

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039865**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

(21) Номер заявки
201891582

(22) Дата подачи заявки
2017.01.11

**(54) ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ ГУМАНИЗИРОВАННОЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ
АНТИТЕЛО ПРОТИВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА И СЛИТЫЙ БЕЛОК**

(31) **62/277,113**

(32) **2016.01.11**

(33) **US**

(43) **2018.12.28**

(86) **PCT/IB2017/050127**

(87) **WO 2017/122130 2017.07.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
УНИВЕРСИТЕТ ЦЮРИХ (CH)

(72) Изобретатель:
**Аренас-Рамирес Наталия, Беувинк
Иван, Бойман Онур, Браннетти
Барбара, Катоподис Андреас, Попп
Симоне, Ренье Катрин, Цзоу Чао (CH)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) J. TOMALA ET AL.: "In Vivo Expansion of Activated Naive CD8⁺ T Cells and NK Cells Driven by Complexes of IL-2 and Anti-IL-2 Monoclonal Antibody As Novel Approach of Cancer Immunotherapy", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 183, № 8, 15 October 2009 (2009-10-15), p. 4904-4912, XP055369385, US, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.0900284, the whole document

WO-A2-2007095643

S. LETOURNEAU ET AL.: "IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor subunit CD25", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, № 5, 19 January 2010 (2010-01-19), p. 2171-2176, XP55182715, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0909384107, the whole document

JAKUB TOMALA ET AL.: "Chimera of IL-2 Linked to Light Chain of anti-IL-2 mAb Mimics IL-2/anti-IL-2 mAb Complexes Both Structurally and Functionally", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 8, № 5, 17 May 2013 (2013-05-17), p. 871-876, XP055369414, US, ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/cb3007242, the whole document

WO-A1-2016005950

(57) Настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с интерлейкином-2 человека (hIL-2). Настоящее изобретение более конкретно относится к гуманизованному антителу, которое специфически связывается с конкретным эпитопом hIL-2 и при связывании с этим эпитопом демонстрирует уникальную способность ингибировать связывание hIL-2 с CD25.

B1

039865

039865 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с интерлейкином-2 человека (hIL-2). Настоящее изобретение, в частности, относится к гуманизованному антителу, которое специфически связывается с конкретным эпитопом hIL-2 и, когда связывается с этим эпитопом, демонстрирует уникальную способность ингибировать связывание hIL-2 с CD25 и слияние между указанным антителом и hIL-2. Кроме того, настоящее изобретение относится к терапевтическим применениям антитела *in vitro* и *in vivo* в комбинации с hIL-2 и к терапевтическим применениям слияния *in vitro* и *in vivo*.

Уровень техники

Интерлейкин-2 (IL-2) представляет собой цитокин, способный к мощной стимуляции цитотоксических лимфоцитов против метастатических опухолей. Тем не менее IL-2 также способен к стимуляции так называемых CD25⁺CD4⁺ регуляторных Т-клеток (Трег-клеток), которые играют важнейшую роль в предотвращении аутоиммунного заболевания. Важно отметить, что Трег-клетки могут существенно ослаблять противоопухолевые ответы посредством цитотоксических лимфоцитов, таким образом, в некоторой степени вызывая противодействие благоприятным противоопухолевым эффектам IL-2. Более того при дозах, необходимых для достижения клинического противоопухолевого ответа, IL-2 может оказывать токсические побочные эффекты.

Иммунотерапию с использованием IL-2 применяли с ранних 1980-х для иммунотерапии метастатической меланомы и метастатической почечно-клеточной карциномы, что привело к одобрению данных показателей FDA (управление по контролю за продуктами и лекарствами) в 1996 г. и 1992 г. соответственно. В то время как высокая доза IL-2 продемонстрировала показатель пациентов с объективным ответом примерно 17% и полную регрессию у примерно 6-9% пациентов, страдающих от этих смертельных метастатических видов рака, данная доза IL-2 часто приводит к токсическим побочным эффектам, таким как гипотония, отек легких, повреждение клеток печени, желудочно-кишечная токсичность, синдром просачивания жидкости через сосуды (VLS) и общий отек. Более того, как указано выше, IL-2 способен стимулировать иммуносупрессорные Трег-клетки, которые в свою очередь способны снижать активность противоопухолевых CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток.

Существует несколько вариантов IL-2 человека, и были использованы разные стратегии с целью найти основанные на IL-2 соединения с улучшенными свойствами *in vivo*, такими как описанные в Rosalia et al., *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 23:39-46.

Тем не менее из-за нехватки подходящих антител к IL-2 человека успешной терапии, основанной на данном принципе и доступной для применения на пациентах, еще не было осуществлено.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится в целом к антителу или его фрагменту, которые связываются со специфическим эпитопом IL-2 человека, способам для их приготовления и применения, включая способы для лечения нарушений.

Антитело к IL-2 или его фрагмент, раскрытые в данном документе, можно применять (сами или в комбинации с другими средствами или терапевтическими методами) для лечения, предотвращения и/или диагностики расстройств, таких как злокачественные расстройства (например, опухоли плотных и мягких тканей и гематологические опухоли), так же как и инфекционных заболеваний (например, хронических инфекционных нарушений). Таким образом, в данном документе раскрыта композиция, содержащая антитело к IL-2 или его фрагмент, так же как и способ лечения рака, в котором применяют антитело к IL-2 или его фрагмент, или композицию, которая содержит антитело к IL-2 или его фрагмент.

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающую часть, которые связываются с IL-2 человека в соответствии с SEQ ID NO: 109, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельную область легкой цепи, которая содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, при этом LCDR1 предусматривает SEQ ID NO: 122; при этом LCDR2 предусматривает SEQ ID NO: 123; при этом LCDR3 предусматривает SEQ ID NO: 21; при этом HCDR1 предусматривает SEQ ID NO: 119; при этом HCDR2 предусматривает SEQ ID NO: 120; и при этом HCDR3 предусматривает SEQ ID NO: 121.

В варианте осуществления предусматриваются выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с первым аспектом, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельную область легкой цепи, которая содержит LCDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 90; LCDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 32; LCDR3, изложенную в SEQ ID NO: 21, и вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит HCDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 13; HCDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 12; и HCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 45.

В дополнительном варианте осуществления предусматривается выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с первым аспектом, при этом LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой

SEQ ID NO: 4, 2 и 3 соответственно; или LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 31, 32 и 21 соответственно и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 4, 2 и 3 соответственно; или LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 19, 20 и 21 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 13, 12 и 3; или LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 31, 32 и 21 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 13, 12 и 3; или LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 69, 20 и 21 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 4, 2 и 3 соответственно; или LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой 4, 2 и 36 соответственно; или LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 69, 20 и 21 соответственно и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой 4, 2 и 36 соответственно; или LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 19, 20, 21 соответственно и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой 4, 2 и 36 соответственно; и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 69, 20, 21 соответственно и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой 4, 2 и 36 соответственно.

В другом варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с первым аспектом содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), которые характеризуются по меньшей мере 95% идентичностью, как, например, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность с аминокислотными последовательностями VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 7 или VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 7 или VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 7 или VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 15 или VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 15 или VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 15 или VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 17 или VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 17 или VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 17 или VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 7 или VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 37 или VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 37, VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 7 или VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 37 или VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 37 или VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 17 или VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 49 или VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 49 или VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 17 или VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 49 или VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 49.

В одном варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с первым аспектом имеют вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), которые имеют аминокислотные последовательности VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 7 или VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 7 или VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 7 или VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 15 или VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 15 или VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 15 или VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 17 или VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 17 или VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 17 или VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 7 или VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 37 или VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 37, VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 7 или VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 37 или VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 37 или VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 17 или VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 49 или VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 49 или VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 17 или VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 49 или VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 49.

Выделенное антитело в соответствии с предыдущими вариантами осуществления может содержать Fc-домен, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 105. В предпочтительном варианте осуществления выделенное антитело содержит Fc-домен в соответствии с SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103 или SEQ ID NO: 105.

В конкретном варианте осуществления выделенное антитело содержит легкую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 124 и тяжелую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 126 или легкую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 128 и тяжелую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 130.

В соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения предусматриваются выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эпитопом интерлейкина-2 (hIL-2) человека, который содержит аминокислоты K52, P54, K55, T57, R58, T61, F62, K63, Q94 и K96.

В варианте осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии со вторым аспектом специфически связываются с аминокислотами K52, P54, K55, T57, R58, T61, F62, K63, Q94 и K96.

Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии со вторым аспектом могут связываться с эпитопом интерлейкина-2 (hIL-2) человека, который в дополнение к аминокислотам K52, P54, K55, T57, R58, T61, F62, K63, Q94 и K96 дополнительно содержит любую одну или более из аминокислот N50, N53, N91, L92, A93 и N97.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии со вторым аспектом специфически связываются с аминокислотами N50, K52, N53, P54, K55, T57, R58, T61, F62, K63, N91, L92, A93, Q94, K96 и N97.

В соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения предусматривается композиция для лечения различных нарушений, включающих раковые заболевания и/или хронический вирусный гепатит, содержащая антитело в соответствии с первым или вторым аспектами настоящего изобретения и IL-2

человека и фармацевтически приемлемый носитель, где рак выбран из группы, состоящей из метастатической злокачественной меланомы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, гормональной рефрактерной аденокарциномы предстательной железы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, нейробластомы, рака печени, гепатокарциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака мочеполового тракта, рака предстательной железы, рака тонкого кишечника, рака пищевода, саркомы, аденокарциномы, рака эндокринной системы, воспалительной миофибробластической опухоли, миеломы, лейкемии или лимфомы, включая В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз; одного или более хронических лейкозов, включая хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз.

В варианте осуществления композиция в соответствии с третьим аспектом содержит IL-2 человека, выбранный из группы, состоящей из IL-2 человека в соответствии с SEQ ID NO: 109 или альдеслейкина в соответствии с SEQ ID NO: 110, предпочтительно альдеслейкин в соответствии с SEQ ID NO: 110.

В соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения предусматривается слитый белок, связывающий CD122, который содержит антитело в соответствии с первым или вторым аспектами настоящего изобретения, и IL-2 человека.

В одном варианте осуществления антитело и IL-2 человека соединены линкерной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 397, SEQ ID NO: 398, SEQ ID NO: 399, SEQ ID NO: 400, SEQ ID NO: 401, SEQ ID NO: 402, SEQ ID NO: 403, SEQ ID NO: 404, SEQ ID NO: 405, SEQ ID NO: 406, SEQ ID NO: 407, SEQ ID NO: 408, SEQ ID NO: 409, SEQ ID NO: 410 и SEQ ID NO: 411, предпочтительно SEQ ID NO: 405 или SEQ ID NO: 407.

В одном варианте осуществления слитый белок содержит антитело в соответствии с первым или вторым аспектами настоящего изобретения, при этом LCDR1 антитела содержит остаток Y27 и остаток D30 в соответствии с определением согласно Kabat, и при этом остаток Y27 соединен с остатком N97 IL-2 человека посредством GG-линкера, и при этом остаток D30 соединен с остатком K96 IL-2 человека посредством линкера в соответствии с SEQ ID NO: 412.

В соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с первым или вторым аспектами настоящего изобретения, или композиция в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, или слитый белок в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения предусматриваются для применения в качестве лекарственного препарата для лечения различных нарушений, включающих раковые заболевания и/или хронический вирусный гепатит, где рак выбран из группы, состоящей из метастатической злокачественной меланомы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, гормональной рефрактерной аденокарциномы предстательной железы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, нейробластомы, рака печени, гепатокарциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака мочеполового тракта, рака предстательной железы, рака тонкого кишечника, рака пищевода, саркомы, аденокарциномы, рака эндокринной системы, воспалительной миофибробластической опухоли, миеломы, лейкемии или лимфомы, включая В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз; одного или более хронических лейкозов, включая хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз.

В соответствии с шестым аспектом настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с первым или вторым аспектами настоящего изобретения, или композиция в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, или слитый белок в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения предусматриваются для применения в производстве лекарственного препарата для лечения различных нарушений, включающих раковые заболевания и/или хронический вирусный гепатит, где рак выбран из группы, состоящей из метастатической злокачественной меланомы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, гормональной рефрактерной аденокарциномы предстательной железы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, нейробластомы, рака печени, гепатокарциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака мочеполового тракта, рака предстательной железы, рака тонкого кишечника, рака пищевода, саркомы, аденокарциномы, рака эндокринной системы, воспалительной миофибробластической опухоли, миеломы, лейкемии или лимфомы, включая В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз; одного или более хронических лейкозов, включая хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз.

В соответствии с седьмым аспектом настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с первым или вторым аспектами настоящего изобретения, или композиция в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, или слитый белок в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения предусматриваются для применения в лечении рака, где рак включает метастатическую злокачественную меланому, рак почки, почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному, гормональную рефрактерную аденокарциному предстательной железы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, нейробластому, рак печени, гепатокарциному, рак желудочно-кишечного тракта, рак мочеполового тракта, рак предстатель-

ной железы, рак тонкого кишечника, рак пищевода, саркому, аденокарциному, рак эндокринной системы, воспалительную миофибробластическую опухоль, миелому, лейкемию или лимфому, включая В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз; один или более хронических лейкозов, включая хронический миелолейкоз и/или хронический лимфолейкоз.

В соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения предусматривается способ лечения рака путем введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с первым или вторым аспектами настоящего изобретения, или композиции в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, или слитого белка в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения, где рак включает метастатическую злокачественную меланому, рак почки, почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному, гормональную рефрактерную аденокарциному предстательной железы, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, нейробластому, рак печени, гепатокарциному, рак желудочно-кишечного тракта, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак тонкого кишечника, рак пищевода, саркому, аденокарциному, рак эндокринной системы, воспалительную миофибробластическую опухоль, миелому, лейкемию или лимфому, включая В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз; один или более хронических лейкозов, включая хронический миелолейкоз и/или хронический лимфолейкоз.

В соответствии с девятым аспектом настоящего изобретения предусматривается вектор рекомбинантной экспрессии, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, способную кодировать антитело или его антигенсвязывающую часть в соответствии с первым или вторым аспектами настоящего изобретения.

В соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения предусматривается вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, способную кодировать слитый белок в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения.

В соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения предусматривается клетка-хозяин млекопитающего, которая содержит вектор в соответствии с девятым или десятым аспектами настоящего изобретения.

Антитела в соответствии с аспектами настоящего изобретения являются преимущественными, например, потому, что они обладают одним или более из следующих свойств. В результате связывания антитела с hIL-2 полученный комплекс mAb×hIL-2 больше не может эффективно связывать рецептор альфа IL-2 человека (также известный как CD25), значительно уменьшая связывание CD25 человека с mAb×hIL-2 до естественных уровней по сравнению со связыванием CD25 человека со свободным (не в составе комплекса) hIL-2, которые измерены по методике поверхностного плазмонного резонанса. Кроме того, антитела могут демонстрировать не поддающуюся измерению перекрестную реактивность к IL-2 мыши.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлен обзор трехмерной структуры комплекса Proleukin®/Fab-NARA1, полученного в примере 2.

На фиг. 2 представлен дополнительный анализ остатков эпитопа. На оси X перечислены аминокислотная последовательность и нумерация в соответствии с SEQ ID NO: 110. Верхняя сторона оси Y демонстрирует общее количество атомов NARA1-Fab, которые находятся в пределах 4 Å от соответствующего остатка Proleukin®, и нижняя сторона оси Y демонстрирует доступную для растворителя уменьшенную площадь (Å²) соответствующего остатка Proleukin® как следствие связывания с NARA1-Fab в соответствии с SEQ ID NO: 132.

На фиг. 3 показан наиболее важный остаток эпитопа, который распознается посредством NARA1-Fab.

На фиг. 4 показано перекрытие комплекса Proleukin®/NARA1-Fab с четвертичным комплексом IL-2/CD25/CD122/CD132.

На фиг. 5 показано перекрытие С-спиралей из IL-2_C145A (PDB: 3INK), D10 IL-2-мутеина ("Суперкин": PDB: 3QB1), IL-2/CD25/CD122/CD132 (PDB: 2B5I) и Proleukin®/NARA1-Fab.

На фиг. 6 показаны количества иммунцитов, полученных из селезенок мышей, которые получали фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), низкую дозу IL-2 человека (IL-2 LD), высокую дозу IL-2 человека (IL-2 HD) или комплексы IL-2/антитело, полученные с применением обозначенных моноклональных антител. Значения представлены в табл. 14 и 15.

На фиг. 7 показаны характерные бромдезоксисуридиновые (BrdU) профили CD8⁺CD44⁺CD122⁺ Т-клеток, полученных с селезенок мышей, которых обрабатывали, как показано на фиг. 6.

На фиг. 8 показаны характерные BrdU профили CD3⁺NK1.1⁺ NK-клеток, полученных с селезенок мышей, которых обрабатывали, как показано на фиг. 6.

На фиг. 9 и 10 показана схематическая иллюстрация слитого белка в соответствии с вариантом осуществления.

На фиг. 11 показано выравнивание слитого белка в соответствии с вариантом осуществления.

На фиг. 12-15 показана фенотипическая характеристика эндогенных CD8⁺ Т-клеток, CD8⁺CD44⁺CD122⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Трег-клеток и CD3⁺NK1.1⁺ NK-клеток, полученных с селезенки мышей, которых обрабатывали, как показано на фиг. 6, в соответствии с примером.

На фиг. 16 и 17 показаны количества подгрупп иммунных клеток и соотношений CD8⁺CD44⁺ Т-клеток и CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Трег-клеток, полученных с селезенки мышей, которых обрабатывали, как показано на фиг. 6, в соответствии с примером.

На фиг. 18-22 показаны характерные BrdU профили CD8⁺, CD8⁺CD44⁺CD122⁺ Т-клеток, CD3⁺NK1.1⁺DX5⁺ NK-клеток, CD4⁺ Т-клеток и CD4⁺CD25⁺ Т-клеток, полученных из селезенки мышей, которых обрабатывали, как показано на фиг. 6, в соответствии с примером.

На фиг. 23 показана фенотипическая характеристика эндогенных CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток, полученных с селезенки мышей, которые получали PBS, слитые белки L15, L20 или L25 или комплексы IL-2 человека/NARA1 в соответствии с примером.

На фиг. 24 показаны количества клеток обозначенных иммуноцитов, полученных с селезенки мышей, которых обрабатывали, как показано на фиг. 23, в соответствии с примером.

На фиг. 25 показаны характерные BrdU профили CD8⁺CD44⁺CD122⁺ Т-клеток и CD3⁺NK1.1⁺ NK-клеток, полученных с селезенки мышей, которых обрабатывали, как показано на фиг. 23, в соответствии с примером.

На фиг. 26 показаны кривые пролиферации клеток CTLL-2, полученных из эксперимента *in vitro* с применением клеток CTLL-2, которые стимулировали посредством титрованных доз слитых белков L15, L20 или L25, комплексов IL-2 человека/NARA1 или IL-2 человека, в соответствии с примером.

На фиг. 27 показаны уровни STAT5 фосфорилирования клеток CTLL-2, которые стимулировали посредством титрованных доз комплексов IL-2 человека/NARA1, IL-2 человека или слитых белков L15, L20 или L25 в соответствии с примером.

Краткое описание таблиц

Табл. 1 представляет собой обзор антител к IL-2 в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 2 представляет собой обзор мутантов IL-2 в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 3 представляет статистические данные структуры для комплекса Proleukin®/NARA1-Fab.

Табл. 4 представляет собой обзор эпитопа и паратопа в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 5 представляет собой обзор переменных областей тяжелой цепи в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 6 представляет собой обзор переменных областей легкой цепи в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 7 содержит pI данные антител в соответствии с некоторыми вариантами осуществления.

