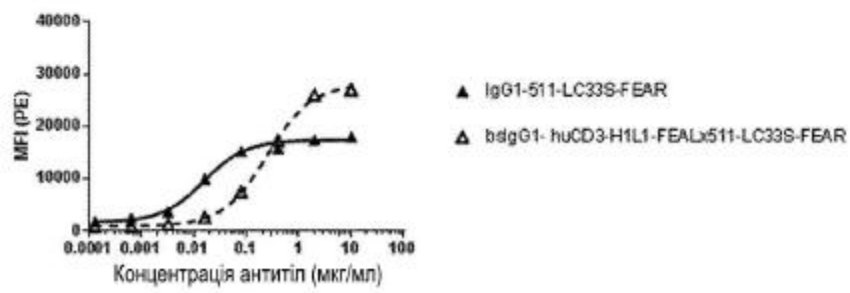
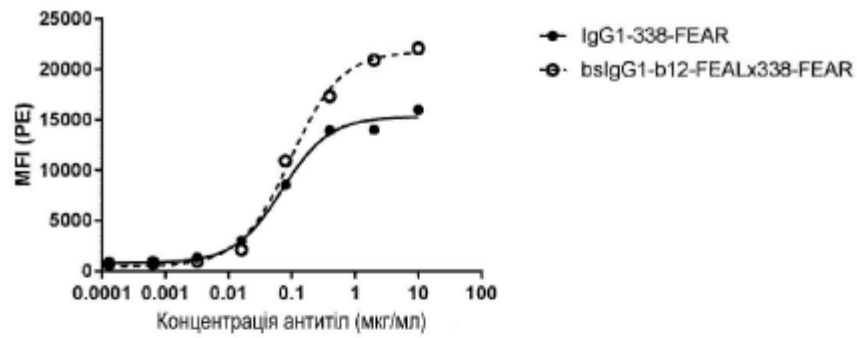
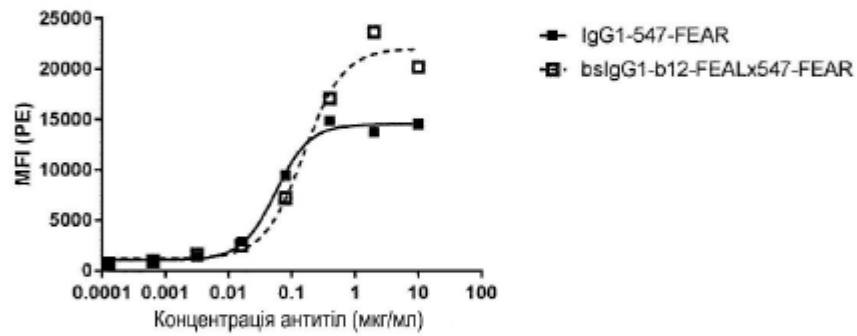


Fig. 5

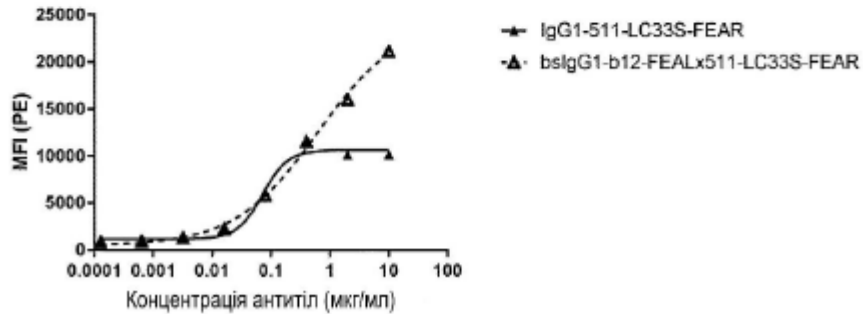
D



E



F



Фіг. 5 продовження

Антитіло	321	MEDI	338	MPDL	421- LC19S	547	511- LC-33S	476- N101Q- LC33S	632	516
321	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	*	0.6	0.6
MEDI	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	*	1.2	1.2
338	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	*	0.6	0.6
MPDL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	*	1.0	0.0
421- LC91S	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	0.2	0.0
547	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.8	0.7	0.7
511- LC33S	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.6
476- N101Q- LC33S	*	*	*	*	0.8	0.7	0.0	0.0	0.0	0.7
632	0.6	0.5	0.6	0.4	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.6
516	1.1	1.0	1.1	0.0	-0.1	0.8	1.1	1.2	1.1	0.0

A

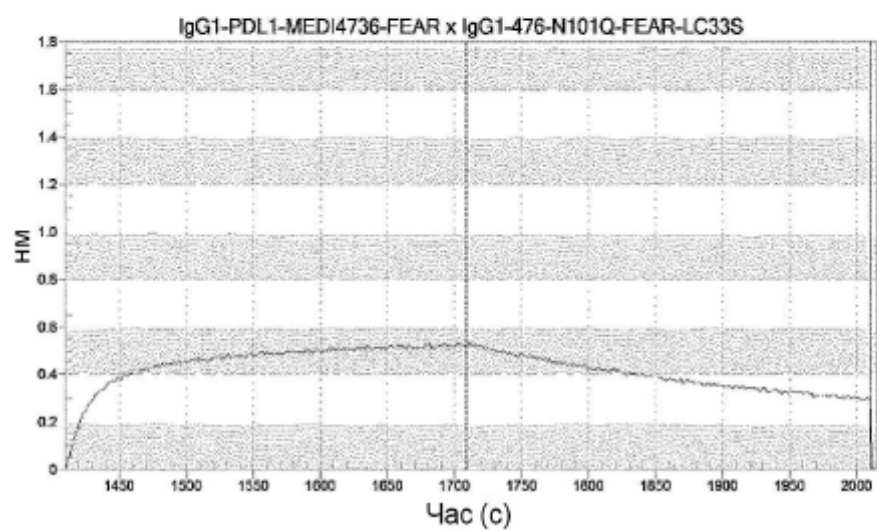
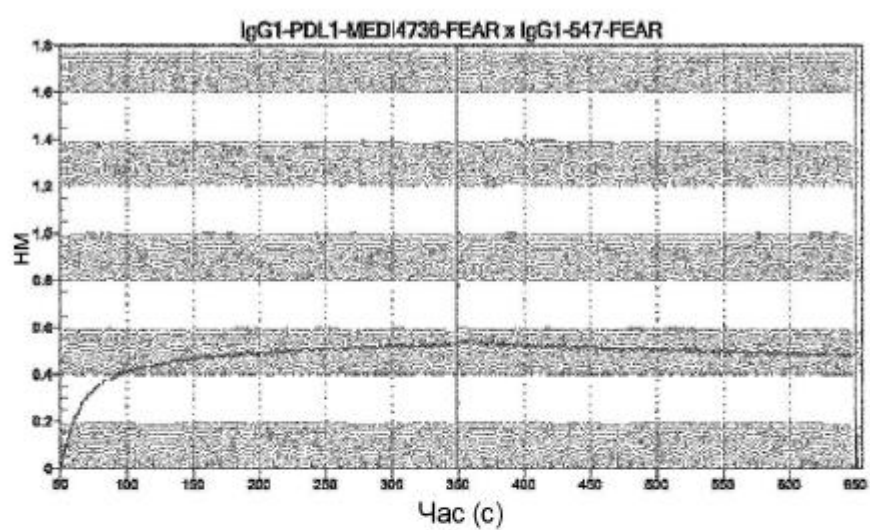
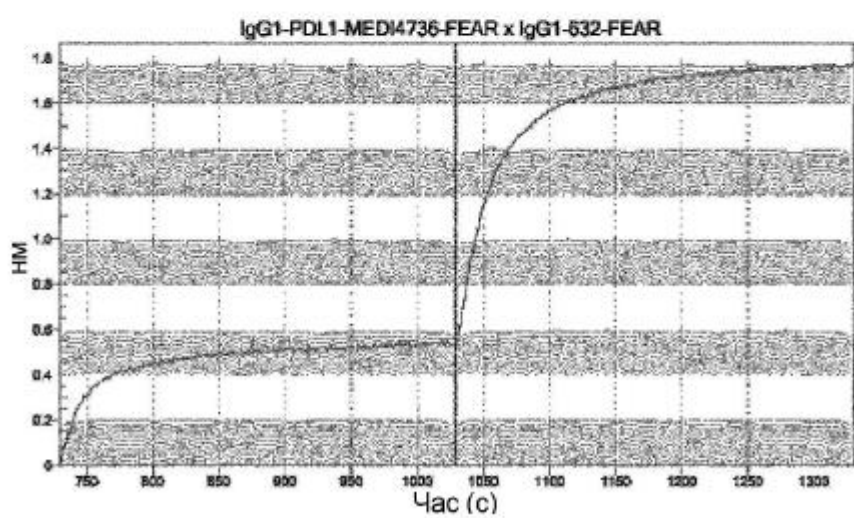