Табл. 8 содержит данные сравнения переменных областей и переменных областей зародышевой линии.

Табл. 9 демонстрирует структурно улучшенные переменные области в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 10 содержит информацию о переменных легких цепях и переменных тяжелых цепях в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 11 содержит информацию по CDR легкой цепи в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 12 содержит информацию по CDR тяжелой цепи в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 13 содержит информацию по оптимизированным переменным легким цепям и переменным тяжелым цепям в соответствии с вариантом осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 14 представляет собой обзор VH мутантных последовательностей.

Табл. 15 представляет собой обзор мутантных по VK последовательностей.

Табл. 16 представляет собой обзор последовательностей плазмиды.

Табл. 17 представляет собой обзор антител с "созревшей аффинностью" в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 18 представляет собой обзор последовательности из первой группы антител.

Табл. 19 представляет собой обзор значений ELISA в соответствии с примером.

Табл. 20 представляет собой обзор значений EC₅₀ в соответствии с примером.

Табл. 21 представляет собой данные по подгруппе антител с "созревшей аффинностью" в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 22 представляет собой обзор последовательности подгруппы антител в соответствии с табл. 21.

Табл. 23 представляет данные по аффинности связывания.

Табл. 24 представляет данные по пролиферации CD8⁺ Т-клеток.

Табл. 25 представляет данные по пролиферации CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток.

Табл. 26 и 27 представляют данные количества клеток.

Табл. 28 представляет собой обзор линкерных последовательностей в соответствии с вариантами осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 29 представляет собой обзор слитых белков в соответствии с вариантом осуществления по настоящему изобретению.

Табл. 30 представляет данные по пролиферации CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток.

Табл. 31 представляет данные количества CD8⁺ Т-, NK- и Treg-клеток.

Табл. 32 и 33 представляют данные количества клеток.

Табл. 34 представляет данные соотношения количества клеток.

Табл. 35 и 36 представляют последовательности областей легких цепей слитых белков.

Табл. 37 представляет собой обзор слитых белков.

Табл. 38 представляет данные количества клеток.

Табл. 39 и 40 представляют значения EC₅₀ в соответствии с примером.

Табл. 41 представляет собой перечень последовательностей, который содержит последовательности, полезные для реализации на практике настоящего изобретения.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к антителам и их фрагментам, которые связываются с IL-2 человека и влияют на функцию данного цитокина *in vivo*.

Под "интерлейкином-2 человека" или "hIL-2", используемым в данном документе, подразумевают IL-2 человека (дикий тип или wt) с номером UniProt ID P60568, воспроизведенный в данном документе как SEQ ID NO: 109. В различные варианты осуществления настоящего изобретения также включены варианты, изоформы и виды гомологов дикого типа IL-2 человека. Соответственно антитела настоящего изобретения могут в некоторых случаях вступать в перекрестную реакцию с IL-2 видов, отличных от человека. В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть полностью специфическими для одного или более белков IL-2 человека и могут не проявлять видов или других типов не свойственной человеку перекрестной реактивности.

Термин "мутеин" означает полипептид, в котором были осуществлены специфические замены на белок интерлейкина-2. Используемый в ссылке на способы введения и лечения термин "мутеин IL-2" означает 1, 2, 3, 4 или 5 или более мутеинов IL-2. Например, лечение, в котором применяют мутеин IL-2, может относиться к лечению с единичным мутеином IL-2 или комбинации нескольких мутеинов IL-2. Пример IL-2 человека представляет собой мутеин IL-2, раскрытый в WO 2012/107417 A1, который имеет 3 мутации по сравнению с hIL-2 wt.

Proleukin® (альдеслейкин) представляет собой другой пример варианта IL-2 wt человека, хорошо известный специалисту в данной области техники, и представлен в данном документе в виде SEQ ID NO: 110.

Термины "антитело" или "антитело к IL-2" и т.п., использованные в данном документе, относятся ко всем антителам, которые взаимодействуют с (например, посредством связывания, стерического несоответствия, стабилизации/дестабилизации, пространственного распространения) эпитопом IL-2 и препятствуют связыванию IL-2 с рецепторами альфа IL-2 (также обозначаемыми CD25). Встречающееся в природе "антитело" представляет собой гликопротеин, который содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные посредством дисульфидных связей. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращено в данном документе как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая из легких цепей состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращено в данном документе как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена - CL. VH- и VL-области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, обозначаемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые разделены более консервативными областями и обозначены как каркасные области (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных с amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, которые включают различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Термин "антитело" подразумевает, например, моноклональные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, антитела верблюдовых или гибридные антитела. Антитела могут быть любого изотипа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Легкие и тяжелые цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "вариабельный" применяется функционально. В этом отношении следует понимать, что вариабельные домены легких (VL) и тяжелых (VH) частей цепи определяют распознавание антигена и его специфичность. Напротив, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или

СНЗ) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная мобильность, связывание с Fc-рецептором, связывание комплемента и т.п. Принято, что нумерация доменов константных областей увеличивается по мере того, как они становятся более дистальными от антигенсвязывающего сайта или amino-конца антитела. N-конец представляет собой вариабельную область, и карбокси-конец представляет собой константную область; домены СНЗ и СL фактически содержат карбокси-конец тяжелой и легкой цепей соответственно. В частности, термин "антитело" специфически включает формат IgG-scFv.

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или просто "антигенная часть"), используемый в данном документе, относится к или одному, или более полноразмерным фрагментам антитела, таким как белок, который сохраняет способность специфически связываться с антигеном или эпитопом (например, часть IL-2).

"Определяющие комплементарность области" ("CDR") представляют собой аминокислотные последовательности с границами, определенными с применением любого количества хорошо известных схем, включая те, что описаны в Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (нумерация "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (нумерация "Chothia") и ImMunoGenTics (IMGT) numbering (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) (нумерация "IMGT"). Например, для классических форматов, согласно Kabat, аминокислотные остатки CDR в домене тяжелой вариабельной цепи (VH) нумеруют 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в домене легкой вариабельной цепи (VL) нумеруют 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Согласно Chothia аминокислоты CDR в VH нумеруют 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки в VL нумеруют 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). Объединяя определения CDR согласно обоим Kabat и Chothia, CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH человека и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL человека. Согласно IMGT аминокислотные остатки CDR в VH нумеруют примерно 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) и 93-102 (CDR3) и аминокислотные остатки CDR в VL нумеруют примерно 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) и 89-97 (CDR3) (нумерация в соответствии с "Kabat"). Согласно IMGT CDR-области антитела можно определить с применением программы IMGT/DomainGap Align.

Термин "эпитоп-связывающий домен" или "EBD" относится к составляющим антигенсвязывающей части (например, антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент или производное), которая специфически взаимодействует с (например, посредством связывания, стерического несоответствия, стабилизации/дестабилизации, пространственного распространения) сайтом связывания на целевом эпитопе. EBD также относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически взаимодействовать с (например, посредством связывания, стерического несоответствия, стабилизации/дестабилизации, пространственного распространения) эпитопом IL-2 и препятствуют связыванию IL-2 с рецептором альфа IL-2 (CD25). Примеры фрагментов антител включают без ограничения scFv, Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, который состоит из доменов VL, VH, CL и CH1; F(ab)₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, который содержит два Fab-фрагмента, соединенные посредством шарнирной области дисульфидного мостика; Fd-фрагмент, который состоит из доменов VH и CH1; Fv-фрагмент, который состоит из доменов VL и VH одного плеча антитела; dAb-фрагмент (Ward et al. (1989), Nature 341:544-546), который состоит из домена VH; и выделенную определяющую комплементарность область (CDR).

Термин "эпитоп", используемый в данном документе, относится к любой детерминанте, способной связываться с высокой аффинностью с иммуноглобулином. Эпитоп представляет собой область антигена, связанную антителом, которое специфическим целенаправленно воздействует на данный антиген, и когда антиген представляет собой белок, эпитоп включает специфические аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антителом. Наиболее часто эпитопы локализируются на белках, но в некоторых случаях могут локализоваться на молекулах других видов, таких как нуклеиновые кислоты. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфоритовые или сульфониловые группы, и могут иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики заряда. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены путем применения методов рекомбинации, посредством синтетического линкера, который позволяет преобразовать их в единичную белковую цепь, в которой пары областей VL и VH образуют моновалентные молекулы (известные как единичная цепь Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988), Science, 242:423-426; и Huston et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., 85:5879-5883).

Такие одноцепочечные антитела, как предполагается, охватывают термины "фрагмент", "эпитоп-связывающий фрагмент" или "фрагмент антитела". Данные фрагменты получают путем применения общепринятых методик, которые известны специалистам в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу на предмет пригодности таким же образом, как интактные антитела.

Фрагменты антител могут быть встроены в одноцепочечные молекулы, которые содержат пару тан-

демных Fv-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al. (1995), Protein Eng. 8:1057-1062; и патент США № 5641870), и также включают Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, и антиидиотипические (anti-Id) антитела (включая, например, anti-Id антитела к антителам по настоящему изобретению), и любые эпитоп-связывающие фрагменты из вышеперечисленных.

EBD также включают однодоменные антитела, макситела, унитела, минитела, триатела, тетратела, v-NAR и bis-scFv, как известно из уровня техники (см., например, Hollinger and Hudson (2005), Nature Biotechnology 23: 1126-1136), биспецифические одноцепочечные диатела или одноцепочечные диатела, разработанные для связывания двух отдельных эпитопов. EBD также включают антителоподобные молекулы или миметики антител, которые включают без ограничения минитела, макситела, белковые каскады, основанные на Fn3, анкириновые повторы (также известны как DARpin), VASP-полипептиды, панкреатический полипептид птичьих (aPP), тетранектин, аффилилин, ноттины, SH3-домены, PDZ-домены, тендаместат, неокарциноостатин, домены А-белка, липокалины, трансферрины и домены Куница, которые специфически связывают эпитопы, которые находятся в объеме настоящего изобретения. Фрагменты антител могут быть привиты в каркасы на основе полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США № 6703199, который описывает моноклональный полипептид фибронектина).

Фраза "выделенное антитело", использованная в данном документе, относится к антителу, которое по сути не содержит других антител, обладающих отличающейся антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывает IL-2, по сути не содержит других антител, которые специфически связывают другие антигены кроме IL-2). Выделенное антитело, которое специфически связывает IL-2, может, однако, иметь перекрестную реактивность к другим антигенам, таким как молекулы IL-2 других видов. Более того выделенное антитело может по сути не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Термин "моновалентное антитело", используемый в данном документе, относится к антителу, которое связывается с единичным эпитопом на целевой молекуле, такой как IL-2.

Термин "бивалентное антитело", используемый в данном документе, относится к антителу, которое связывается с двумя эпитопами на по меньшей мере двух идентичных целевых молекулах IL-2. Бивалентное антитело может также сшивать целевые молекулы IL-2 друг с другом. "Бивалентное антитело" также относится к антителу, которое связывается с двумя разными эпитопами на по меньшей мере двух идентичных целевых молекулах IL-2.

Термин "мультивалентное антитело" относится к единичной связывающей молекуле с "валентностью" более единицы, где "валентность" описывается как количество антигенсвязывающих фрагментов на молекулу конструкции антитела. Таким образом, единично связывающая молекула может связываться с более чем одним сайтом связывания на целевой молекуле. Примеры мультивалентных антител включают без ограничения бивалентные антитела, тривалентные антитела, тетравалентные антитела, пентавалентные антитела и т.п., так же как биспецифические антитела и бипаратопные антитела. Например, для IL-2 мультивалентное антитело (например, бипаратопное антитело IL-2) имеет связывающий фрагмент для двух доменов IL-2 соответственно.

Мультивалентное антитело опосредует биологический эффект или модулирует болезнь или расстройство у субъекта (например, путем опосредования или способствования уничтожению клеток или путем модуляции количества биодоступного вещества).

Термин "мультивалентное антитело" также относится к единично связывающей молекуле, которая имеет более одного антигенсвязывающего фрагмента для двух отдельных целевых молекул IL-2. Например, антитело, которое связывается как с целевой молекулой IL-2, так и второй целевой молекулой, которая не является IL-2. В одном варианте осуществления мультивалентное антитело представляет собой тетравалентное антитело, которое имеет четыре эпитоп-связывающих домена. Тетравалентная молекула может быть биспецифической и бивалентной для каждого сайта связывания на данной целевой молекуле.

Термин "бипаратопное антитело", используемый в данном документе, относится к антителу, которое связывается с двумя разными эпитопами на одной мишени IL-2. Термин также подразумевает антитело, которое связывается с двумя доменами по меньшей мере двух мишеней IL-2, например тетравалентное бипаратопное антитело.

Термин "биспецифическое антитело", используемый в данном документе, относится к антителу, которое связывается с двумя или более разными эпитопами на по меньшей мере двух разных мишенях (например, IL-2 и мишень, которая не является IL-2).

Фразы "моноклональное антитело" или "композиция моноклональных антител", использованные в данном документе, относятся к полипептидам, включая антитела, биспецифические антитела и т.д., которые характеризуются по сути идентичной аминокислотной последовательностью или получены из одного и того же источника генов. Данный термин также подразумевает получение молекул антител единичной молекулярной композиции. Композиция моноклональных антител демонстрирует специфичность и аффинность единичного связывания для конкретного эпитопа.

Термин "гуманизированное антитело" или "гуманизированное антитело к IL-2", используемый в данном документе, подразумевает антитела, в которых последовательности CDR, полученные с зароды-

шевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты к каркасным последовательностям человека. Дополнительные модификации каркасных областей могут быть выполнены в каркасных последовательностях человека, так же как в последовательностях CDR, полученных с зародышевой линии других видов млекопитающих.

Гуманизированные антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями человека (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или представленные соматическими мутациями *in vivo* или консервативной заменой, способствующей стабильности или получению).

Фраза "рекомбинантное гуманизированное антитело", использованная в данном документе, включает все антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены посредством рекомбинантных методов, такие как антитела, выделенные из клеток-хозяев, преобразованные с целью экспрессировать гуманизированное антитело, например, с транскриптомом, и антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены любыми другими способами, которые включают сплайсинг всех или части генов иммуноглобулина человека, последовательностей в другие ДНК-последовательности.

Термин "Fc-область", используемый в данном документе, относится к полипептиду, который содержит CH3, CH2 и по меньшей мере часть шарнирной области константного домена антитела. Необязательно Fc-область может включать домен CH4, присутствующий в некоторых классах антител. Fc-область может содержать всю шарнирную область константного домена антитела. В одном варианте осуществления настоящее изобретение содержит Fc-область и CH1-область антитела. В другом варианте осуществления настоящее изобретение содержит CH3-область Fc-области антитела. В другом варианте осуществления настоящее изобретение содержит Fc-область, CH1-область и каппа/лямбда-область константного домена антитела. В одном варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению содержит константную область, например константную область тяжелой цепи. В одном варианте осуществления такую константную область модифицируют по сравнению с константной областью дикого типа. Другими словами, полипептиды по настоящему изобретению, раскрытые в данном документе, могут содержать изменения или модификации одного или более из трех константных доменов тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) и/или домена константной области легкой цепи (CL). Примеры модификации включают добавления, делеции или замены одной или более аминокислот в одном или более доменах. Такие изменения могут быть включены с целью оптимизации эффекторной функции, периода полужизни и т.д.

Термин "сайт связывания", используемый в данном документе, подразумевает площадь на целевой молекуле IL-2, с которой специфически связывается антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Термин "слитый белок" подразумевает слияние двух отдельных белков с дополнительной линкерной последовательностью или без нее.

Термин "линкерная последовательность" подразумевает аминокислотную последовательность, которую применяют для связывания или соединения двух белков.

В целом антитела, специфические для конкретного целевого антигена, свяжутся с эпитопом на целевом антигене в сложную смесь белков и/или макромолекул.

В контексте настоящего документа термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном в единичных антигенных сайтах. В пределах каждого антигенного сайта вариабельная область "плеча" антитела взаимодействует с антигеном через слабые нековалентные силы в многочисленных местах; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность. В контексте настоящего документа термин "высокая аффинность" для антитела IgG или его фрагмента (например, Fab-фрагмента) относится к антителу, которое характеризуется $KD 10^{-8}$ М или меньше, 10^{-9} М или меньше, или 10^{-10} М, или 10^{-11} М или меньше, или 10^{-12} М или меньше, или 10^{-13} М или меньше для целевого антигена. Однако высокоаффинное связывание может варьировать в 10-кратном диапазоне для других изотипов антител. Например, высокоаффинное связывание для изотипа IgM относится к антителу, которое характеризуется $KD 10^{-7}$ М или меньше или 10^{-8} М или меньше.

В контексте настоящего документа термин "авидность" относится к информативному измерению общей стабильности или прочности комплекса антиген-антитело. Данный процесс контролируется тремя ведущими факторами: аффинность эпитопа антитела, валентность антигена и антитела и структурное расположение взаимодействующих частей. В конечном итоге данные факторы определяют специфичность антитела, другими словами, вероятность того, что конкретное антитело связывается с конкретным эпитопом антигена.

Области данного полипептида, которые включают эпитоп, могут быть идентифицированы с применением любого количества методик картирования эпитопов, хорошо известных из уровня техники. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996), Humana Press, Totowa, N.J. Например, линейные эпитопы могут быть определены, например, посредством одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых подложках, пептидов, соответствующих частям молекулы белка, и проведения реакции пептидов с антителами, когда пептиды все еще прикреплены к подложкам. Такие методики известны из уровня техники и описаны, например, в патенте США № 4708871; Geysen et al. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:3998-4002; Geysen et al. (1985), *Proc.*

Natl. Acad. Sci., USA 82:78-182; Geysen et al. (1986), Mol. Immunol, 23:709-715. Аналогично конформационные эпитопы без труда идентифицируют путем определения пространственной конформации аминокислоты, таким как, например, рентгеновская кристаллография и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols выше. Антигенные области белков также могут быть идентифицированы с применением стандартных графиков антигенности и гидрофобности, таких как графики, рассчитанные с применением, например, программы из системы программного обеспечения Omega версии 1.0, доступной от Oxford Molecular Group. Данная компьютерная программа применяет способ Hopp/Woods, Hopp et al. (1981), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 78:3824-3828, для определения профилей антигенности и методику Kyte-Doolittle, Kyte et al. (1982), J. Mol. Biol., 157:105-132, графиков гидрофобности.

Используемые в описании и формуле изобретения формы единственного числа охватывают указанные объекты в форме множественного числа, если исходя из контекста явно не подразумевается иное. Например, термин "клетка" включает множество клеток, в том числе их смеси.

Все цифровые обозначения, например pH, температура, время, концентрация и молекулярный вес, включая диапазоны, представляют собой приближения, которые изменяются (+) или (-) с шагом 0,1. Хотя следует понимать, что не всегда четко предусмотрено, что всем цифровым обозначениям предшествует термин "около". Также следует понимать, что не всегда четко предусмотрено, что реагенты, описанные в данном документе, представляют собой только примеры и что соответствующие им эквиваленты известны из уровня техники.

В контексте настоящего документа термин "аминокислота" относится к природным, и/или не встречающимся в природе, или синтетическим аминокислотам и к обоим оптическим изомерам D и L, аналогам аминокислоты и пептидомиметикам. Пептид из трех или более аминокислот, более известный как олигопептид, - если пептидная цепь короткая. Если пептидная цепь длинная, то пептид, более известный как полипептид или белок. Термины "биомаркер" или "маркер" используются в данном документе взаимозаменяемо. Биомаркер представляет собой нуклеиновую кислоту или полипептид, и присутствие или отсутствие мутации или дифференциальная экспрессия полипептида применяются для определения чувствительности к какой-либо обработке, включая антитело к IL-2 в соответствии с настоящим изобретением. Например, белок представляет собой биомаркер для раковых клеток, когда он является дефектным, мутированным, характеризующимся делецией или уменьшенным в посттрансляционной модификации, получении, экспрессии, уровне, стабильности и/или активности по сравнению с таким же белком в нормальной (не раковой) клетке или контрольной клетке.