Fig. 6

B

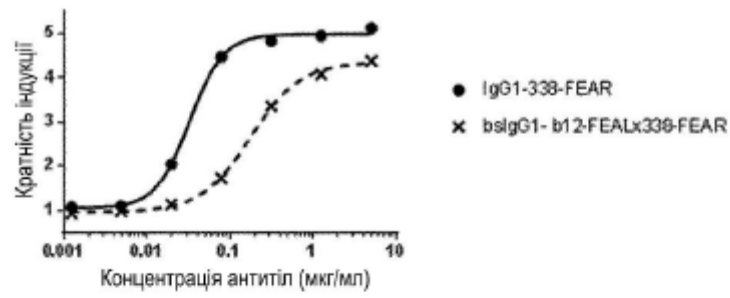


C

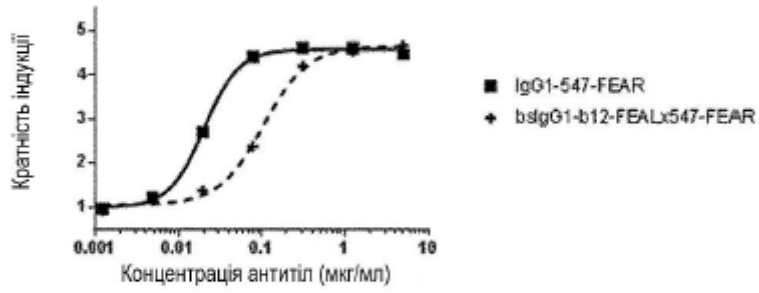


Фіг. 6 продовження

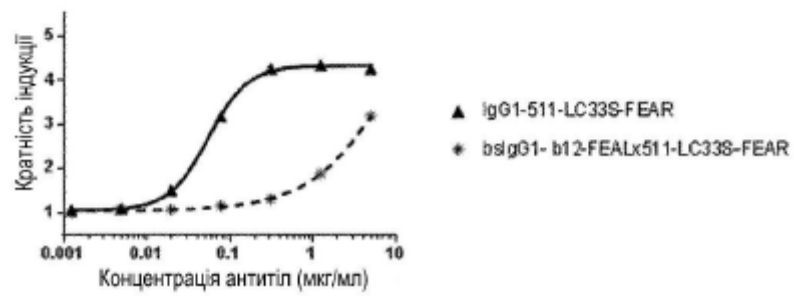
A



B

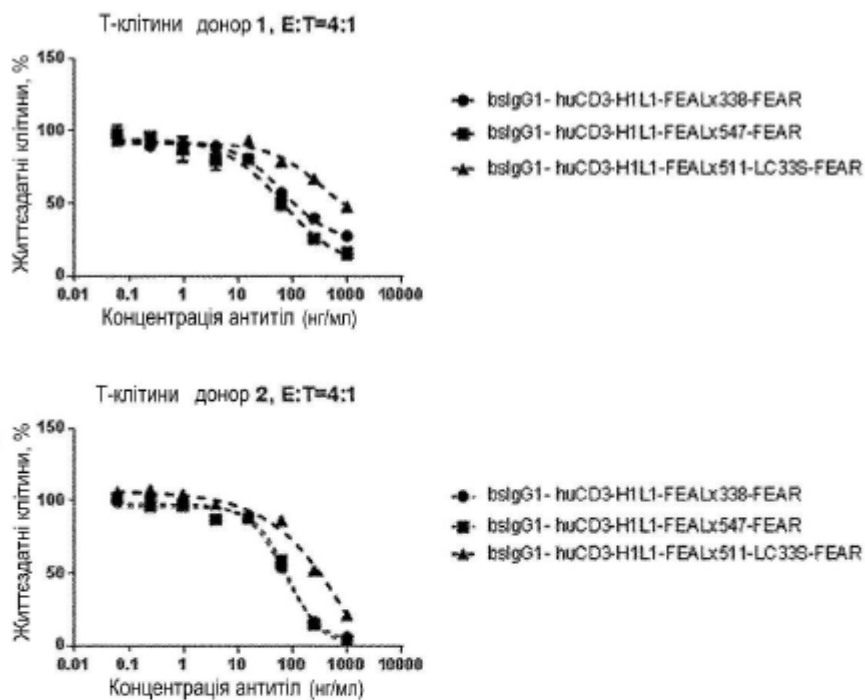


C

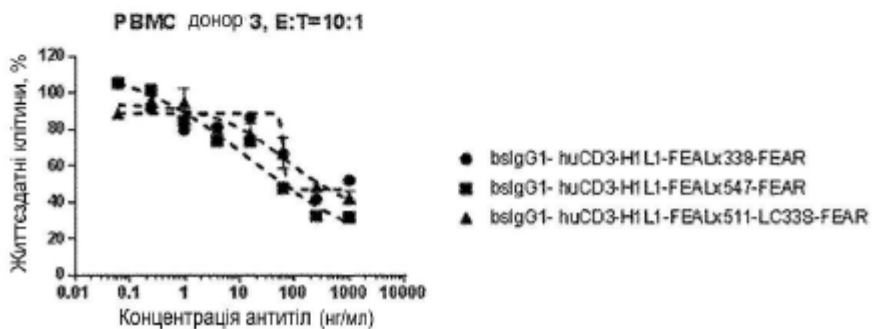


Фиг. 7

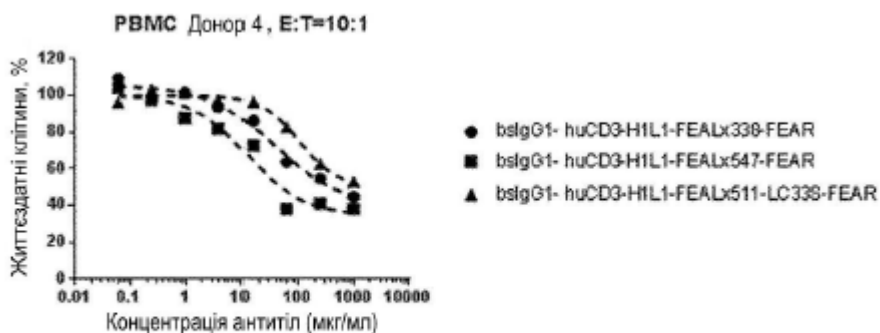
A



B

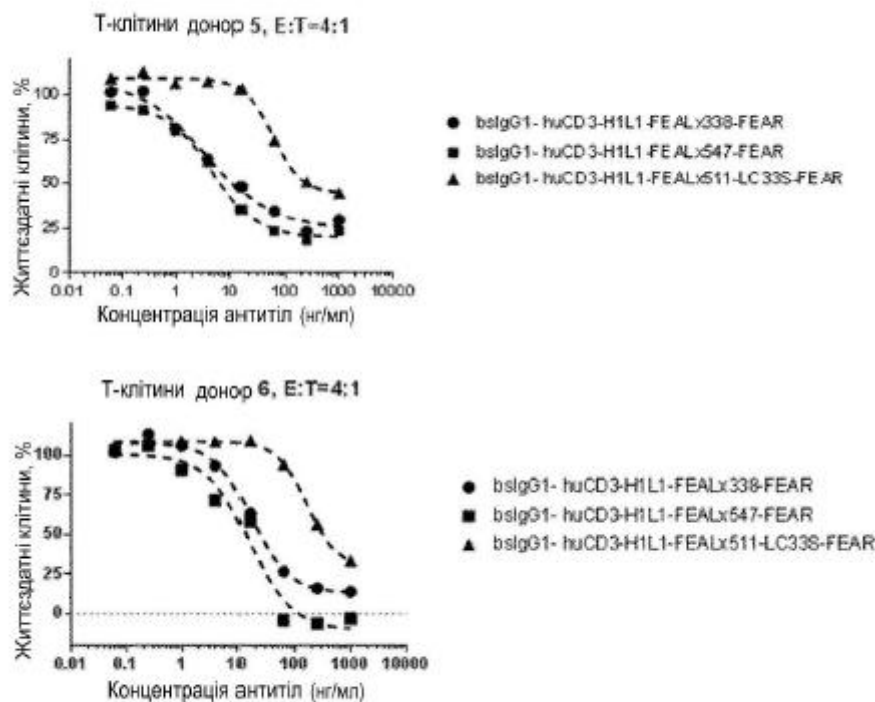


Фіг. 8

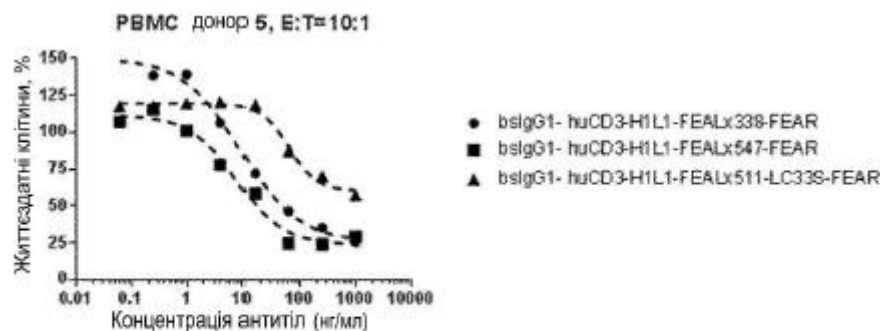


Фіг. 8 продовження