Термин "кДНК" относится к молекулам, комплементарным ДНК, т.е. мРНК, которые присутствуют в клетке или организме и превращаются в кДНК посредством фермента, такого как обратная транскриптаза. "Библиотека кДНК" представляет собой коллекцию всех молекул мРНК, которые присутствуют в клетке или организме, при этом все превращены в молекулы кДНК посредством фермента обратной транскриптазы, затем вставлены в "векторы" (другие молекулы ДНК, которые могут продолжать реплицироваться после добавления чужеродной ДНК). Примеры векторов для библиотек включают бактериофаги (также известные как "фаги"), вирусы, которые инфицируют бактерии, например фаг лямбда. Затем библиотеку исследовали посредством зонда в отношении наличия специфической кДНК (и, таким образом, мРНК), представляющей интерес.

Термин "пролиферативные нарушения клеток" должен включать дисрегуляцию нормальной физиологической функции, которая характеризуется аномальным ростом клетки и/или делением или потерей функции. Примеры "пролиферативных нарушений клеток" включают без ограничения гиперплазию, неоплазию, метаплазию и различные аутоиммунные заболевания, например такие, которые характеризуются дисрегуляцией апоптоза Т-клеток.

"Комбинация" относится либо к фиксированной комбинации единичной дозированной формы, либо к комбинируемому применению, где соединение по настоящему изобретению и комбинационный партнер (например, другое лекарство, как поясняется ниже, также называемое "терапевтическим средством" или "совместно применяемым средством") могут быть введены независимо в одно и то же время или по отдельности через промежутки времени, в частности, когда данные промежутки времени позволяют комбинационным партнерам демонстрировать суммарный, например синергический, эффект. Единичные компоненты могут быть упакованы в набор или по отдельности. Один или оба компонента (например, порошки или жидкости) могут быть разведены или разбавлены до желаемой дозы перед введением. Термин "совместное введение" или "комбинируемое применение" или им подобные, использованные в данном документе, предусматривают охват введения выбранного комбинационного партнера одному субъекту, нуждающемуся в этом (например, пациенту), и предназначены включать схемы лечения, в которых средства необязательно вводят тем же самым путем введения или в то же время. Термин "фармацевтическая комбинация", используемый в данном документе, означает продукт, который получают в результате смешивания или объединения более чем одного активного ингредиента, и включает фиксированные и не фиксированные комбинации активных ингредиентов. Термин "фиксированная комбинация" означает, что активные ингредиенты, например соединенные по настоящему изобретению и комбинационный партнер, оба вводят пациенту одновременно в форме единого целого или дозировано.

Термин "не фиксированная комбинация" означает, что активные ингредиенты, например соединение по настоящему изобретению и комбинационный партнер, оба вводят пациенту как отдельные объекты либо одновременно параллельно, либо последовательно без конкретных сроков, при этом данное введение обеспечивает эффективные терапевтические уровни двух соединений в теле пациента. Последнее также применяется в отношении "коктейльной терапии", например, введение трех или более активных ингредиентов.

"Ген" относится к полинуклеотиду, который содержит по меньшей мере одну открытую рамку считывания (ORF), которая способна кодировать конкретный полипептид или белок после транскрибирования и трансляции. Полинуклеотидную последовательность можно применять для идентификации более крупных фрагментов или полноразмерных кодирующих последовательностей гена, с которыми они связаны. Способы выделения последовательностей более крупных фрагментов известны специалистам в данной области техники.

"Экспрессия гена" или в другом варианте "продукт гена" относится к нуклеиновым кислотам или аминокислотам (например, пептид или полипептид), которые получают, когда ген транскрибируется и происходит его трансляция.

В контексте данного документа, "экспрессия" относится к процессу, посредством которого ДНК транскрибируется в мРНК, и/или процессу, посредством которого впоследствии происходит трансляция транскрибированной мРНК в пептиды, полипептиды или белки. Если полинуклеотид получен с геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

"Дифференциально экспрессируемые" применительно к гену относится к дифференциальному получению мРНК, которая транскрибируется, и/или происходит процесс трансляции с продукта гена или белкового продукта, кодируемого геном. Дифференциально экспрессированный ген может быть сверхэкспрессированным или недоэкспрессированным по сравнению с уровнем экспрессии нормальной или контрольной клетки. Однако, как используется в данном документе, сверхэкспрессия представляет собой увеличение экспрессии гена в целом в по меньшей мере 1,25 раза, или альтернативно в по меньшей мере в 1,5 раза, или альтернативно в по меньшей мере 2 раза, или альтернативно в по меньшей мере 3 раза, или альтернативно в по меньшей мере 4 раза относительно обнаруженного в нормальной или аналогичной контрольной клетке или ткани. Как используется в данном документе, недостаточная экспрессия представляет собой уменьшение экспрессии гена и в целом является в по меньшей мере 1,25 раза, или альтернативно в по меньшей мере 1,5 раза, или альтернативно в по меньшей мере 2 раза, или альтернативно в по меньшей мере 3 раза, или альтернативно в по меньшей мере 4 раза более низкой, чем обнаруженная в нормальной или аналогичной контрольной клетке или ткани. Термин "дифференциально экспрессированный" также относится к экспрессии, обнаруженной в раковой клетке или злокачественной ткани, но экспрессия в контрольной клетке или нормальной ткани (например, незлокачественные клетка или ткань) не обнаруживается.

Высокий уровень экспрессии гена может проявиться из-за сверхэкспрессии гена или увеличения числа копий гена. Также может происходить процесс трансляции гена с повышением уровней белка из-за нарушения регуляции или отсутствия отрицательного регулятора. Наконец, высокий уровень экспрессии гена может проявиться из-за увеличения стабилизации или уменьшения разрушения белка, что приводит к его накоплению.

В контексте данного документа термины "ингибирование", "ингибирующий", или "ингибирование роста", или "ингибирующий пролиферацию" раковых клеток относятся к замедлению, прерыванию, прекращению или остановке роста раковой клетки и не обязательно обозначают полное устранение роста раковых клеток. Термины "ингибирование" и "ингибирующий" или им подобные указывают на количественные различия между двумя стадиями; относятся к по меньшей мере статистически значимым различиям между двумя состояниями. Например, "количество эффективных для ингибирования роста раковых клеток" означает, что показатель роста клеток будет по меньшей мере статистически значимо различным по сравнению с необработанными клетками. Данные термины применяются в данном документе, например, к показателям пролиферации клеток.

Термин "выделенный" означает отделенный от составляющих, клеточных и других, в которых полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагмент(фрагменты) в норме ассоциированы в природе. Например, выделенный полинуклеотид отделен от 3'- и 5'-смежных нуклеотидов, с которыми он обычно связан в пределах своей естественной или природной сред, например в хромосоме. Как будет очевидно специалистам в данной области техники, не встречающиеся в природе полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагмент(фрагменты) не требуют "выделения" для того, чтобы отличить их от их встречающегося в природе аналога. Кроме того, "концентрированный", "отделенный" или "разведенный" полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагмент(фрагменты) отличаются от их встречающегося в природе аналога тем, что концентрация или количество молекул в объеме больше в "концентрированной" версии или меньше, чем в "отделенной" версии, чем в ее встречающемся в природе аналоге.

В контексте данного документа термины "неопластические клетки", "неопластическое заболевание", "неоплазия", "опухоль", "опухолевые клетки", "рак" и "раковые клетки" (используются взаимоза-

меняемо) относятся к клеткам, которые проявляют относительно автономный рост. Таким образом, они проявляют аномальный фенотип роста, характеризующийся значимой потерей контроля пролиферации клеток (т.е. дерегулированное деление клеток). Неопластические клетки могут быть злокачественными или доброкачественными. "Метастатическая клетка или ткань" означает, что клетка может проникать и разрушать соседние структуры тела.

Термин "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, или дезоксирибонуклеотидов, или рибонуклеотидов, или их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию. Следующие не ограничивающие примеры полинуклеотидов: ген или фрагмент гена (например, зонд, праймер, EST или SAGE-метка), экзоны, интроны, информационная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомальная РНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, зонды на основе нуклеиновой кислоты, siRNA, shRNA, средства для RNAi и праймеры. Полинуклеотид может быть модифицирован или заменен по одному или более основаниям, сахарам и/или фосфатам с помощью любой из различных модификаций или замен, описанных в данном документе или известных из уровня техники. Полинуклеотид может включать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. При наличии модификации структуры нуклеотида могут передаваться до или после образования полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана компонентами, не являющимися нуклеотидами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, такой как конъюгация с метящим компонентом. Термин также относится как к двух-, так и одноцепочечным молекулам. Если не указано или предусмотрено иное, любые варианты осуществления по настоящему изобретению, которые представляют собой полинуклеотид, охватывают как двухцепочечные формы, так и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, известных или спрогнозированных для создания двухцепочечной формы.

Термин "полипептид" используется взаимозаменяемо с термином "белок" и в своем широком смысле относится к соединению, состоящему из двух или более аминокислот, аналогов аминокислот или пептидомиметиков, являющихся элементарными единицами. Элементарные единицы могут быть соединены посредством пептидных связей. В другом варианте осуществления элементарные единицы могут быть соединены другими связями, например сложноэфирной, эфирной и т.д.

Выражение, что полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область) характеризуется определенной процентной долей (например, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) "идентичности последовательности" с другой последовательностью, означает, что при выравнивании данная процентная доля оснований (или аминокислот) будет одинаковой при сравнении двух последовательностей. Данное выравнивание и процент гомологии или идентичность последовательности можно определить с применением компьютерных программ, известных из области техники, например таких, которые описаны в Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., (1987), дополнение 30, секция 7.7.18, табл. 7.7.1. Предпочтительно для выравнивания применяют стандартные параметры. Предпочтительной программой для выравнивания с применением стандартных параметров является BLAST. В частности, предпочтительными программами являются BLASTN и BLASTP с применением следующих стандартных параметров: генетический код=стандарт; фильтр=отсутствует; нить=обе; блокировка=60; ожидаемое значение=10; матрица=BLOSUM62; описания=50 последовательностей; сортировать по=HIGH SCORE; базы данных=неизбыточны.

"Подавлять" или "подавление" роста опухоли указывает на уменьшение роста опухолевых клеток при контакте с антителом к IL-2 в соответствии с настоящим изобретением по сравнению с ростом опухоли без контакта с антителом к IL-2 в соответствии с соединением по настоящему изобретению. Рост опухолевых клеток можно оценить посредством любых способов, известных из уровня техники, включая без ограничения измерение размера опухоли, определение, пролиферируют опухолевые клетки или нет путем применения анализа включения 3H-тимидина, измерение потребления глюкозы посредством FDG-PET (флюорорезоксиглюкозная позитрон-эмиссионная томография), формирование изображения или подсчет опухолевых клеток. "Подавлять" рост опухолевых клеток означает любую или все из следующих состояний: замедление, задержка или остановка роста опухоли, так же как и уменьшение размеров опухоли. "Субъект", "индивидуум" или "пациент" используются взаимозаменяемо в данном документе, что относится к позвоночным, предпочтительно к млекопитающим, более предпочтительно к человеку. Млекопитающие включают без ограничения мышей, обезьян, людей, сельскохозяйственных животных, животных, задействованных в спортивных соревнованиях, и домашних животных.

Антитела к IL-2.

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает выделенное антитело или его антигенсвязывающую часть, которые связывают IL-2 человека, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат вариабельную область легкой цепи, которая содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с табл. 11 и вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в соответствии с табл. 12.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть

содержат вариабельную область легкой цепи в соответствии с табл. 6 или 10 и вариабельную область тяжелой цепи, предусматривающую вариабельную область тяжелой цепи в соответствии с табл. 5 или табл. 10.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело содержит вариабельные легкие цепи и вариабельные тяжелые цепи, как это предусмотрено в табл. 10 или 13.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает варианты антитела или его фрагмента, которые связываются с IL-2 человека. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает антитела или их фрагменты, которые характеризуются аминокислотной последовательностью областей, не являющихся CDR, последовательности вариабельной области тяжелой и/или легкой цепей, которая характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью (характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью аминокислотной последовательности) с аминокислотной последовательностью областей, не являющихся CDR, последовательности вариабельной области тяжелой и/или легкой цепей родительского антитела, или тяжелой, или легкой цепей, например последовательности вариабельной области или тяжелой, или легкой цепей, как в табл. 5 и 6 соответственно. Настоящее изобретение предусматривает также антитела или их фрагменты, которые характеризуются аминокислотной последовательностью непротяженных CDR-областей последовательности вариабельной области тяжелой и/или легкой цепей, которая характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью непротяженных CDR-областей последовательности вариабельной области тяжелой и/или легкой цепей родительского антитела или тяжелой, или легкой цепей. Предпочтительно идентичность аминокислотной последовательности областей, не являющихся CDR, или непротяженных CDR-областей последовательности вариабельной области тяжелой и/или легкой цепей представляет собой по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, конкретно 96%, более конкретно 97%, еще более конкретно 98%, наиболее конкретно 99%, включая, например, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и 100%.

Настоящее изобретение также предусматривает антитело или его фрагмент, которые связываются с IL-2 человека, который дополнительно содержит константную область тяжелой и/или легкой цепей, конкретно константную область тяжелой цепи человека и/или легкой цепи человека. Константные области тяжелой цепи человека можно выбрать из группы иммуноглобулинов человека, которая состоит из IgG1 (IGHG 1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) или IgE (IGHE), тогда как константная область тяжелой цепи IgG человека, в частности IgG1 (IGHG 1), является предпочтительной. Константную область легкой цепи человека можно выбрать из группы иммуноглобулинов человека, которая состоит из константных областей каппа- или лямбда-цепей, тогда как константная область каппа-цепи человека является предпочтительной. В предпочтительном варианте осуществления антитело или его фрагмент, которые связываются с IL-2 человека, содержат константный домен тяжелой цепи IgG1 человека (IGHG1) и константный домен легкой каппа-цепи человека.

В дополнение или в качестве альтернативы к модификациям, проведенным в пределах каркасных областей или CDR-областей, антитела по настоящему изобретению могут быть сконструированы так, чтобы включать модификации в пределах Fc-области, как правило, с целью изменить одно или более функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке крови, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность.

Кроме того, антитело по настоящему изобретению может быть химически модифицировано (например, один или более химических фрагментов могут быть прикреплены к антителу) или модифицировано с целью изменить процесс его гликозилирования.

Настоящее изобретение предусматривает антитела, которые специфически связываются с IL-2 человека, что приводит к изменению времени полужизни *in vivo*.

Много факторов могут влиять на время полужизни белка *in vivo*. Например, фильтрация почек, метаболизм в печени, разрушение посредством протеолитических ферментов (протеаз) и иммунные ответы (например, нейтрализация белка посредством антител и потребление макрофагами и дендритными клетками). Можно применять различные стратегии с целью продлить время полужизни антител и их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению. Например, посредством химической связи с полиэтиленгликолем (PEG), геCODE PEG, каркаса антитела, полисиаловой кислоты (PSA), гидроксипропилового крахмала (HES), альбуминсвязывающих лигандов и углеводных экранов; посредством слияния с белками, которые связываются с белками сыворотки, такими как альбумин, IgG, FcRn, и переноса; путем соединения (генетического или химического) с другими связывающими фрагментами, которые связываются с белками сыворотки, такими как нанотела, Fab, DARPIn, авимеры, афитела и антикалины; посредством слияния с rPEG, альбумином, доменом альбумина, альбуминсвязывающих белков и Fc; или посредством включения в наноносители, составы с медленным высвобождением или медицинские изделия.

Чтобы продлить циркуляцию антител в сыворотке *in vivo*, молекулы инертного полимера, такого как высокомолекулярный PEG, могут быть прикреплены к антителам или их фрагментам с многофункциональным линкером или без него или через сайт-специфическую конъюгацию PEG к N- или C-концу антител, или посредством эpsilon-аминогрупп, которые присутствуют на остатках лизина.

Чтобы пегиллировать антитело, как правило, осуществляют реакцию антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, с полиэтиленгликолем (PEG), таким как реакционно-способный сложный эфир или альдегидное производное PEG, при условиях, в которых одна или более PEG-групп прикрепляются к антителу или фрагменту антитела. Процесс пегиллирования можно осуществлять посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционно-способной молекулой PEG (или аналогичным реакционно-способным водорастворимым полимером). В контексте данного документа термин "полиэтиленгликоль" предназначен охватывать любую из форм PEG, которые применяли для дериватизации других белков, таких как моно(C₁-C₁₀)алокси-, или арилокси-полиэтиленгликоль, или полиэтиленгликоль-малеимид. В одном варианте осуществления антитело, подлежащее пегиллированию, представляет собой агликозилированное антитело. Будет использована дериватизация линейного или разветвленного полимера, которая приводит к минимальной потере биологической активности. Степень конъюгации можно внимательно отслеживать посредством SDS-PAGE и масс-спектрометрии для обеспечения надлежащей конъюгации молекул PEG с антителами. Непрореагировавший PEG можно отделить от конъюгатов PEG-антител посредством гель-хроматографии или ионообменной хроматографии. PEG-дериватизированные антитела можно проверить в отношении связывающей активности так же как в отношении эффективности *in vivo* с применением способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, например, посредством иммуноанализов, описанных в данном документе. Способы пегиллирования белков известны из уровня техники и могут применяться к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам по настоящему изобретению. См., например, EP 0154316 под авторством Nishimura et al. и EP 0401384 под авторством Ishikawa et al., каждый из которых включен посредством ссылки.

Другие модифицированные технологии пегиллирования включают технологию направленного конструирования, которая обеспечивает химическую ортогональность с использованием преобразованной системы биосинтеза (ReCODE PEG), которая включает химически специфические боковые цепи в биосинтетические белки посредством преобразованной системы, которая включает синтетазу tRNA и tRNA. Данная технология позволяет включать более чем 30 новых аминокислот в биосинтетические белки в *e. coli*, дрожжах клетках млекопитающих. tRNA включает стандартную аминокислоту в любом месте, где расположен янтарный кодон, преобразовывая янтарный кодон из терминирующего в такой, который передает сигнал о включении химически специфической аминокислоты.

Технология рекомбинантного пегиллирования (rPEG) также может применяться для увеличения времени полужизни в сыворотке крови. Данная технология включает генетическое слияние неструктурированного белкового хвоста из 300-600 аминокислот с существующим фармацевтическим белком. Поскольку средний молекулярный вес такой неструктурированной белковой цепи приблизительно в 15 раз больше, чем ее фактический молекулярный вес, время полужизни белка в сыворотке крови значительно увеличивается. В отличие от традиционного пегиллирования, которое требует химической конъюгации и вторичной очистки, процесс получения значительно упрощается и продукт является однородным.