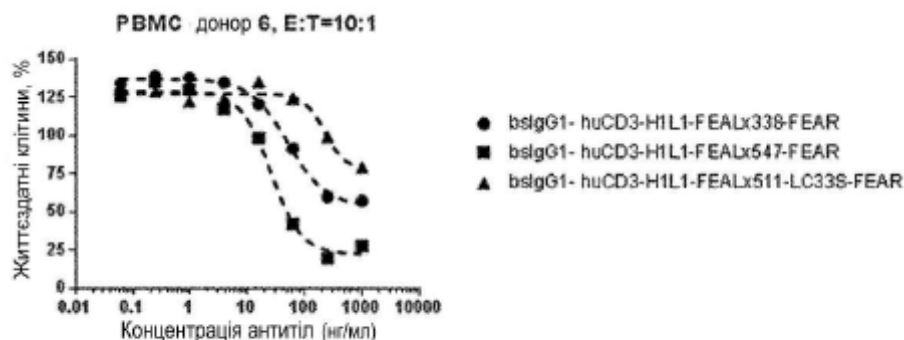
A



B

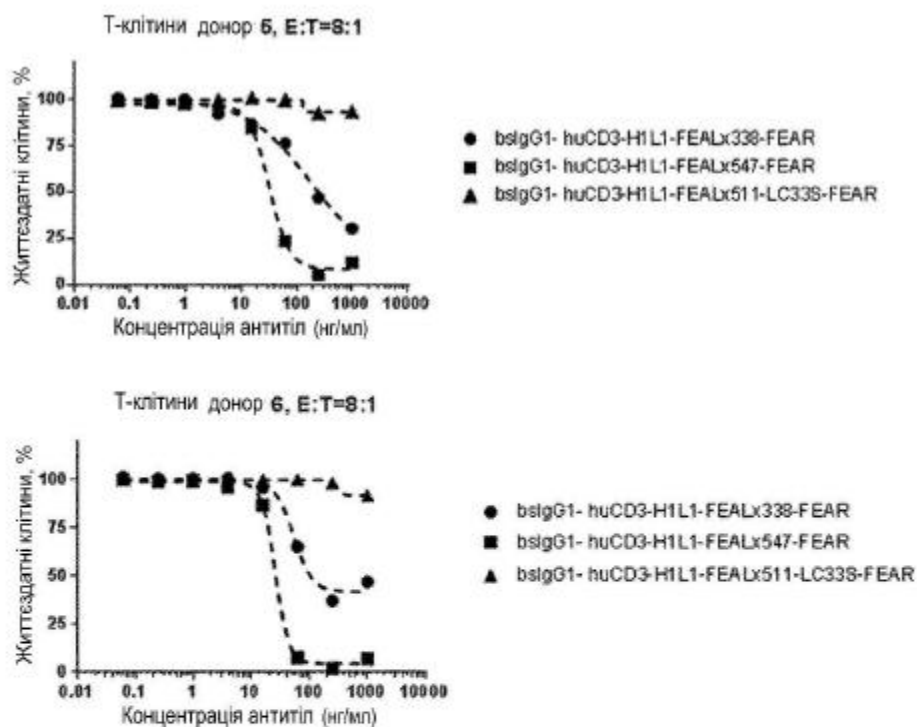


Фіг. 9

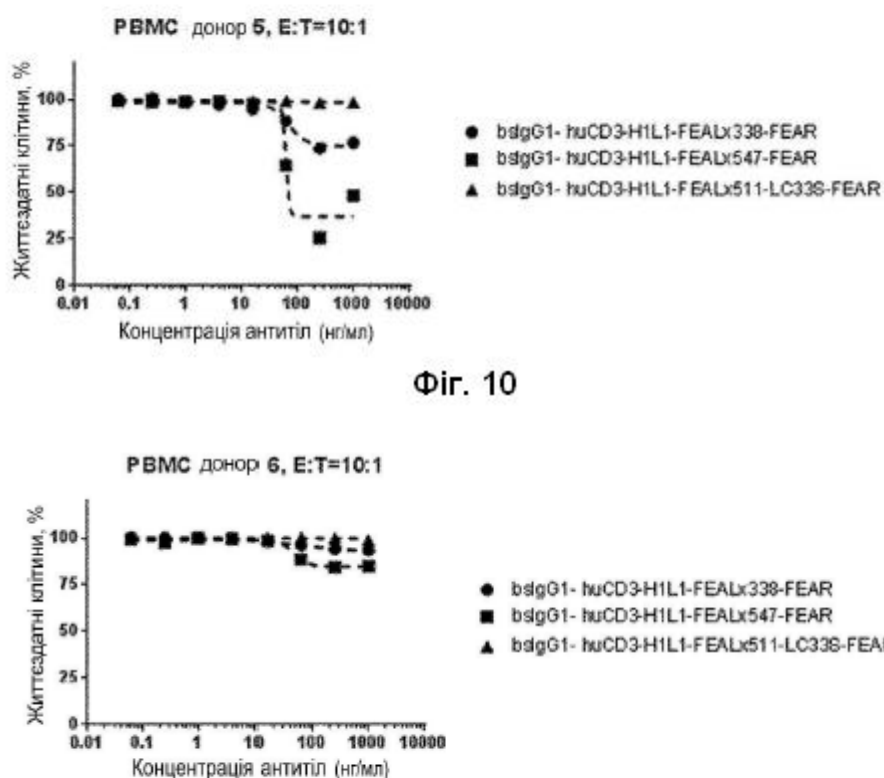


Фіг. 9 продовження

A



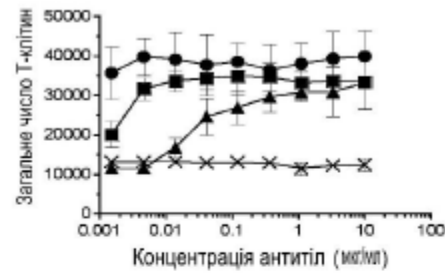
B