Полисиалирование представляет собой другую технологию, в которой применяют встречающийся в природе полимер сиаловой кислоты (PSA), чтобы продлить срок действия и улучшить стабильность терапевтических пептидов и белков. PSA представляет собой полимер сиаловой кислоты (сахар). При применении для доставки белка и терапевтического пептидного лекарственного средства сиаловая кислота предусматривает защитную микросреду при конъюгации. Это увеличивает срок действия терапевтического белка в кровотоке и предотвращает его распознавание иммунной системой. Полимер PSA является естественным для человеческого организма. Он был усвоен некоторыми бактериями, которые эволюционировали в течение миллионов лет, с покрытием им их стенок. Данные встречающиеся в природе полисиалированные бактерии были способны посредством молекулярной мимикрии разрушать защитную систему организма. PSA, которую можно отнести к совершенной природной технологии "стелс", можно с легкостью получить от таких бактерий в больших количествах и с предварительно заданными физическими характеристиками. Бактериальный PSA является полностью неиммуногенным, даже когда связан с белками, так как является химически идентичным PSA в человеческом организме.

Другая технология включает применение производных гидроксипропилового крахмала ("HES"), связанных с антителами. HES представляет собой модифицированный встречающийся в природе полимер, полученный из крахмала восковой кукурузы, и может быть метаболизирован посредством ферментов организма. Растворы HES обычно вводят с целью заменить дефектный объем крови и улучшить реологические свойства крови. HES илирование антитела позволяет продлить время полужизни в кровотоке путем увеличения стабильности молекулы, так же как путем уменьшения почечного очищения, приводя к увеличению биологической активности. Изменяя различные параметры, такие как молекулярный вес HES, можно выбирать широкий диапазон конъюгатов антител HES.

Антитела, характеризующиеся увеличенным временем полужизни *in vivo*, могут также быть получены путем введения одной или более аминокислотных модификаций (т.е. замен, вставок или делеций) в константный домен IgG или его связывающий фрагмент FcRn (предпочтительно фрагмент Fc-домена или шарнирного Fc-домена). См., например, публикацию международной заявки под № WO 98/23289, публикацию международной заявки под № WO 97/34631 и патент США № 6277375, каждый из которых включен посредством ссылки.

Дополнительно антитела могут быть конъюгированы с альбумином, чтобы сделать антитело или его фрагмент более стабильным *in vivo* или иметь более длительное время полужизни *in vivo*. Методика является известной из уровня техники (см., например, публикации международных заявок № WO 93/15199, WO 93/15200 и WO 01/77137; и европейский патент № EP 413622, каждый из которых включен посредством ссылки).

Стратегии для увеличения времени полужизни особенно полезны в нанотелах, связывающих на основе фибронектина, и других антителах или белках, для которых желательно увеличение времени полужизни *in vivo*.

В другом варианте осуществления антитело модифицируют для увеличения его биологического времени полужизни. Различные подходы являются возможными. Например, могут быть введены одна или более следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375, выданном Ward, который включен посредством ссылки. В другом варианте для увеличения биологического времени полужизни антитело можно изменить в пределах CH1- или CL-области таким образом, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора реутилизации, взятый с двух петель CH2-домена Fc-области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022 под авторством Presta et al., которые включены посредством ссылки.

В одном варианте осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением содержат легкие и тяжелые цепи в соответствии с табл. 1.

Таблица 1
SEQ ID NO тяжелой и легкой цепей для антител
в соответствии с вариантом осуществления

Антитело	SEQ ID легкой цепи	SEQ ID тяжелой цепи
104343	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 126
104348	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 130

1. Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева.

Настоящее изобретение также направлено на линии клеток, которые экспрессируют антитело к IL-2 по настоящему изобретению или его часть. Создание и выделение клеточных линий, которые образуют антитело по настоящему изобретению, может быть выполнено с применением стандартных методик, известных из уровня техники. Линии клеток CHO являются предпочтительными (доступны от публичного репозитория, такого как ATCC, Американская коллекция типовых культур, Манассас, Вирджиния).

Применяют широкий диапазон систем экспрессии хозяина для экспрессии антитела по настоящему изобретению, включая прокариотические и эукариотические системы экспрессии (такие как дрожжи, бакуловирусы, растения, клетки млекопитающих и других животных, трансгенные животные и гибридные клетки), так же как системы экспрессии фагового отображения. Пример пригодного вектора бактериальной экспрессии представляет собой pUC119, и подходящий вектор эукариотической экспрессии представляет собой модифицированный вектор pcDNA3.1 с ослабленной дигидрофолатредуктазной системой отбора. Другие системы экспрессии антител также известны из уровня техники.

Антитело по настоящему изобретению можно получить посредством рекомбинантной экспрессии генов легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина в клетках-хозяевах, как хорошо известно специалисту в данной области техники. Чтобы экспрессировать антитело рекомбинантно, клетки-хозяева трансформируют, трансдуцируют, заражают и т.д. одним или более рекомбинантными векторами экспрессии, которые несут фрагменты ДНК, кодирующие легкие и/или тяжелые цепи иммуноглобулина антитела таким образом, что легкие и/или тяжелые цепи экспрессируются в клетках-хозяевах. Тяжелая цепь и легкая цепь могут экспрессироваться в тех же самых или разных клетках-хозяевах. Предпочтительно рекомбинантные антитела секретируют в среду, в которой культивируются клетки-хозяева, с которых антитела могут быть выделены или очищены.

Стандартные методики рекомбинантной ДНК применяют для получения генов легкой и тяжелой цепей антител, включают данные гены в рекомбинантные векторы экспрессии и вводят векторы в клетки-хозяева. Данные стандартные методики рекомбинантной ДНК описаны, например, в Green and Sambrook (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition*, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает вектор, предпочтительно (но без ограничения) плазмиду, рекомбинантный вектор экспрессии, вектор экспрессии дрожжей или ретровирусный вектор экспрессии, который содержит полинуклеотид, кодирующий антитело к IL-2 по настоящему изобретению. Кодированная(кодированные) область(области) в векторе могут быть разделены посредством линкерной последовательности любого размера или содержания, предпочтительно такой линкер, если присутствует, представляет собой полинуклеотид, кодирующий внутренний участок посадки рибосомы.

Чтобы экспрессировать антитело по настоящему изобретению, ДНК, кодирующую неполную ами-

нокислотную цепь, как описано в табл. 41, вставляют в вектор экспрессии таким образом, что ген является функционально связанным с транскрипционными и трансляционными контрольными последовательностями. Вектор экспрессии и последовательности контроля экспрессии выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Дополнительно рекомбинантный вектор экспрессии может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции легкой и/или тяжелой цепей антитела к IL-2 с клетки-хозяина. Ген легкой и/или тяжелой цепей антитела к IL-2 можно клонировать в вектор таким образом, чтоб последовательность, соответствующая сигнальному пептиду, была функционально связана в пределах рамки с последовательностью, соответствующей аминоконцу, гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид.

Для экспрессии легких и/или тяжелых цепей вектор(векторы) экспрессии, кодирующие тяжелые и/или легкие цепи, вводят в клетку-хозяина посредством стандартных методик, например электропорации, осаждения фосфатом кальция, трансфекции DEAE-декстраном, трансдукции, заражения и им подобиных. Хотя теоретически возможно экспрессировать антитела по настоящему изобретению или в прокариотических, или в эукариотических клетках-хозяевах, эукариотические клетки являются предпочтительными и наиболее предпочтительны клетки-хозяева млекопитающих, так как такие клетки с большей вероятностью собирают и секретируют иммунологически активное антитело с правильной укладкой.

Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител по настоящему изобретению включают яичник китайского хомячка (клетки CHO), например, как описано в Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 77:4216-20, 1980. Когда рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антитела, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают посредством культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения протекания экспрессии антитела в клетках-хозяевах или более предпочтительно секреции антитела в культуральную среду, в которой клетки-хозяева выращивают в подходящих условиях, известных из уровня техники. Антитела могут быть выделены с клеток-хозяев и/или культуральной среды с применением стандартных способов очищения.

Варианты IL-2.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяют IL-2 человека дикого типа (wt). Он имеет UniProt ID номер P60568 и воспроизведен как SEQ ID NO: 109. Другой пример IL-2 человека представляет собой мутеин IL-2, раскрытый в WO 2012/107417A1, который имеет 3 мутации по сравнению с hIL-2 wt. Альдеслейкин (товарный знак Proleukin®) представляет собой другой пример варианта IL-2 человека, хорошо известный специалисту в данной области техники, и представлен в данном документе в виде SEQ ID NO: 110. Другие примеры вариантов IL-2 представляют собой мутеин, не являющийся альфа, и суперкин IL-2, как показано в табл. 2.

Таблица 2

Мутеины IL-2			
	Мутеин	Замена в положении x относительно полноразмерного IL-2 wt	Замена в положении x относительно зрелого IL-2 wt
1	Proleukin® (альдеслейкин)	C145S	C125S
2	Мутеин, не являющийся альфа	R58A, F62A, Y65A, E82A	R38A, F42A, Y45A, E62A
3	WO2012/107417A1	F62A, Y65A, L92G	F42A, Y45A, L72G
4	Суперкин IL-2	L100F, R101D, L105V, I106V, I112F	L80F, R81D, L85V, I86V, I92F

Комбинации IL-2/антитела к IL-2.

В варианте осуществления антитела или их антигенсвязывающую часть, как описано выше, комбинируют с IL-2 человека или IL-2 мутантов, как описано выше.

Комбинация может представлять собой предварительно приготовленную смесь с 1:1, 2:1 или другой пропорцией IL-2:сайт связывания антитела.

В одном варианте осуществления антитело к IL-2 и IL-2 вводят в последовательность с первой инъекцией антитела и последовательной инъекцией комбинации антитела к IL-2/IL-2.

В другом варианте осуществления антитело к IL-2 и IL-2 вводят в последовательность с первой инъекцией комбинации антитела к IL-2/IL-2 и последовательной инъекцией IL-2.

Фармацевтические композиции.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут быть введены в комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими средствами. Например, комбинированная терапия может включать антитело к IL-2 или его фрагмент в соответствии с настоящим изобретением в комбинации с по меньшей мере одним другим противовоспалительным или другим хемотерапевтическим средством. Примеры терапевтических средств, которые могут применяться в комбинированной терапии, более подробно описаны ниже в разделе о видах комбинированной терапии.

В контексте данного документа "фармацевтически приемлемый носитель" включает все возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Носитель должен быть подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или вливания). В одном варианте осуществления носитель должен быть подходящим для подкожного введения. В зависимости от способа введения активное соединение, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот или других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать одну или более фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность родительского соединения и не вызывает никаких нежелательных токсикологических эффектов (см., например, Berge, S.M. et al., 1977, J. Pharm. Sci., 66:1-19). Примеры таких солей включают соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают такие, которые получены из нетоксичных неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т.п., так же как из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксипальмитовые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Соли присоединения основания включают такие, которые получены из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., так же как из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению также может включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеин гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.;

жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбил пальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и

металлические хелатообразующие средства, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры пригодных водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством применения покрывных материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Данные композиции также могут содержать вспомогательные средства, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено процедурами стерилизации и посредством включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, таких как парабен, хлорбутанол, фенол сорбиновая кислота и т.п. Также может быть желательно включить изотонические средства, такие как сахара, хлорид натрия и т.п., в состав композиций. Кроме того, длительная абсорбция инъецируемых фармацевтических форм может быть вызвана включением средств, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъецируемых растворов для или дисперсии. Применение такой среды и средств для фармацевтически активных веществ известно из уровня техники. За исключением случаев, когда любая общепринятая среда или средство являются несовместимыми с активным соединением, рассматривается их использование в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в состав композиций.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях оно может включать изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннитол, сорбит или хлорид натрия в составе

композиции. Длительная абсорбция инъеклируемых композиций может быть вызвана включением в композицию средства, которое замедляет абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

Обзоры по разработке стабильных белковых (например, антител) составов можно найти в Cleland et al., 1993, Crit. Reviews. Ther. Drug Carrier Systems 10(4):307-377 и Wei Wang 1999, Int. J. Pharmaceutics 185:129-88. Дополнительные обсуждения состава для антител можно найти, например, в Daugherty and Mersny 2006, Advanced Drug Delivery Reviews 58: 686-706; патентах США № 6171586, 4618486, публикации патентного документа США № 20060286103, публикации согласно PCT WO 06/044908, WO 07/095337, WO 04/016286, Colandene et al., 2007, J. Pharm. Sci 96: 1598-1608; Schulman 2001, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:S6-S11 и других известных литературных источниках, каждый из которых включен посредством ссылки.

Растворы или суспензии, которые применяют для интрадермального или подкожного применения, как правило, включают один или более из следующих компонентов: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекции, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители, антибактериальные средства, такие как бензиновый спирт или метилпарабены, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия, хелатирующие средства, как этилендиаминтетрауксусная кислота, буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регулировки тонуса, такие как хлорид натрия или декстроза. Уровень pH можно регулировать посредством кислот или оснований, таких как хлористоводородная кислота или гидроксид натрия. Такие препараты можно заключить в ампулы, одноразовые шприцы или пузырьки многократного использования, сделанные из стекла или пластика.

Стерильные инъеклируемые растворы можно приготовить посредством включения активного соединения в требуемом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, если потребуется, с последующей стерилизационной микрофильтрацией. В целом дисперсии получают посредством включения антител или белков по настоящему изобретению в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше.

В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъеклируемых растворов способ приготовления представляет собой вакуумную сушку и лиофильную сушку (лиофилизацию), которые дают на выходе порошок активного ингредиента плюс любой его дополнительный желаемый ингредиент из предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

В одном конкретном варианте осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением вводили в виде жидкой лекарственной формы во флаконе. Количество лекарственного средства на каждый флакон составляло 150 мг. Жидкость содержала 150 мг/мл антитела, 4,8 мМ L-гистидина, 15,2 мМ L-гистидин-HCl, 220 мМ сахарозы и 0,04% полисорбата 20 при pH 6,0±0,5. Был добавлен 20%-ный избыток действующего вещества с целью обеспечить полное удаление предназначенной дозы.

Терапевтические и другие применения.

Антитела по настоящему изобретению имеют многочисленные диагностические и терапевтические свойства *in vitro* и *in vivo*, которые включают диагностику и лечение нарушений с IL-2-зависимой патофизиологией. Например, данные молекулы можно вводить в клетки в культурах *in vitro* или *ex vivo*, или испытуемым людям, например *in vivo*, с целью лечить, предотвращать и диагностировать различные заболевания с IL-2-зависимой патофизиологией.

Соответственно в одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антител к IL-2, раскрытых в данном документе. В одном варианте осуществления способы являются подходящими для лечения рака *in vivo*. В одном варианте осуществления антитела к IL-2 вводят вместе с IL-2, например в комбинации с IL-2.

Когда вводят антитела к IL-2 в комбинации с одним или более средствами, комбинацию можно вводить в любом порядке или одновременно.

В другом аспекте способ лечения субъекта предусматривает, например, уменьшение или облегчение интенсивности пролиферативного состояния или заболевания (например, ракового), например, плотной опухоли, опухоли мягкой ткани или метастатического поражения у субъекта.

Термин рак должен включать все типы злокачественных образований или онкогенных процессов, метастатических тканей или злокачественно трансформированных клеток, тканей или органов независимо от гистопатического типа или стадии инвазивности. Примеры злокачественных нарушений включают без ограничения плотные опухоли, опухоли мягких тканей и метастатические поражения. Примеры плотных опухолей включают злокачественные опухоли, например саркомы, аденокарциномы и карциномы различных систем органов, таких как те, которые влияют на печень, легкие, грудь, лимфоидной, желудочно-кишечной (например, толстая кишка), мочеполового тракта (например, клетки почек, уротелия), предстательной железы и глотки. Аденокарциномы включают злокачественные опухоли, такие как большинство видов рака толстой кишки, рак прямой кишки, почечно-клеточная карцинома, рак печени, немелкоклеточная карцинома легкого, рак тонкого кишечника и рак пищевода. В одном варианте осуществления рак представляет собой меланому, например позднюю стадию меланомы. Метастатические по-

ражения вышеупомянутых видов рака также можно лечить или предотвращать, применяя способы и композиции по настоящему изобретению.

Иллюстративные онкозаболевания, рост которых можно ингибировать с применением молекул антител, раскрытых в данном документе, включают виды рака, как правило, отвечающие на иммунотерапию. Неограничивающие примеры предпочтительных видов рака для лечения включают меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), рак почки (например, светлоклеточную карциному), рак предстательной железы (например, гормональную рефрактерную аденокарциному предстательной железы), рак молочной железы, рак толстой кишки и рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого). Дополнительно рефрактерные или повторяющиеся злокачественные опухоли можно лечить, применяя молекулы антитела, описанные в данном документе.

Примеры других видов рака, которые можно лечить, включают рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или интраокулярную злокачественную меланому, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак анального канала, желудочно-пищеводный, рак желудка, рак яичка, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягкой ткани, рак уретры, рак полового члена, хроническую или острую формы лейкемии, включая острый миелолейкоз, хронический миелолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфолейкоз, плотные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почек или мочеточника, карциному почечной лоханки, неоплазию центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль спинного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, виды рака, вызванные окружающей средой, включая вызванные асбестом, и комбинации указанных видов рака.

В других вариантах осуществления рак представляет собой гематологическую злокачественную опухоль, или рак включает без ограничения лейкемию или лимфому. Например, терапию антителами к IL-2 можно применять для лечения видов рака и злокачественных опухолей, включая без ограничения, например, острую лейкемию, включая без ограничения, например, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз ("BALL"), Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз ("TALL"), острый лимфоидный лейкоз (ALL); один или более хронических лейкозов, включая без ограничения, например, хронический миелолейкоз (CML), хронический лимфолейкоз (CLL); дополнительные гематологические виды рака или гематологические состояния, включая без ограничения, например, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, бластное плазмцитоподобное дендритное клеточное новообразование, лимфому Беркитта, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лейкоз ворсистых клеток, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT-лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, плазмцитоподобное дендритное клеточное новообразование, макроглобулинемию Вальденстрема и "предлейкоз", которые представляют собой различную совокупность гематологических состояний, объединенных неэффективным получением (или дисплазией) миелоидных клеток крови и т.п. В некоторых вариантах осуществления лимфома (например, анапластическая крупноклеточная лимфома или неходжкинская лимфома) имеет или идентифицирована как имеющая ALK-транслокацию, например, слияние EML4-ALK.

В одном варианте осуществления рак выбран из рака легких (например, немелкоклеточного рака легких (NSCLC) (например, NSCLC с ороговевающей и/или не ороговевающей гистологией)), меланомы (например, запущенной меланомы), рака почки (например, почечно-клеточной карциномы, например, светлоклеточной почечно-клеточной карциномы), рака печени, миеломы (например, множественной миеломы), рака предстательной железы, рака молочной железы (например, рак молочной железы, при котором не экспрессируются один, два или все рецепторы эстрогена, рецептор прогестерона или Her2/neu, например трижды негативный рак молочной железы), рака толстой и прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC), рака анального канала, рака желудка и пищевода, рака щитовидной железы, рака шейки матки, лимфопролиферативного заболевания (например, посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания) или гемобластоз, Т-клеточная лимфома, неходжкинская лимфома, или лейкемия (например, миелолейкоз).

В другом варианте осуществления рак выбирают из карциномы (например, запущенной или метастатической карциномы), меланомы или карциномы легкого, например, немелкоклеточной карциномы легкого.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак легкого, например, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления рак легкого, например немелкоклеточный рак легкого, имеет или идентифицирован как имеющий реаранжировку или транслокацию ALK, например слияние ALK, например слияние EML4-ALK.

В другом варианте осуществления рак представляет собой воспалительную миофибробластическую

опухоль (ИМТ). В некоторых вариантах осуществления воспалительная миофибробластическая опухоль имеет или идентифицирована как имеющая реаранжировку или транслокацию ALK, например слияние ALK, например слияние EML4-ALK.

В других вариантах осуществления рак представляет собой NSCLC, при этом NSCLC характеризуется одним или более из аберрантной активации, амплификации или рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой NSCLC, при этом NSCLC характеризуется тем, что содержит вставку экзона 20 EGFR, делению экзона 19 EGFR, мутацию EGFR L858R, EGFR T790M или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления NSCLC характеризуется тем, что содержит мутации L858R и T790M EGFR. В некоторых вариантах осуществления NSCLC характеризуется тем, что содержит вставку экзона 20 EGFR и мутации T790M EGFR. В некоторых вариантах осуществления NSCLC характеризуется делению экзона 19 EGFR и мутации T790M EGFR. В некоторых вариантах осуществления NSCLC характеризуется тем, что содержит мутацию EGFR, выбранную из группы, состоящей из вставки экзона 20, делеции экзона 19, мутации L858R, мутации T790M и любой их комбинации.

В еще одном варианте осуществления рак представляет собой нейробластому.

В некоторых вариантах осуществления нейробластома имеет или идентифицирована как имеющая реаранжировку или транслокацию ALK, например слияние ALK, например слияние EML4-ALK. Способы и композиции, раскрытые в данном документе, являются полезными для лечения метастатических поражений, связанных с вышеупомянутыми видами рака.

В другом варианте осуществления рак представляет собой гепатокарциному, например запущенную гепатокарциному, с вирусной инфекцией или без нее, например хронического вирусного гепатита.

В другом варианте осуществления рак представляет собой рак предстательной железы, например запущенный рак предстательной железы.

В еще одном варианте осуществления рак представляет собой миелому, например множественную миелому.

В еще одном варианте осуществления рак представляет собой рак почки, например почечно-клеточную карциному (RCC) (например, метастатический RCC или светлоклеточную почечно-клеточную карциному).

В одном варианте осуществления рак представляет собой меланому, например запущенную меланому. В одном варианте осуществления рак представляет собой запущенную или неоперабельную меланому, которая не дает ответа на другие виды терапии. В других вариантах осуществления рак представляет собой меланому с мутацией BRAF (например, мутацией BRAF V600).

В другом варианте осуществления рак представляет собой воспалительную миофибробластическую опухоль (ИМТ). В некоторых вариантах осуществления воспалительная миофибробластическая опухоль имеет или идентифицирована как имеющая реаранжировку или транслокацию ALK, например слияние ALK, например слияние EML4-ALK.

В еще одном варианте осуществления рак представляет собой нейробластому. В некоторых вариантах осуществления нейробластома имеет или идентифицирована как имеющая реаранжировку или транслокацию ALK, например слияние ALK, например слияние EML4-ALK. Способы и композиции, раскрытые в данном документе, являются полезными для лечения метастатических поражений, связанных с вышеупомянутыми видами рака.

Виды комбинированной терапии.

Антитела или их антигенсвязывающую часть по настоящему изобретению можно вводить в качестве единственного активного ингредиента или в сочетании с, например, в качестве вспомогательного средства к или в комбинации с другими лекарственными средствами, например иммуномодулирующими препаратами или цитотоксическими или противораковыми средствами, например, для лечения или предотвращения заболеваний, упомянутых выше.

1. Иллюстративные агонисты STING.

В варианте осуществления комбинация содержит агонист STING. В некоторых вариантах осуществления комбинацию применяют, чтобы лечить рак, например рак, описанный в данном документе, например плотную опухоль (например, рак молочной железы, плоскоклеточную карциному, меланому, рак яичников, карциному фаллопиевых труб, перитонеальную карциному, саркому мягких тканей, меланому, рак молочной железы, рак пищевода, рак головы и шеи, рак эндометрия, рак шейки матки или базальноклеточную карциному), например гематологическую злокачественную опухоль (например, лейкемию (например, хронический лимфолейкоз (CLL), или лимфому (например, В-клеточную лимфому маргинальной зоны, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому)).

В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой циклический динуклеотид, например циклический динуклеотид, который содержит пуриновые или пиримидиновые нуклеотидные основания (например, аденозиновые, гуаниновые, урациловые, тиминового или цитозинового нуклеотидные основания). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные основания циклического динуклеотида содержат такое же нуклеотидное основание или разные нуклеотидные основания.

В некоторых вариантах осуществления агонист STING содержит аденозиновое или гуанозиновое нуклеотидные основания. В некоторых вариантах осуществления агонист STING содержит одно аденозиновое нуклеотидное основание и одно гуанозиновое нуклеотидное основание. В некоторых вариантах осуществления агонист STING содержит два аденозиновых нуклеотидных основания или два гуанозиновых нуклеотидных основания.

В некоторых вариантах осуществления агонист STING включает модифицированный циклический динуклеотид, например, содержащий модифицированное нуклеотидное основание, модифицированную рибозу или модифицированную фосфатную связь. В некоторых вариантах осуществления модифицированный циклический динуклеотид содержит модифицированную фосфатную связь, например трифосфат.

В некоторых вариантах осуществления агонист STING включает циклический динуклеотид (например, модифицированный циклический динуклеотид) с 2',5'- или 3',5'-фосфатными связями. В некоторых вариантах осуществления агонист STING включает циклический динуклеотид (например, модифицированный циклический динуклеотид) со стереохимией Rp или Sp вокруг фосфатных связей.

В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой Rp,Rp-дитио-2',3'-c-di-AMP (например, Rp,Rp-дитио-c-[A(2',5')pA(3',5')p]) или его циклический динуклеотидный аналог. В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой соединение, показанное в патентной публикации США № US 2015/0056224 (например, соединение на фиг. 2с, например соединение 21 или соединение 22). В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой с-[G(2',5')pG(3',5')p], его O-замещенное производное дитио-рибозы или соединение, показанное на фиг. 4 публикации согласно PCT № WO 2014/189805 и WO 2014/189806, каждая из которых включена посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой с-[A(2',5')pA(3',5')p] или его O-замещенное производное дитио-рибозы или представляет собой соединение, показанное на фиг. 5 публикации согласно PCT № WO 2014/189805 и WO 2014/189806. В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой 2'-O-пропаргил-циклический-[A(2',5')pA(3',5')p] (2'-O-пропаргил-ML-CDA) или соединение, показанное на фиг. 7 публикации согласно PCT № WO 2014/189806, которая включена посредством ссылки.

Другие иллюстративные агонисты STING раскрыты, например, в публикации согласно PCT № WO 2014/189805 и WO 2014/189806 и публикации США № 2015/0056225, каждая из которых включена посредством ссылки.

2. Иллюстративные ингибиторы PD-1.

В варианте осуществления комбинация содержит молекулу антитела к PD-1 или лиганда антитела к PD-1 (PD-L1). В некоторых вариантах осуществления комбинацию применяют, чтобы лечить рак, например рак, описанный в данном документе, например плотную опухоль (например, рак молочной железы, плоскоклеточную карциному, меланому, рак яичников, карциному фаллопиевых труб, перитонеальную карциному, саркому мягких тканей, меланому, рак молочной железы, рак пищевода, рак головы и шеи, рак эндометрия, рак шейки матки или базальноклеточную карциному), например гематологическую злокачественную опухоль (например, лейкомию (например, хронический лимфолейкоз (CLL) или лимфому (например, В-клеточную лимфому маргинальной зоны, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому)).

Иллюстративные не ограничивающие комбинации и применения молекул антитела к PD-1 описаны в US 2015/0210769, опубликованном 30 июля 2015 г., под названием "Молекулы антитела к PD-1 и их применения", включенном посредством ссылки во всей своей полноте.

В одном варианте осуществления молекула антитела к PD-1 содержит по меньшей мере один или два переменных домена тяжелой цепи (необязательно включающих константную область), по меньшей мере один или два переменных домена легкой цепи (необязательно включающих константную область) или оба, содержащих аминокислотную последовательность ВАР049-Clone-A, ВАР049-Clone-B, ВАР049-Clone-C, ВАР049-Clone-D или ВАР049-Clone-E; или описанную в табл. 1 US 2015/0210769 или кодируемую нуклеотидной последовательностью из табл. 1 US 2015/0210769; или последовательность по сути идентичную (например, на по меньшей мере на 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% или более идентичную) любой из ранее указанных последовательностей. Молекула антитела к PD-1 необязательно содержит лидерную последовательность из тяжелой цепи, легкой цепи или обеих, как показано в табл. 4 US 2015/0210769; или последовательность по сути идентичную ей.

В еще одном варианте осуществления молекула антитела к PD-1 содержит по меньшей мере одну, две или три определяющих комплементарность области (CDR) переменной области тяжелой цепи и/или переменной области легкой цепи антитела, описанного в данном документе, например антитела, выбранного из любого из

ВAP049-hum01, ВAP049-hum02, ВAP049-hum03, ВAP049-hum04,
 ВAP049-hum05, ВAP049-hum06, ВAP049-hum07, ВAP049-hum08, ВAP049-
 hum09, ВAP049-hum10, ВAP049-hum11, ВAP049-hum12, ВAP049-hum13,
 ВAP049-hum14, ВAP049-hum15, ВAP049-hum16, ВAP049-Clone-A, ВAP049-
 Clone-B, ВAP049-Clone-C, ВAP049-Clone-D или ВAP049-Clone-E;

или, как описано в табл. 1 US 2015/0210769, или кодируемого нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0210769; или последовательностью по сути идентичной (например, на по меньшей мере 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% или более идентичной) любой из ранее указанных последовательностей.

В еще одном варианте осуществления молекула антитела к PD-1 содержит по меньшей мере одну, две или три CDR (или в совокупности все CDR) из вариабельной области тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, показанную в табл. 1 US 2015/0210769 или кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1. В одном варианте осуществления одна или более CDR (или в совокупности все CDR) характеризуются одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более изменениями, например аминокислотными заменами или делениями, относящимися к аминокислотной последовательности, показанной в табл. 1 US 2015/0210769 или кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1.

В еще одном варианте осуществления молекула антитела к PD-1 содержит по меньшей мере одну, две или три CDR (или в совокупности все CDR) из вариабельной области легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, показанную в табл. 1 US 2015/0210769 или кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0210769. В одном варианте осуществления одна или более CDR (или в совокупности все CDR) характеризуются одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более изменениями, например аминокислотными заменами или делениями, относящимися к аминокислотной последовательности, показанной в табл. 1, или кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0210769. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к PD-1 содержит замену в CDR легкой цепи, например одну или более замен в CDR1, CDR2 и/или CDR3 легкой цепи. В одном варианте осуществления молекула антитела к PD-1 содержит замену в CDR3 легкой цепи в положении 102 вариабельной области легкой цепи, например замену цистеинового остатка на тирозиновый или цистеинового остатка на сериновый в положении 102 вариабельной области легкой цепи в соответствии с табл. 1 US 2015/0210769 (например, SEQ ID NO: 16 или 24 для мышинной или гибридной, немодифицированной; или любой из SEQ ID NO: 34, 42, 46, 54, 58, 62, 66, 70, 74 или 78 для модифицированной последовательности).

В другом варианте осуществления молекула антитела к PD-1 содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR (или в совокупности все CDR) из вариабельной области тяжелой и легкой цепей, содержащей аминокислотную последовательность, как показано в табл. 1 US 2015/0210769, или кодируется нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0210769. В одном варианте осуществления одна или более CDR (или в совокупности все CDR) характеризуются одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более изменениями, например аминокислотными заменами или делениями, относящимися к аминокислотной последовательности, показанной в табл. 1 US 2015/0210769, или кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0210769.

В одном варианте осуществления молекула антитела к PD-1 содержит

(а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1 под SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 3; и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 33, причем каждая раскрыта в табл. 1 US 2015/0210769;

(б) VH, которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 3; и VL, которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 32, причем каждая раскрыта в табл. 1 US 2015/0210769;

(с) VH, которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1 под SEQ ID NO: 224, аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 3; и VL, которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 33, причем каждая раскрыта в табл. 1 US 2015/0210769; или

(d) VH, которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1 под SEQ ID NO: 224; аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 3; и VL, которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 32, причем каждая раскрыта в табл. 1 US 2015/0210769.

В комбинациях ниже в данном документе в другом варианте осуществления молекула антитела к PD-1 содержит (i) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 224; аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 3; и (ii) переменную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33, причем каждая раскрыта в табл. 1 US 2015/0210769.

В других вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело к PD-1, выбранное из ниволумаба, пембролизумаба или пидилизумаба.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб. Альтернативные названия для ниволумаба включают MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538 или BMS-936558. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб (регистрационный номер CAS: 946414-94-4). Ниволумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG4, которое специфически блокирует PD1. Ниволумаб (клон 5C4) и другие человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD1, описаны в US 8008449 и WO 2006/121168. В одном варианте осуществления ингибитор к PD-1 представляет собой ниволумаб и содержит последовательность, раскрытую в данном документе (или последовательность по сути идентичную или подобную ей, например последовательность, идентичную по меньшей мере на 85, 90, 95% указанной последовательности).

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб (также называемый ламбролизумабом, MK-3475, MK03475, SCH-900475 или KEYTRUDA®; Merck) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD-1. Пембролизумаб и другие гуманизированные антитела к PD-1 описаны в Hamid, O. et al. (2013) *New England Journal of Medicine* 369 (2): 134-44, US 8354509 и WO 2009/114335.

В одном варианте осуществления ингибитор к PD-1 представляет собой пембролизумаб, описанный в, например, US 8354509 и WO 2009/114335, и содержит последовательность, раскрытую в данном документе (или последовательность по сути идентичную или подобную ей, например последовательность, идентичную по меньшей мере на 85, 90, 95% или выше указанной последовательности).

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой пидилизумаб. Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1k, которое связывается с PD1. Пидилизумаб и другие гуманизированные моноклональные антитела к PD-1 описаны в WO 2009/101611.

Другие антитела к PD1 включают AMP 514 (Amplimmune) среди прочих, например, антитела к PD1, описанные в US 8609089, US 2010028330 и/или US 20120114649.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, который содержит внеклеточную или PD-1-связывающую часть PD-L1 или PD-L2, слитую с константной областью (например, Fc-область последовательности иммуноглобулина)). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; например, раскрытый в WO 2010/027827 и WO 2011/066342), представляет собой растворимый рецептор слияния PD-L2-Fc, который блокирует взаимодействие между PD-1 и B7-H1.

3. Иллюстративные ингибиторы TIM-3.

В варианте осуществления комбинация содержит ингибитор TIM-3. В некоторых вариантах осуществления комбинацию применяют, чтобы лечить рак, например рак, описанный в данном документе, например плотную опухоль (например, рак молочной железы, плоскоклеточную карциному, меланому, рак яичников, карциному фаллопиевых труб, перитонеальную карциному, саркому мягких тканей, меланому, рак молочной железы, рак пищевода, рак головы и шеи, рак эндометрия, рак шейки матки или базальноклеточную карциному), например гематологическую злокачественную опухоль (например, лейкемию (например, хронический лимфолейкоз (CLL) или лимфому (например, В-клеточную лимфому маргинальной зоны, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому)).

В одном варианте осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор TIM-3. В некоторых вариантах осуществления комбинацию применяют для лечения рака, например рака, описанного в данном документе, например плотной опухоли или гематологической злокачественной опухоли.

Иллюстративные не ограничивающие комбинации и применения молекул антитела к TIM-3 описаны в US 2015/0218274, опубликованном 6 августа 2015 г., под названием "Молекулы антитела к TIM-3 и их применения", включенном посредством ссылки во всей своей полноте.

В одном варианте осуществления молекула антитела к TIM-3 содержит по меньшей мере один или два переменных домена тяжелой цепи (необязательно включающие константную область), по меньшей мере один или два переменных домена легкой цепи (необязательно включающие константную область) или оба, содержащих аминокислотную последовательность

AVTIM3, AVTIM3-hum01, AVTIM3-hum02, AVTIM3-hum03,
AVTIM3-hum04, AVTIM3-hum05, AVTIM3-hum06, AVTIM3-hum07,
AVTIM3-hum08, AVTIM3-hum09, AVTIM3-hum10,
AVTIM3-hum11, AVTIM3-hum12, AVTIM3-hum13, AVTIM3-hum14,
AVTIM3-hum15, AVTIM3-hum16, AVTIM3-hum17, AVTIM3-hum18,
AVTIM3-hum19, AVTIM3-hum20, AVTIM3-hum21, AVTIM3-hum22, AVTIM3-hum23;

или описанную в табл. 1-4 US 2015/0218274; или кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1-4 US 2015/0218274; или последовательность по сути идентичную (например, на по меньшей мере 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% или более идентичную) любой из ранее указанных последовательностей. Молекула антитела к TIM-3 необязательно содержит лидерную последовательность из тяжелой цепи, легкой цепи или обеих, как показано в US 2015/0218274; или последовательность по сути идентичную ей.

В еще одном варианте осуществления молекула антитела к TIM-3 содержит по меньшей мере одну, две или три определяющие комплементарность области (CDR) из переменной области тяжелой цепи и/или переменной области легкой цепи антитела, описанного в данном документе, например антитела, выбранного из любого из

AVTIM3, AVTIM3-hum01, AVTIM3-hum02, AVTIM3-hum03,
AVTIM3-hum04, AVTIM3-hum05, AVTIM3-hum06, AVTIM3-hum07,
AVTIM3-hum08, AVTIM3-hum09, AVTIM3-hum10, AVTIM3-hum11, AVTIM3-hum12,
AVTIM3-hum13, AVTIM3-hum14, AVTIM3-hum15, AVTIM3-hum16,
AVTIM3-hum17, AVTIM3-hum18, AVTIM3-hum19, AVTIM3-hum20, AVTIM3-hum21,
AVTIM3-hum22, AVTIM3-hum23;

или как описанного в табл. 1-4 US 2015/0218274; или кодируемого нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1-4 US 2015/0218274; или последовательностью по сути идентичной (например, на по меньшей мере 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% или более идентичной) любой из ранее указанных последовательностей.

В еще одном варианте осуществления молекула антитела к TIM-3 содержит по меньшей мере одну, две или три CDR (или в совокупности все CDR) из переменной области тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, как показано в табл. 1-4 US 2015/0218274, или кодируется нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1-4 US 2015/0218274. В одном варианте осуществления одна или более CDR (или в совокупности все CDR) характеризуется одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более изменениями, например аминокислотными заменами или делениями, относящимися к аминокислотной последовательности, показанной в табл. 1-4 US 2015/0218274, или кодируются нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1-4 US 2015/0218274.

В еще одном варианте осуществления молекула антитела к TIM-3 содержит по меньшей мере одну, две или три CDR (или в совокупности все CDR) из переменной области легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, как показано в табл. 1-4 US 2015/0218274, или кодируется нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1-4 US 2015/0218274. В одном варианте осуществления одна или более CDR (или в совокупности все CDR) характеризуются одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более изменениями, например аминокислотными заменами или делениями, относящимися к аминокислотной последовательности, показанной в табл. 1-4 US 2015/0218274 или кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1-4 US 2015/0218274. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к TIM-3 содержит замену в CDR легкой цепи, например одну или более замен в CDR1, CDR2 и/или CDR3 легкой цепи.

В другом варианте осуществления молекула антитела к TIM-3 содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR (или в совокупности все CDR) из переменной области тяжелой и легкой цепей, содержащей аминокислотную последовательность, как показано в табл. 1-4 US 2015/0218274, или кодируется нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1-4 US 2015/0218274. В одном варианте осуществления одна или более CDR (или в совокупности все CDR) характеризуются одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более изменениями, например ами-

нокислотными заменами или делениями, относящимися к аминокислотной последовательности, как показано в табл. 1-4 US 2015/0218274, или кодируются нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1-4 US 2015/0218274.