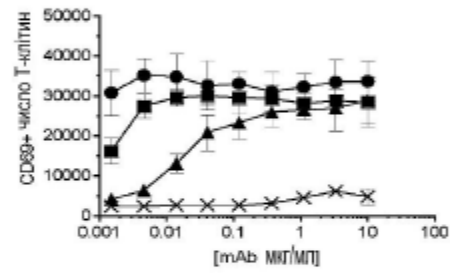
Фіг. 10

Фіг. 10 продовження

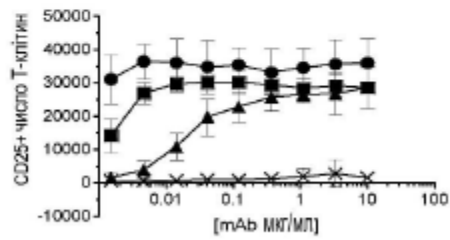
A



B

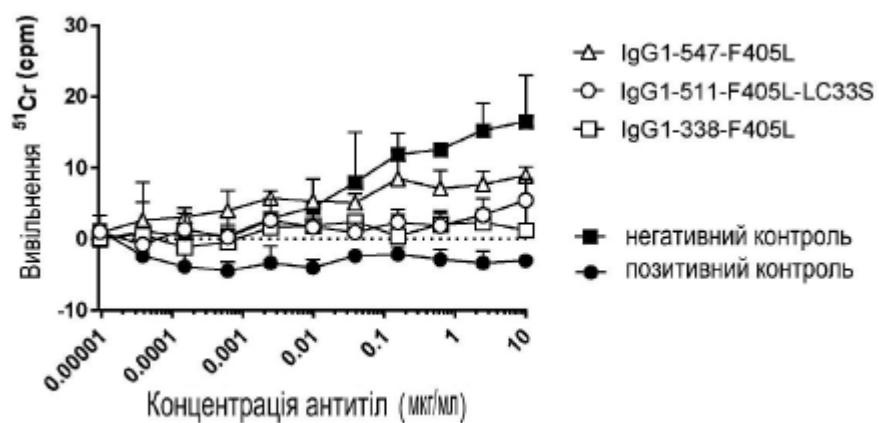


C

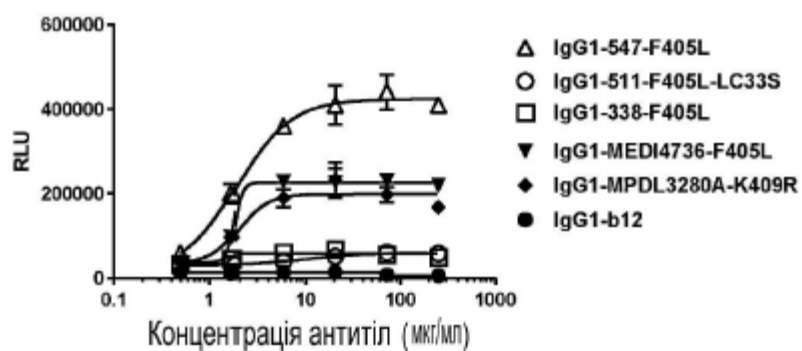


- bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR
- bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR
- ▲ bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR
- × IgG1-b12

Fig. 11



Фиг. 13



Фиг. 14