В одном варианте осуществления молекула антитела к TIM-3 содержит

(а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 9; аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 10 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 12, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 13 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 14, причем каждая раскрыта в табл. 1-4 US 2015/0218274;

(b) VH, которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 3; аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 4 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 5; и VL, которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 8, причем каждая раскрыта в табл. 1-4 US 2015/0218274;

(c) VH, которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 9; аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 25 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 5; и VL, которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 12, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 13 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 14, причем каждая раскрыта в табл. 1-4 US 2015/0218274;

(d) VH, которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 3; аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 24 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 5; и VL, которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 8, причем каждая раскрыта в табл. 1-4 US 2015/0218274;

(e) VH, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из VHCDR1 SEQ ID NO: 9; аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 31 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 5; и VL, которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 12, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 13 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 14, причем каждая раскрыта в табл. 1-4 US 2015/0218274; или

(f) VH, которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 3; аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 30 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 5; и VL, которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 8, причем каждая раскрыта в табл. 1-4 US 2015/0218274.

Иллюстративные антитела к TIM-3 раскрыты в патенте США № 8552156, WO 2011/155607, EP 2581113 и публикации патентного документа США № 2014/044728.

4. Иллюстративные ингибиторы LAG-3.

В варианте осуществления комбинация содержит ингибитор LAG-3. В некоторых вариантах осуществления комбинацию применяют, чтобы лечить рак, например рак, описанный в данном документе, например плотную опухоль (например, рак молочной железы, плоскоклеточную карциному, меланому, рак яичников, карциному фаллопиевых труб, перитонеальную карциному, саркому мягких тканей, меланому, рак молочной железы, рак пищевода, рак головы и шеи, рак эндометрия, рак шейки матки или базальноклеточную карциному), например гематологическую злокачественную опухоль (например, лейкемию (например, хронический лимфолейкоз (CLL) или лимфому (например, В-клеточную лимфому маргинальной зоны, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому)).

В одном варианте осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор LAG-3. В некоторых вариантах осуществления комбинацию применяют для лечения рака, например рака, описанного в данном документе, например плотной опухоли или гематологической злокачественной опухоли.

Иллюстративные не ограничивающие комбинации и применения молекул антитела к LAG-3 описаны в US 2015/0259420, опубликованном 17 сентября 2015 г., под названием "Молекулы антитела к LAG-3 и их применения", включенном посредством ссылки во всей своей полноте.

В одном варианте осуществления молекула антитела к LAG-3 содержит по меньшей мере один или два вариабельных домена тяжелой цепи (необязательно включающие константную область) по меньшей мере один или два вариабельных домена легкой цепи (необязательно включающие константную область)

или оба, содержащих аминокислотную последовательность любого из

ВAP050-hum01, ВAP050-hum02, ВAP050-hum03, ВAP050-hum04, ВAP050-hum05, ВAP050-hum06, ВAP050-hum07, ВAP050-hum08, ВAP050-hum09, ВAP050-hum10, ВAP050-hum11, ВAP050-hum12, ВAP050-hum13, ВAP050-hum14, ВAP050-hum15, ВAP050-hum16, ВAP050-hum17, ВAP050-hum18, ВAP050-hum19, ВAP050-hum20, huВAP050(Ser) (например, ВAP050-hum01-Ser, ВAP050-hum02-Ser, ВAP050-hum03-Ser, ВAP050-hum04-Ser, ВAP050-hum05-Ser, ВAP050-hum06-Ser, ВAP050-hum07-Ser, ВAP050-hum08-Ser, ВAP050-hum09-Ser, ВAP050-hum10-Ser, ВAP050-hum11-Ser, ВAP050-hum12-Ser, ВAP050-hum13-Ser, ВAP050-hum14-Ser, ВAP050-hum15-Ser, ВAP050-hum18-Ser, ВAP050-hum19-Ser или ВAP050-hum20-Ser), ВAP050-Clone-F, ВAP050-Clone-G, ВAP050-Clone-H, ВAP050-Clone-I или ВAP050-Clone-J;

или описанную в табл. 1 US 2015/0259420, или кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0259420; или последовательность по сути идентичную (например, на по меньшей мере 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% или более идентичную) любой из ранее указанных последовательностей.

В еще одном варианте осуществления молекула антитела к LAG-3 содержит по меньшей мере одну, две или три определяющие комплементарность области (CDR) из вариательной области тяжелой цепи и/или вариательной области легкой цепи антитела, описанного в данном документе, например антитела, выбранного из любого из

ВAP050-hum01, ВAP050-hum02, ВAP050-hum03, ВAP050-hum04, ВAP050-hum05, ВAP050-hum06, ВAP050-hum07, ВAP050-hum08, ВAP050-hum09, ВAP050-hum10, ВAP050-hum11, ВAP050-hum12, ВAP050-hum13, ВAP050-hum14, ВAP050-hum15, ВAP050-hum16, ВAP050-hum17, ВAP050-hum18, ВAP050-hum19, ВAP050-hum20, huВAP050(Ser) (например, ВAP050-hum01-Ser, ВAP050-hum02-Ser, ВAP050-hum03-Ser, ВAP050-hum04-Ser, ВAP050-hum05-Ser, ВAP050-hum06-Ser, ВAP050-hum07-Ser, ВAP050-hum08-Ser, ВAP050-hum09-Ser, ВAP050-hum10-Ser, ВAP050-hum11-Ser, ВAP050-hum12-Ser, ВAP050-hum13-Ser, ВAP050-hum14-Ser, ВAP050-hum15-Ser, ВAP050-hum18-Ser, ВAP050-hum19-Ser или ВAP050-hum20-Ser), ВAP050-Clone-F, ВAP050-Clone-G, ВAP050-Clone-H, ВAP050-Clone-I, или ВAP050-Clone-J;

или описанного в табл. 1 US 2015/0259420, или кодируемого нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0259420; или последовательностью по сути идентичной (например, на по меньшей мере 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99% или более идентичной) любой из ранее указанных последовательностей.

В еще одном варианте осуществления молекула антитела к LAG-3 содержит по меньшей мере одну, две или три CDR (или в совокупности все CDR) из вариательной области тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, показанную в табл. 1 US 2015/0259420, или кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0259420. В одном варианте осуществления одна или более CDR (или в совокупности все CDR) характеризуются одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более изменениями, например аминокислотными заменами или делениями, относящимися к аминокислотной последовательности, показанной в табл. 1 US 2015/0259420 или кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0259420.

В еще одном варианте осуществления молекула антитела к LAG-3 содержит по меньшей мере одну, две или три CDR (или в совокупности все CDR) из вариательной области легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, показанную в табл. 1 US 2015/0259420 или кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0259420. В одном варианте осуществления одна или более CDR (или в совокупности все CDR) характеризуются одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более изменениями, например аминокислотными заменами или делениями, относящимися к аминокислотной последовательности, показанной в табл. 1 US 2015/0259420 или кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0259420. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к PD-L1 содержит замену в CDR легкой цепи, например одну или более замен в CDR1, CDR2 и/или CDR3 легкой цепи.

В другом варианте осуществления молекула антитела к LAG-3 содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR (или в совокупности все CDR) из вариательной области тяжелой и

легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, показанную в табл. 1 US 2015/0259420 или кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0259420. В одном варианте осуществления одна или более CDR (или в совокупности все CDR) характеризуются одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более изменениями, например, аминокислотными заменами или делениями, относящимися к аминокислотной последовательности, показанной в табл. 1 или кодируемой нуклеотидной последовательностью, показанной в табл. 1 US 2015/0259420.

В одном варианте осуществления молекула антитела к LAG-3 содержит

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 286; аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 3, причем каждая раскрыта в табл. 1 US 2015/0259420; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 12, причем каждая раскрыта в табл. 1 US 2015/0259420.

В другом варианте осуществления молекула антитела к LAG-3 содержит

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность VHCDR1, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 286; аминокислотную последовательность VHCDR2 под SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность VHCDR3 под SEQ ID NO: 3, причем каждая раскрыта в табл. 1 US 2015/0259420; и

(ii) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность VLCDR1 под SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность VLCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность VLCDR3 под SEQ ID NO: 15, причем каждая раскрыта в табл. 1 US 2015/0259420.

В одном варианте осуществления молекула антитела к LAG-3 содержит аминокислотную последовательность VHCDR1 под SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления молекула антитела к LAG-3 содержит аминокислотную последовательность VHCDR1 под SEQ ID NO: 4. В еще одном варианте осуществления молекула антитела к LAG-3 содержит аминокислотную последовательность VHCDR1 под SEQ ID NO: 286, причем каждая раскрыта в табл. 1 US 2015/0259420.

В некоторых вариантах осуществления антитело к LAG-3 представляет собой BMS-986016. BMS-986016 (также называемый BMS986016; Bristol-Myers Squibb) представляет собой моноклональное антитело, которое связывается с LAG-3. BMS-986016 и другие гуманизированные антитела к LAG-3 описаны в US 2011/0150892, WO 2010/019570 и WO 2014/008218.

5. Иллюстративные ингибиторы CTLA-4.

В варианте осуществления комбинация содержит ингибитор CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления комбинацию применяют, чтобы лечить рак, например рак, описанный в данном документе, например плотную опухоль (например, рак молочной железы, плоскоклеточную карциному, меланому, рак яичников, карциному фаллопиевых труб, перитонеальную карциному, саркому мягких тканей, меланому, рак молочной железы, рак пищевода, рак головы и шеи, рак эндометрия, рак шейки матки или базальноклеточную карциному), например гематологическую злокачественную опухоль (например, лейкемию (например, хронический лимфолейкоз (CLL) или лимфому (например, В-клеточную лимфому маргинальной зоны, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому)).

В одном варианте осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления комбинацию применяют для лечения рака, например рака, описанного в данном документе, например плотной опухоли или гематологической злокачественной опухоли.

Иллюстративные антитела к CTLA4 включают тримелимуаб (моноклональное антитело IgG2, доступное от Pfizer, ранее известное как тицилимуаб, CP-675,206) и ипилимуаб (антитело CTLA-4, также известное как MDX-010, номер CAS 477202-00-9).

В одном варианте осуществления комбинация содержит молекулу антитела к PD-1, например, как описано в данном документе, и антитело к CTLA-4, например ипилимуаб. Иллюстративные дозы, которые можно применять, включают дозу молекулы антитела к PD-1 от приблизительно 1 до 10 мг/кг, например 3 мг/кг, и дозу антитела к CTLA-4, например ипилимуаба, от приблизительно 3 мг/кг.

Другие иллюстративные антитела к CTLA-4 описаны, например, в патенте США № 5811097, который включен посредством ссылки.

6. Иллюстративный модулятор GITR.

В варианте осуществления комбинация содержит модулятор GITR, такой как агонист или антагонист. В варианте осуществления модулятор GITR представляет собой антагонист. В некоторых вариантах осуществления комбинацию применяют, чтобы лечить рак, например рак, описанный в данном документе, например плотную опухоль (например, рак молочной железы, плоскоклеточную карциному, меланому, рак яичников, карциному фаллопиевых труб, перитонеальную карциному, саркому мягких

тканей, меланому, рак молочной железы, рак пищевода, рак головы и шеи, рак эндометрия, рак шейки матки или базальноклеточную карциному), например гематологическую злокачественную опухоль (например, лейкемию (например, хронический лимфолейкоз (CLL) или лимфому (например, В-клеточную лимфому маргинальной зоны, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому)).

Иллюстративные модуляторы GITR включают, например, слитые белки GITR и антитела к GITR (например, бивалентные антитела к GITR), такие как слитый белок GITR, описанный в патенте США № 6111090, европейском патенте № 0920505B1, патенте США № 8586023, публикации согласно РСТ № WO 2010/003118 и 2011/090754, или антитело к GITR описано, например, в патенте США № 7025962, европейском патенте № 1947183B1, патенте США № 7812135, патенте США № 8388967, патенте США № 8591886, европейском патенте № EP 1866339, публикации согласно РСТ № WO 2011/028683, патенте США № 8709424, публикации согласно РСТ № WO 2013/039954, международной публикации № WO 2015/026684, публикации согласно РСТ № WO 2005/007190, публикации согласно РСТ № WO 2007/133822, публикации согласно РСТ № WO 2005/055808, публикации согласно РСТ № WO 99/40196, публикации согласно РСТ № WO 2001/03720, публикации согласно РСТ № WO 99/20758, патенте США № 6689607, публикации согласно РСТ № WO 2006/083289, публикации согласно РСТ № WO 2005/115451, патенте США № 7618632, публикации согласно РСТ № WO 2011/051726, международной публикации № WO 2004060319 и международной публикации № WO 2014012479, каждый из которых включен посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Получение и скрининг антитела NARA1 мыши к IL-2 человека.

Эталонное антитело, обозначенное NARA1, получали, выделяли и охарактеризовывали его структуру в соответствии со способами, хорошо известными специалисту в данной области техники.

Мышей Balb/c иммунизировали посредством IL-2 человека (h) (34-8029, eBioscience) в адьюванте Фрейнда (F-5881, Sigma) в дни 0, 14 (подкожно) и 28 (внутривенно). Сыворотку крови собирали перед первой иммунизацией и в дни 9-11 после каждой иммунизации, чтобы проверить титры антител к hIL-2. В день 35 мышей умерщвляли и собирали клетки селезенки, следуя стандартным процедурам. Спленциты смешивали с клетками миеломы в отношении 5:1 с полиэтиленгликолем 1500 (10783641001, Roche). Фидер, полученный посредством перитонеального смыва у мышей Balb/c, применяли для выращивания клонов в селективной питательной среде IMDM (21980, Life Technologies), дополненной 10% FBS с ультранизким содержанием IgG (16250, Life Technologies), 50 мкМ меркаптоэтанол (313050, Life technologies), 1:100 инсулин-трансферрин-селена (41400-045, Life Technologies), 2% IL-6-кондиционированной среды, пенициллин-стрептомицином (15240, Life Technologies), гентамицином (15750, Life Technologies) и гипоксантин-аминоптеринтимидиновой питательной средой (HAT, H037, Sigma-Aldrich) в течение нескольких дней. Затем поликлональные антитела подвергали скринингу на предмет связывания hIL-2 с применением ELISA прямого связывания и на предмет специфичности с применением конкурентного ELISA и разбавляли для получения клонов моноклональных антител. Для размножения моноклональных антител питательную среду HAT заменяли на гипоксантин-тимидиновую питательную среду (HT, 41065, Life Technologies). Затем моноклональные антитела концентрировали посредством блоков, представляющих собой фильтрующие центрифуги с мембранной, не пропускающей молекулы, молекулярный вес которых составляет 100 кДа, в соответствии с рекомендациями поставщика (UFC9100, Merck Millipore). Концентрат дополнительно тестировали на предмет специфичности в зависимости от дозы с применением конкурентного ELISA и *in vivo* с применением 4 ежедневных интраперитонеальных инъекций в дозах, составляющих 200 мкл концентрата, объединенного с 1,5 мкг hIL-2, с последующим анализом посредством проточной цитометрии субпопуляций Т-клеток и естественных клеток-киллеров (NK). NARA1 очищали с применением агарозы с G-белком (20398, ThermoFisher Scientific) в соответствии с рекомендациями поставщика.

Полноразмерная тяжелая цепь NARA1 представляет собой SEQ ID NO: 115, и аминокислотная последовательность полноразмерной легкой цепи NARA1 представляет собой SEQ ID NO: 117.

Соответствующие переменные области аминокислотные последовательности VH и VL NARA1 представляют собой SEQ ID NO: 111 (переменные тяжелые цепи) и SEQ ID NO: 113 (переменные легкие цепи).

Последовательности нуклеотидов, кодирующие полноразмерные легкие и тяжелые цепи NARA1, представляют собой SEQ ID NO: 116 (последовательность, кодирующая тяжелую цепь, содержащая лидерную последовательность) и SEQ ID NO: 118 (последовательность, кодирующая легкую цепь, содержащая лидерную последовательность).

Последовательности нуклеотидов, кодирующие переменные легкие и тяжелые цепи NARA1, представляют собой SEQ ID NO: 112 (последовательность, кодирующая переменные тяжелые цепи) и SEQ ID NO: 114 (последовательность, кодирующая переменные легкие цепи).

CDR-области NARA1 обозначали с применением системы Kabat (Kabat, E.A. et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Pub-

lication № 91-3242, см. также Zhao&Lu 2009, *Molecular Immunology* 47:694-700). Для облегчения чтения, если CDR-области обозначены согласно определению Kabat, далее их называли HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 соответственно. CDR-области NARA1 представляют собой: HCDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 4, HCDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 2, HCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 3, LCDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 19, LCDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 20, LCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 21.

Пример 2. Кристаллическая структура NARA1 (1). Материалы и способы.

Определяли сложную структуру мутантного интерлейкина 2 человека (SEQ ID NO: 110), обычно известную специалисту в данной области техники как Proleukin® (альдеслейкин), связывающуюся с Fab-фрагментом антитела NARA1. Полученную нумерацию остатков Proleukin® присваивали в соответствии с нумерацией IL-2 wt.

Как будет подробно рассмотрено ниже, различия в последовательности между Proleukin® и hIL-2 wt незначительны и Proleukin® представляет собой действительную модель структурного анализа hIL-2.

Для определения эпитопа применяли рентгеновскую кристаллографию, чтобы раскрыть структуру с атомным разрешением комплекса, упомянутого выше. Рентгеновская кристаллография представляет собой технологию, которая становится регулярно и широко применяемой для получения данных о структуре биомолекул, включая антитела и их комплексы с антигенами (Adams et al. (2013), *Annual Review Biophysics* 42:265-287; Garman (2014), *Science* 343:1102-1108; Joachimiak (2009), *Current Opinion Structural Biology* 19:573-584.)

Антиген Proleukin® является коммерчески доступным в виде лиофилизированного порошка вместе с наполнителями (каждый 1 мг Proleukin® смешан с примерно 50 мг маннитола, 0,18 мг додецилсульфата натрия, 0,173 мг натрия дигидрофосфата моногидрата и 0,89 мг динатрия гидрофосфата дигидрата). Перед применением Proleukin® для образования комплекса его очищали посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ для удаления наполнителей.

Fab-фрагмент NARA1 (NARA1-Fab) получали посредством расщепления полноразмерного антитела папаином с последующей хроматографией с А-белком. Вкратце 6,5 мл полноразмерного NARA1 (9 мг/мл в 50 мМ цитратного буфера с 90 мМ хлорида натрия при pH 7,0) смешивали с 5 Мм DTT и 590 мкг папаина (Roche). Реакцию расщепления проводили при комнатной температуре в течение 16 ч и останавливали посредством добавления 15 мкл 56 мМ раствора E64 (Roche). Затем реакционную смесь разбавляли в 10 раз посредством 25 мМ Tris, 25 мМ NaCl, pH 8,0 и загружали в колонку объемом 5 мл с А-белком (GE Healthcare), уравнивали с колонкой объемом 5 мл, содержащей 25 мМ Tris, 25 мМ NaCl, pH 8,0; при этом Fab-фрагмент находился в загрузочной фракции, а Fc-фрагмент связывался с А-белком колонки.

После ВЭЖХ порошок Proleukin® растворяли в H₂O до концентрации, составляющей 5,5 мг/мл, с образованием комплекса. 6,6 мг Proleukin® с избытком добавляли к раствору, содержащему 11,5 мг Fab-фрагмента NARA1 по каплям. Для удаления излишка Proleukin®, который осаждали при текущих условиях, применяли центрифугирование. Затем комплекс очищали посредством гель-фильтрации с Superdex 200 10×300 (GE Healthcare) с использованием подвижного буфера с 25 мМ Tris, 25 мМ NaCl, pH 7,4.

После гель-фильтрации комплекс Proleukin®/NARA1-Fab концентрировали до 14 мг/мл и подвергали скринингу посредством способа диффузии примесей из газовой фазы в виде сидячих капель. Раствор белка смешивали 1:1 с резервным буфером до общего объема, составляющего 0,4 мкл. Эксперименты проводили посредством роботизированной системы Phoenix (Art Robbins Instruments), хранящейся в Rocklmanager hotel (Formulatrix) при 19°C, и автоматически получали изображение. Кристаллы собирали через 4 дня после проведения скрининга при условии присутствия 20 вес./об.%, полиэтиленгликоля 3350 и 0,2 М нитрата натрия. Кристаллы защищали от действия низкой температуры посредством резервуарного буфера, содержащего 10% глицерина, и мгновенно замораживали в жидком азоте перед сбором данных. Данные о дифракции собирали посредством Swiss Light Source (Филлиген, Швейцария) в канале пучка PX-II посредством пиксельного детектора Pilatus с применением рентгеновского излучения с длиной волны, составляющей 0,99998 Å.

Массив данных обрабатывали посредством XDS и XSCALE (версия от 6-го декабря 2010 г.) и регулировали структуру посредством способа молекулярного замещения посредством программы PHASER с применением номера доступа "3INK" Банка данных белков и нуклеиновых кислот в виде модели поиска для IL-2 и номера доступа "3TT1" Банка данных белков в виде модели поиска для Fab-фрагмента. Построение интерактивной модели и доработку проводили посредством программ Coot (пакет программного обеспечения для кристаллографической ориентировки объекта) и AUTOBUSTER (Bricogne et al., 2011). Все фигуры получали посредством программы PyMOL (молекулярной графической системы; DeLano Scientific: Пало-Альто, Калифорния; <http://www.pymol.org>).

Остатки эпитопа определяли как такие остатки из Proleukin®, которые находятся на расстоянии 4 Å от любого атома в Fab-фрагменте NARA1 и дополнительно подтверждены программой CCP4 CONTACT и AREAIMOL (Collaborative Computational Project, номер 4, версия 6.4.0). Аналогично определяли остатки паратопа, такие как остатки от NARA1-Fab, которые находятся в интервале, составляющем 4 Å от

любого атома в Proleukin®.

(2) Результаты.

Комплекс Proleukin®/NARA1-Fab расщепляли до 1,95 Å в пространственной группе C121 с постоянной решеткой $a=201,8$ Å, $b=36,2$ Å, $c=88,7$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=102,9^\circ$, $\gamma=90^\circ$. См. табл. 3 для более подробной информации о статистических данных структуры. В каждой ассиметричной единице находится одна сложная молекула.

Таблица 3
Статистические данные структуры для комплекса Proleukin®/NARA1-Fab

Сбор данных	
Пространственная группа	C121
Размеры ячейки	
a, b, c (Å)	201,757, 36,233, 88,707
α, β, γ (°)	90, 102,93, 90
Разрешающая способность (Å)	58,74-1,95
$R_{\text{объединенная}}$	0,066 (0,472)
$I/\sigma I$	14,18 (2,59)
Завершенность (%)	84,8(96)
Избыток	3,19
Доработка	
Разрешающая способность (Å)	58,74-1,95
№ отражений	34750
$R_{\text{рабочая}} / R_{\text{свободная}}$	0,2052/0,2872
Диаграмма Рамачандрана	
Неразрешенные	0,0162
Разрешенные	0,0378
Благоприятные	0,9459
Отклонения г.м.с.	
Длина связи (Å)	0,01
Углы связи (°)	1,7

(3) Анализ эпитопа и паратопа.

На фиг. 1 представлен обзор трехмерной структуры комплекса Proleukin®/Fab-NARA1, полученного в примере 1. Легкую цепь Fab-фрагмента NARA1 обозначали А, тяжелую цепь Fab-фрагмента NARA1 показали как В, остатки эпитопа, распознанные NARA1-Fab, обозначали D, а Proleukin® обозначали С и мутацию, С145S выделяли.

На фиг. 2 представлен дополнительный анализ остатков эпитопа. На оси X перечислена аминокислотная последовательность и нумерация в соответствии с SEQ ID NO: 110. На верхней стороне оси Y показано общее количество атомов NARA1-Fab, которое находится в пределах 4 Å от соответствующего остатка Proleukin®, и на нижней стороне оси Y показана доступная для растворителя уменьшенная площадь (Å²) после связывания с NARA1-Fab.

Proleukin®, который применяли в примере 1, содержит мутацию С145S. Как показано на фиг. 1, С145S находится далеко от области эпитопа. Кроме того, суперпозиция атомов C α в промежутках Proleukin® в примере 1 с атомами C α из hIL-2 wt в комплексе с CD25, CD122 и CD132 (PDB: 2B51) демонстрирует г.м.с.d 0,447 Å, что указывает на то, что мутация не нарушает общую структуру. Следовательно, Proleukin® с мутацией С145S представляет собой действительную модель структурного анализа для hIL-2 wt.

hIL-2 представляет собой белок, характеризующийся пучком из 4 спиралей, и 4 спирали называли от N-конца до С-конца как А, В, С и D соответственно. Эпитоп, распознанный посредством NARA1-Fab, как показано на фиг. 1, представляет собой конформационный эпитоп и охватывает две области, как показано на фиг. 2: одна область (N50-K63) включает петлю и короткую спираль и соединяет спирали А и В, а другая область (N91-N97) включает петлю и соединяет спирали В и С.

Остатки эпитопа вместе с взаимодействующими остатками паратопа из NARA1-Fab обобщены в табл. 4. Среди всех остатков эпитопа Arg58, как показано на фиг. 2, представляет собой наиболее важный остаток эпитопа для связывания с NARA1-Fab, поскольку данный остаток сам по себе характеризуется 42 взаимодействующими атомами из NARA1-Fab и составляет 17,7% общей оставшейся доступной для растворителя площади поверхности вследствие связывания с NARA1-Fab. Кроме того, Arg58, как показано на фиг. 3, образует два прочных солевых мостика с Glu35 в HCDR1 и с Asp100 из LCDR3 соответст-

венно. Arg58 также образует π -катионное взаимодействие с ароматическим кольцом Tyr100 из LCDR3. Остатки K52, P54, K55, T57, T61, F62, K63, Q94 и K96 также считаются важными для связывания с NARA1-Fab, так как все они демонстрируют 5 или больше взаимодействующих атомов из NARA1-Fab и более 30 Å² оставшейся доступной для растворителя площади поверхности, как показано на фиг. 2.

Таблица 4

Краткое описание эпитопа и паратопа

Остаток легкой цепи	Остаток эпитопа	Остаток тяжелой цепи
Y31	N50	
Y31	K52	
Y31	N53	
Y31, Y36, S95, N96	P54	
	K55	W99, G101, G103, Y105
D98	T57	
D98, Y100	R58	L33, E35, W47, W99
	T61	N52, S55, N59
	F62	L33, N52
	K63	S55
	N91	G101, D102, G103
	L92	W99, G101
	A93	G101
	Q94	D102, G103, Y104
D32, D34	K96	Y104
D32	N97	

На фиг. 3 показан Arg58 в качестве наиболее важного остатка эпитопа, распознанного NARA1-Fab. А обозначает Proleukin®, В обозначает тяжелую цепь и С обозначает легкую цепь. Вовлеченные остатки показаны в виде полосок.

(4) Связывающие свойства NARA1-Fab.

На фиг. 4 показано перекрытие комплекса Proleukin®/NARA1-Fab с четвертичным комплексом IL-2/CD25/CD122/CD132. Сложную четвертичную структуру брали из PDB под номером доступа "2B51" с графическим изображением D, обозначающим hIL-2 wt, графическим изображением В, обозначающим CD122, графическим изображением С, обозначающим CD132, и поверхностью А, обозначающей CD25. В сложной структуре Proleukin®/NARA1-Fab графическое изображение D, перекрывающее hIL-2 wt, обозначает Proleukin®, графическое изображение Е обозначает тяжелую цепь и графическое изображение F обозначает легкую цепь.

Структура перекрывает два комплекса, как изображено на фиг. 4, при этом ясно показано, что NARA1-Fab создает конкуренцию CD25, но не CD122/CD132, что соответствует наблюдению, что комплекс IL-2/NARA1 в основном демонстрирует активность в отношении Т-эффекторных клеток, чем активность в отношении Т-регуляторных клеток.

(5) С-спираль Proleukin® в комплексе с NARA1-Fab перенимает конформацию, которая подобна конформации в четвертичном комплексе.

На фиг. 5 показано перекрытие С-спиралей из IL-2_C145A (PDB: 3INK), суперкина (PDB: 3QB1), IL-2/CD25/CD122/CD132 (PDB: 2B51) и Proleukin®/NARA1-Fab.

Полярное взаимодействие между С-спиралью в IL-2 и CD122 играет важную роль в связывании двух частей (Wang et al. (2005), Science 310:1159-1163). В 2012 г. Levin et al. продемонстрировали, что суперкин, мутант IL-2, сам по себе характеризуется С-спиралью, перенимающей конформацию, подобную конформации в четвертичном комплексе, а суперкин характеризуется в ~215 раз более высокой аффинностью связывания в отношении CD122, чем IL-2 wt (Levin et al. (2012), Nature 484:529-533). Наблюдали, что такое изменение конформации С-спирали ассоциировано со стабилизацией конформации, что впоследствии уменьшает энергетические затраты на связывание с CD122. Как показано на фиг. 5, конформация С-спирали из Proleukin® в комплексе с NARA1-Fab является также подобной конформации, наблюдаемой в суперкине, а также в четвертичном комплексе IL-2/CD25/CD122/CD132. Таким образом, возможно, что комплекс Proleukin®/NARA1-Fab может демонстрировать более высокую аффинность связывания в отношении CD122, чем демонстрирует hIL-2 wt.

Пример 3. Гуманизация моноклонального антитела NARA1 мыши.

В данном документе описана гуманизация антитела NARA1 мыши к IL-2 человека, включающая осуществление выбора акцепторных каркасов человека, обратные мутации и мутации, которые по сути сохраняют и/или улучшают связывающие свойства CDR-привитых акцепторных каркасов человека.

Способ гуманизации хорошо описан в уровне техники (Jones et al., 1986, Queen et al., 1989, Riechmann et al., 1988, Verhoeven, Milstein and Winter, 1988). Термин гуманизация описывается как перенос антигенсвязывающего сайта антитела, отличного от человеческого, например антитела, полученного от мыши, в акцепторный каркас человека, например, в последовательность зародышевой линии человека (Retter et al., 2005). Основную актуальность гуманизации антитела видели в минимизации риска развития иммунного ответа на антитело у человека (Rebello et al., 1999).

Антигенсвязывающий сайт содержит определяющие комплементарность области (CDR) (Chothia and Lesk, 1987, Kabat et al., 1991) и положения за пределами CDR, т.е. в каркасных областях переменных доменов (VL и VH), которые непосредственно или опосредованно влияют на связывание. Остатки каркасных областей, которые могут непосредственно влиять на связывание, можно найти, например, в так называемой области "внешней" петли, расположенной между CDR2 и CDR3. Остатки, которые опосредованно влияют на связывание, находили, например, в так называемых зонах Вернье (Foote and Winter, 1992). Считается, что они поддерживают конформацию CDR. Такие положения за пределами CDR принимали во внимание при осуществлении выбора подходящего акцепторного каркаса для сведения к минимуму количества отклонений конечного гуманизованного антитела к последовательности акцептора зародышевой линии человека в каркасных областях.

1. Последовательная оптимизация созревания аффинности.

Известно, что некоторые мотивы аминокислотных последовательностей подвергали посттрансляционной модификации (PTM), такой как гликозилирование (т.е. NxS/T, x любой, кроме P), окисление свободных цистеиновых остатков, дезаминирование (например, NG) или изомеризация (например, DG). В случае присутствия в CDR-областях, такие мотивы являются идеально удаляемыми посредством сайт-направленного мутагенеза для увеличения гомогенности продукта.

Способ созревания аффинности хорошо описан в уровне техники. Среди многих систем отображения фаговый дисплей (Smith, 1985) и дисплей на эукариотических клетках, таких как дрожжи (Boder E. and Wittrup K. (1997), Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol.*, 15(6), p. 553-7.), представляются наиболее часто применяемыми системами для осуществления выбора взаимодействия антитело-антиген. Преимущества таких систем отображения состоят в том, что они подходят для широкого диапазона антигенов и что строгость отбора можно легко регулировать. При фаговом дисплее можно отображать scFv или Fab-фрагменты, а при дрожжевом дисплее, кроме того, можно отображать полноразмерный IgG. Такие часто применяемые способы позволяют осуществлять выбор требуемого варианта антитела из больших библиотек с разнообразием, составляющим более 10⁷. Библиотеки с меньшим разнообразием, например 10³, можно подвергать скринингу посредством микроэкспрессии и ELISA.

Библиотеки вариантов антител, воздействующих нецеленаправленно, или случайных антител можно получать, например, посредством ПЦР пониженной точности (Cadwell and Joyce, 1994) и обеспечить очень простой, но иногда ограниченный подход. Другая стратегия представляет собой CDR-направленное разнообразие кандидатных антител. На одно или более положений в одном или более CDR можно специфически целенаправленно воздействовать с применением, например, вырожденных олигонуклеотидов (Thompson et al., 1996), тринуклеотидного мутагенеза (TRIM) (Kayushin et al., 1996) или любого другого подхода, известного из уровня техники.

2. Получение плазмид экспрессии.

Порядок ДНК-последовательностей, кодирующих гуманизованные домены VL и VH, определяли в GeneArt (Life Technologies Inc., Регенсбург, Германия), включая оптимизацию кодона для Homo sapiens. Последовательности, кодирующие домены VL и VH, субклонировали посредством вырезания и вставки векторов взятых из GeneArt, в векторы экспрессии, подходящие для секреции в клетках млекопитающих. Тяжелые и легкие цепи клонировали в отдельные векторы экспрессии для обеспечения возможности котрансфекции. Элементы вектора экспрессии включают промотор (энхансер-промотор пито-мегаловируса (CMV)), сигнальную последовательность для облегчения секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий возможность эписомальной репликации и репликации у прокариот (например, исходный SV40 и ColE1 или другие, известные из уровня техники), и элементы для обеспечения возможности осуществления отбора (ген устойчивости к ампициллину и зеоциновый маркер).

3. Экспрессия и очищение гуманизованных кандидатных антител.

Эмбриональные клетки почек человека, конститутивно экспрессирующие большой Т-антиген SV40 (HEK293-T ATCC11268), являются одной из предпочтительных клеточных линий-хозяев для осуществления транзientной экспрессии гуманизованных и/или оптимизированных белков IgG. Трансфекцию проводили с применением PEI (полиэтиленимина, MW 25000 линейного, Polysciences, США, № по каталогу 23966) в качестве реагента трансфекции. Исходный раствор PEI готовили посредством тщательного растворения 1 г PEI в 900 мл воды, приемлемой для культивирования клеток при комнатной температуре (RT). Для облегчения растворения PEI раствор подкисляли посредством добавления HCl до pH 3-5 с последующей нейтрализацией посредством NaOH с получением конечного pH, составляющего 7,05. В заключение объем доводили до 1 л и фильтровали раствор через фильтр с размером пор, составляющим 0,22 мкм, разделяли на аликвоты и замораживали при -80°C до дальнейшего применения. Однажды заморозив, аликвоту можно повторно замораживать до 3 раз при -20°C, но не следует хранить в течение долгого срока при -20°C. Клетки HEK293T культивировали с применением специализированной культуральной среды Novartis, не содержащей сыворотки крови, для трансфекции и репродукции клеток и культуральной среды ExCell VPRO, не содержащей сыворотку крови (SAFC Biosciences, США, № по каталогу 24561C) в качестве среды для продуцирования/питания. Клетки, приготовленные для времен-

ных трансфекций, культивировали в виде суспензионной культуры. Для маломасштабных трансфекций (<5 л) выращивали клетки во встряхиваемых колбах Corning (Corning, Тьюксбери, Массачусетс) на круговой качалке (100-120 об./мин) во влажной камере при 5% CO₂ (колбы, содержащие посевную культуру). Для трансфекции клетки в посевных культурах следует поддерживать в экспоненциальной фазе роста (концентрации клеток от 5×10⁵ до 3×10⁶ /мл), и они должны характеризоваться жизнеспособностью >90%. Концентрации клеток за пределами данного диапазона приводят либо к лаг-фазе после разведения, либо к уменьшению эффективности трансфекции. Для маломасштабных трансфекции (<5 л) аликвоту клеток брали из посевных культур и регулировали до 1,4×10⁶ клеток/мл в 36% конечного объема посредством культуральной среды Novartis, не содержащей сыворотку крови. Растворение ДНК (раствор 1: 0,5 мг плазмид для экспрессии тяжелой цепи и 0,5 мг плазмид экспрессии легкой цепи на 1 л раствора для трансфекции) получали посредством разведения ДНК до 1 мг/л (конечный объем) в 7% конечного объема культуры с последующим слабым перемешиванием. Для предотвращения бактериальной контаминации данный раствор фильтровали с применением фильтра с размером пор, составляющим 0,22 мкм (например, Millipore Stericup). Затем раствор PEI с концентрацией, составляющей 3 мг/л (конечный объем), также разводили в 7% конечного объема культуры и слабо перемешивали (раствор 2). Оба раствора инкубировали в течение 5-10 мин при комнатной температуре (RT). Затем раствор 2 добавляли в раствор 1 при слабом перемешивании и инкубировали в течение еще 5-15 мин при комнатной температуре. Затем смесь для трансфекции добавляли к клеткам и продолжали культивирование клеток в течение 4-6 ч. В заключение оставшихся 50% общего получаемого объема достигали посредством добавления культуральной среды ExCell® VPRO, не содержащей сыворотку крови. Культивирование клеток продолжали в течение одиннадцати дней после осуществления трансфекции. Культуру собирали посредством центрифугирования при 4500 об./мин в течение 20 мин при 4°C (Heraeus®, Multifuge 3 S-R, Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс). Клеточный супернатант выделяли путем стерилизующего фильтрования через стерикап-фильтр (0,22 мкм) и хранили при 4°C до дополнительной обработки.

Очищение проводили на хроматографической системе "АКТА 100 explorer Air" при 4°C в камере охлаждения с применением свежепродезинфицированной колонки (0,25 М NaOH) HiTrap ProtA MabSelect®SuRe объемом 5 мл. Колонку тщательно уравнивали с 5 CV PBS (Gibco, Life Technologies, Карлсблад, Калифорния) и затем загружали супернатант, который подвергали стерилизующему фильтрованию (2 л), при 4,0 мл/мин. Колонку промывали посредством 8 CV PBS, чтобы элюировать несвязанный образец, и снова промывали посредством 5 CV PBS. Антитело элюировали посредством 5 CV 50 Мм цитрата, 70 Мм NaCl при pH 3,2. Элюат собирали во фракции, составляющие 3 мл; фракции объединяли в пул и регулировали до pH 7 посредством 1 М Трис-HCl, pH 10. Пулы объединяли и подвергали стерилизующему фильтрованию (Millipore Steriflip, 0,22 мкм), OD 280 нм измеряли посредством спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop), а концентрацию белка рассчитывали на основе данных о последовательностях. Элюат тестировали на предмет агрегации (SEC-MALS) и чистоту (SDS-PAGE, LAL и MS). Если необходимо, для второй стадии очищения пулы после первого очищения загружали в свежепродезинфицированную (0,5 М NaOH) SPX марки (Hi Load 16/60 Superdex 200 объемом 120 мл (GE-Healthcare)). Колонку уравнивали посредством PBS и прогоняли посредством буфера PBS при 1 мл/мин, элюат собирали во фракции, составляющие 1,2 мл, и проводили анализ, как описано для первой стадии очищения.

Соответственно получали три гуманизированные варибельные области тяжелой цепи; VH1, VH3 и VH5, как освещено в табл. 5.

Таблица 5

Варибельные области тяжелой цепи	
Варибельная область тяжелой цепи	Перечень последовательностей
VH1	SEQ ID NO: 7
VH3	SEQ ID NO: 9
VH5	SEQ ID NO: 17

Также получали три гуманизированные варибельные легкие (каппа)-области VK1, VK2 и VK3, как освещено в табл. 6.

Таблица 6

Варибельные области легкой цепи	
Варибельная область легкой цепи	Перечень последовательностей
VK1	SEQ ID NO: 25
VK2	SEQ ID NO: 27
VK3	SEQ ID NO: 29

Пример 4. Гуманизация с исправленной структурой.

С применением кристаллической структуры NARA1/hIL-2, полученной в примере 2, улучшали схему гуманизации.

Рассчитывали степень идентичности между исходными гуманизированными последовательностями

из примера 3 и ближайшей зародышевой линией. Отдельно рассчитывали изоэлектрическую точку (pI) для тяжелых и легких цепей. Результаты показаны в табл. 7 и ниже.

Таблица 7

Варибельная область	pI тяжелой цепи	pI тяжелой цепи улучшенной версии	pI легкой цепи	pI легкой цепи улучшенной версии
VH1	9,3	9,4		
VH3	9,4	9,4		
VH5	9,3	9,4		
VK1			5,3	6,6
VK2			4,7	4,6
VK3			4,7	5,0

Таблица 8

Сравнение варибельных областей и варибельных областей зародышевой линии

Варибельная область	% ID (% подобия) VH/VL, зародышевая линия	% ID (% подобия) VH/VL, улучшенная зародышевая линия
VH1	85% (89%)	89% (90%)
VH3	77% (84%)	85% (88%)
VH5	86% (91%)	89% (91%)
VK1	85% (90%)	89% (93%)
VK2	82% (93%)	84% (93%)
VK3	83% (87%)	86% (89%)

На основе этих данных принимали решение улучшать структуры VH3 и VK3, что привело к последовательностям, которые получали, как освещено в табл. 9. Выбирали VH3, поскольку последовательность зародышевой линии, улучшенной посредством применения информации о структуре, способствует увеличению % идентичности с матрицей человека от 77 до 85%.

VK3 выбирали благодаря увеличению pI от 4,7 до 5,0. (Значение для VK1 уже составляет 5,3, а значение pI для VK2 не собирались увеличивать посредством применения информации о структуре, следовательно, принимали решение в пользу VK3.)

Таблица 9

Варибельные области с улучшенной структурой

Варибельная область легкой цепи	Перечень последовательностей
VK3	SEQ ID NO: 34
Варибельная область тяжелой цепи	
VH3	SEQ ID NO: 15

На основе данных шести варибельных тяжелых и легких областей получали девять антител с применением Fc-домена IgG1 человека с точковой мутацией N297A, как представлено под SEQ ID NO: 103, в соответствии с обзором в табл. 10.

Таблица 10

Антитело	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID варибельной области легкой цепи	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID варибельной области тяжелой цепи
104341	VK1	SEQ ID NO: 25	VH1	SEQ ID NO: 7
104343	VK2	SEQ ID NO: 27	VH1	SEQ ID NO: 7
104344	VK3	SEQ ID NO: 34	VH1	SEQ ID NO: 7
104345	VK1	SEQ ID NO: 25	VH3	SEQ ID NO: 15
104346	VK2	SEQ ID NO: 27	VH3	SEQ ID NO: 15
104347	VK3	SEQ ID NO: 34	VH3	SEQ ID NO: 15
104348	VK1	SEQ ID NO: 25	VH5	SEQ ID NO: 17
104349	VK2	SEQ ID NO: 27	VH5	SEQ ID NO: 17
104350	VK3	SEQ ID NO: 34	VH5	SEQ ID NO: 17

Как известно специалисту в данной области техники, для получения дополнительных антител можно применять любой Fc-домен. В частности, предусмотренные Fc-домены не представляют собой модифицированные Fc-домены IgG1 человека в соответствии с SEQ ID NO: 93, IgG2 человека в соответствии с SEQ ID NO: 95, IgG3 человека в соответствии с SEQ ID NO: 97, IgG4 человека в соответствии с SEQ ID NO: 99, Fc IgG1 человека, модифицированного посредством мутации LALA в соответствии с

SEQ ID NO: 101, Fc IgG1 человека, модифицированного посредством мутации N297A в соответствии с SEQ ID NO: 103, Fc IgG1 человека, модифицированного посредством мутации DAPA в соответствии с SEQ ID NO: 105.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления Fc-домен представляет собой домен IgG1 человека в соответствии с SEQ ID NO: 93, и в соответствии с еще более предпочтительным вариантом осуществления Fc-домен представляет собой Fc IgG1 человека, модифицированный посредством мутации N297A в соответствии с SEQ ID NO: 103.

В соответствии со конкретным вариантом осуществления полная последовательность легкой цепи антитела 104343 соответствует SEQ ID NO: 124, а полная последовательность тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO: 126. В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления полная последовательность легкой цепи антитела 104348 соответствует SEQ ID NO: 128, а полная последовательность тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO: 130.

Пример 5. Оптимизация структуры.

С применением кристаллической структуры NARA1/hIL-2, полученной в примере 2, некоторые аминокислотные остатки в CDR идентифицировали с целью дальнейшей оптимизации структуры. В частности, в LCDR1 идентифицировали так называемый DG-сайт и другой DG-сайт в HCDR3. На удивление, некоторые мутации в данных сайтах значительно уменьшают аффинность в отношении IL-2 человека, тогда как другие мутации характеризуются небольшим влиянием или его отсутствием на аффинность.

Структуру комплекса анализировали посредством применения программного обеспечения для моделирования, такого как PyMOL или MOE, а для дополнительной гуманизации выбирали остатки на петлях CDR, которые не находятся в непосредственном контакте с антигеном (т.е. более 4 ангстрем от антигена), чтобы увеличить % идентичности между гуманизированной последовательностью и матрицей человека.

Полученные в результате CDR легкой цепи (каппа) в соответствии с определением Kabat можно найти в табл. 11.

Таблица 11

CDR легкой цепи			
VL	LCDR1	LCDR2	LCDR3
VK1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
VK2	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
VK3	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
VK3	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 21
VK1_D28Q	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
VK1_G29A	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
VK2_D28Q	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
VK2_G29A	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
VK3_D28Q	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
VK3_G29A	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
VK3_D28Q	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 21
VK3_G29A	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 21
Консенсусная последовательность	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 21

Полученные в результате CDR тяжелой цепи в соответствии с определением Kabat можно найти в табл. 12.

Таблица 12

CDR тяжелой цепи

VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
VH1	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3
VH3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3
VH3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 3
VH5	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3
VH1_D98E	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 36
VH1_G99A	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 39
VH1_D98Q	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 42
VH1_D98S	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 45
VH3_D98E	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 36
VH3_G99A	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 39
VH3_D98Q	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 42
VH3_D98S	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 45
VH3_D98E	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 36
VH3_G99A	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 39
VH3_D98Q	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 42
VH3_D98S	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 45
VH5_D98E	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 36
VH5_G99A	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 39
VH5_D98Q	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 42
VH5_D98S	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 45
Консенсусная последовательность	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 121

Мутация D98E VH5 являлась допустимой, в то время как D98S и D98Q, на удивление, являлись недопустимыми. Мутация G99A также являлась допустимой. Для VK1 мутация D28Q являлась допустимой, в то время как мутация G29A, на удивление, являлась недопустимой.

В соответствии с неограничивающей теорией авторов настоящего изобретения замена аминокислоты D98 VH и/или аминокислоты D28 VL на аминокислоты A, G или T также может быть допустимой. Также замена аминокислоты G99 VH или аминокислоты G29 VL на аминокислоты T или S также может быть допустимой.

На основе данных оптимизированных переменных тяжелых и легких областей получали двенадцать оптимизированных антител с применением Fc-домена IgG1 человека с точечной мутацией N297A, а переменные легкие и тяжелые области в соответствии с обзором в табл. 13.

Таблица 13

Оптимизированные антитела

Антитело	Вариабельная область легкой цепи	SEQ ID NO: вариабельной области легкой цепи	Вариабельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO: вариабельной области тяжелой цепи
104341_VH1_VK1D28Q	VK1_D28Q	SEQ ID NO: 70	VH1	SEQ ID NO: 7
104341_VH1D98E_VK1	VK1	SEQ ID NO: 25	VH1_D98E	SEQ ID NO: 37
104341_VH1D98E_VK1 D28Q	VK1_D28Q	SEQ ID NO: 70	VH1_D98E	SEQ ID NO: 37
104343_VH1_VK2D28Q	VK2_D28Q	SEQ ID NO: 79	VH1	SEQ ID NO: 7
104343_VH1D98E_VK2	VK2	SEQ ID NO: 27	VH1_D98E	SEQ ID NO: 37
104343_VH1D98E_VK2 D28Q	VK2_D28Q	SEQ ID NO: 79	VH1_D98E	SEQ ID NO: 37
104348_VH5_VK1D28Q	VK1_D28Q	SEQ ID NO: 70	VH5	SEQ ID NO: 17
104348_VH5D98E_VK1	VK1	SEQ ID NO: 25	VH5_D98E	SEQ ID NO: 49
104348_VH5D98E_VK1 D28Q	VK1_D28Q	SEQ ID NO: 70	VH5_D98E	SEQ ID NO: 49
104349_VH5_VK2D28Q	VK2_D28Q	SEQ ID NO: 79	VH5	SEQ ID NO: 17
104349_VH5D98E_VK2	VK2	SEQ ID NO: 27	VH5_D98E	SEQ ID NO: 49
104349_VH5D98E_VK2 D28Q	VK2_D28Q	SEQ ID NO: 79	VH5_D98E	SEQ ID NO: 49

Как известно специалисту в данной области техники, для получения дополнительных антител можно применять любой Fc-домен. В частности, предусмотренные Fc-домены не представляют собой модифицированные Fc-домены IgG1 человека в соответствии с SEQ ID NO: 93, IgG2 человека в соответствии с SEQ ID NO: 95, IgG3 человека в соответствии с SEQ ID NO: 97, IgG4 человека в соответствии с SEQ ID NO: 99, Fc IgG1 человека, модифицированного посредством мутации LALA в соответствии с SEQ ID NO: 101, Fc IgG1 человека, модифицированного посредством мутации N297A в соответствии с SEQ ID NO: 103, Fc IgG1 человека, модифицированного посредством мутации DAPA в соответствии с SEQ ID NO: 105.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления Fc-домен представляет собой домен IgG1 человека в соответствии с SEQ ID NO: 93, и в соответствии с еще более предпочтительным вариантом осуществления Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1 человека, модифицированный посредством мутации N297A в соответствии с SEQ ID NO: 103.

В соответствии с одним конкретным вариантом осуществления полная последовательность тяжелой цепи антитела 104348_VH5D98E_VK1D28Q соответствует SEQ ID NO: 229, а полная последовательность легкой цепи соответствует SEQ ID NO: 395.

Пример 6. Созревание аффинности.

Гуманизированное NARA1 (104348_VH5D98E_VK1D28Q) применяли в качестве начальной точки для способа созревания аффинности на основе множества стадий, начиная с клонирования и экспрессии родительских VH (SEQ ID NO: 49) и VK (SEQ ID NO: 70) в виде Fab на поверхности дрожжей и определения оптимальных и субоптимальных концентраций связывания биотинилированного Proleukin®.

Вкратце родительские последовательности VH (SEQ ID NO: 49) и VK (SEQ ID NO: 70) или таковые дикого типа (WT) клонировали в виде Fab в вектор дрожжевого дисплея, содержащий последовательность *aga2* в пределах рамки с карбоксильным концом VH и метку на основе 6 аминокислот, полученную из бета амилоида (APP-метки) в пределах рамки с карбоксильным концом легкой цепи. Выявление данной метки позволяет визуализировать уровень экспрессии Fab на поверхности, что хорошо известно специалисту в данной области техники. После электропорации вектора в дрожжах (Benatuil L. et al. (2010). An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. Protein Eng Des Sel., 23(4), p. 155-9.) клетки выращивали в СМ-глюкозном бульоне без урацила. Во время индукции $7,8E+4$ клетки дрожжей, находящиеся в экспоненциальной фазе своего роста, промывали посредством 7 мл питательной среды для индукции (СМ-галактозный бульон без Ura/0,05% глюкозы) и осаждали посредством вращения клеток в течение 10 минут при 4000 об./мин. Осадок повторно суспендировали в питательной среде для индукции ($1E+7$ клеток/мл) и выращивали в течение 16 ч (HR) при 22°C на шейкере. Индуцированные клетки дрожжей ($4E+7$) собирали посредством центрифугирования при 13000 об./мин в течение 1 мин в предварительно охлажденной до 4°C центрифуге. Клетки промывали посредством повторного суспендирования осадка в 1 мл буфера FACS (PBS+0,5% BSA) с последующим центрифугиро-

ванием в течение 1 мин при 13000 об./мин в предварительно охлажденной до 4°C центрифуге. Осадок дрожжей повторно суспендировали в 1 мл буфера FACS и переносили 50 мкл в 12 пробирок, содержащих различные концентрации биотинилированного Proleukin®, разведенного в буфере FACS (0/0,02/0,05/0,15/0,45/1,3/4/12/36/100/333 нМ/1 мкМ). Дрожжи инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (RT) на ротаторе, промывали два раза посредством 1 мл буфера FACS, как описано выше, и повторно суспендировали осадки в 200 мкл буфера FACS, содержащего моноклональное антитело мыши к APP. После 30 мин инкубации при RT на ротаторе дрожжи дважды промывали посредством 1 мл буфера FACS и повторно суспендировали осадки в 200 мкл метящего буфера (аллофикоцианин(АРС)-конъюгированное антитело к антителу мыши, меченное стрептавидином/фикоэритрином (PE)/буфер FACS). После 30 мин инкубации при RT на ротаторе клетки дважды промывали посредством 1 мл буфера FACS и повторно суспендировали в 500 мкл холодного буфера FACS и фильтровали через пробку пробирки FACS. Образцы хранили в темноте до проведения анализа FACS. Стратегию гейтирования анализа FACS выбирали таким образом, что измеряли уровни PE-сигналов (уровень экспрессии Fab на поверхности дрожжей) и APC-сигналов (связывание биотинилированного Proleukin®) отдельных клеток дрожжей (синглетов). Связывание биотинилированного Proleukin® с Fab на поверхности дрожжей можно визуализировать в виде событий на FACS-диаграммах, которые положительны в отношении как PE-сигнала, так и APC-сигнала (данные не показаны). Как и ожидалось, инкубация дрожжей в присутствии высоких концентраций биотинилированного Proleukin® (1 мкМ-12 нМ) привела к выявлению большого количества положительных событий в отношении как PE, так и APC. Данный диапазон концентраций рассматривали как оптимальный диапазон концентраций. Инкубация дрожжей в присутствии 4 и 1,3 нМ биотинилированного Proleukin® привела к подобным уровням PE-сигнала, но существенному снижению уровня APC-сигнала, обозначая, что меньшее количество биотинилированного Proleukin® связывалось с Fab на поверхности дрожжей. Данный диапазон рассматривали как субоптимальный диапазон концентраций. Дрожжи, которые инкубировали в присутствии концентраций биотинилированного Proleukin® ниже 1,3 нМ (0,45/0,15/0,05/0,02 нМ), демонстрировали фоновые уровни APC-сигнала, обозначая, что биотинилированный Proleukin® не связывался с Fab.

На следующей стадии VH (SEQ ID NO: 49) и VK (SEQ ID NO: 70) по отдельности подвергали мутагенезу случайным образом посредством ПЦР пониженной точности (Cadwell R. and Joyce G. (1994), Mutagenic PCR, PCR Methods Appl., 3(6), p. 136-40.) с применением набора для осуществления случайного мутагенеза GeneMorph II (Agilent, № по каталогу 200550). На основании этого получали две библиотеки дрожжей (Benatuil et al., 2010), экспрессирующих или Fab, состоящие из VH (VНр), которые подвергали мутагенезу, спаренных с родительскими VK (VKр) (SEQ ID NO: 70), или Fab, состоящие из VK (VKр), которые подвергали мутагенезу, спаренных с родительскими VH (VНр) (SEQ ID NO: 49). В первом раунде отбора обе библиотеки дрожжей (VНр/VKр и VНр/VKр), так же как и родительские (VНр/VKр) экспрессирующие дрожжи, индуцировали и подвергали окрашиванию FACS (1E+9 VНр/VKр и VНр/VKр: 1E+7 VНр/VKр) с использованием оптимальной концентрации (10 нМ) биотинилированного Proleukin® с применением протокола, описанного выше. По меньшей мере 80000 клеток дрожжей, положительных в отношении как PE, так и APC, сортировали на FACS в пробирке Falcon объемом 15 мл, содержащей 1 мл СМ-глюкозного бульона без урацила. Осуществление данного отбора позволяет осуществить накопление дрожжей, экспрессирующих функциональный Fab на своей поверхности.

После размножения отсортированных согласно FACS дрожжей из первого раунда применяли второй раунд отбора. Дрожжи (1E+7), экспрессирующие VНр/VKр, VНр/VKр и VНр/VKр, инкубировали в отсутствие биотинилированного Proleukin®, 10 нМ биотинилированного Proleukin® (оптимальной концентрации) или 2 нМ биотинилированного Proleukin® (субоптимальной концентрации) и окрашивали согласно FACS, как описано выше. Как отмечали ранее, инкубация дрожжей, экспрессирующих VНр/VKр, в присутствии 10 нМ Proleukin® приводит к выявлению значимого количества положительных событий в отношении как PE, так и APC. Подобный результат получали для библиотеки дрожжей, экспрессирующих VНр/VKр. Причем при данной концентрации APC-сигнал намного сильнее в библиотеке VНр/VKр, тогда как уровни PE-сигналов сравнимы с теми, что наблюдали у дрожжей, экспрессирующих VНр/VKр и VНр/VKр, из чего можно предположить, что большее количество биотинилированного Proleukin® связывается с Fab, экспрессируемыми на поверхности дрожжей. Данная тенденция становится даже более ярко выраженной, если дрожжи инкубировали при субоптимальных концентрациях биотинилированного Proleukin®. При данных условиях как дрожжи, экспрессирующие VНр/VKр, так и дрожжи, экспрессирующие VНр/VKр, демонстрировали низкое количество событий, которые являлись положительными как в отношении PE, так и в отношении APC, тогда как дрожжи, экспрессирующие VНр/VKр, демонстрируют подобные уровни PE, но намного более высокие уровни APC. На основе данных результатов исследований все дрожжи, экспрессирующие библиотеку VНр/VKр, инкубированные в присутствии 2 нМ биотинилированного Proleukin®, положительные в отношении как PE, так и APC, сортировали на FACS, как описано ранее. Такую же процедуру осуществляли в отношении библиотеки дрожжей, экспрессирующих VНр/VKр, инкубированных в присутствии 10 нМ биотинилированного Proleukin®.

После размножения двух библиотек из дрожжей извлекали плазмиды посредством предварительной инкубации осадка дрожжей в присутствии Zymolase (Zymoresearch, № по каталогу E1004) с последующим выделением плазмид с применением центрифужных колонок Mini-prep (Qiagen, № по каталогу 27106). Выделенные плазмиды вводили в бактерии посредством электропорации и выращивали на планшетах с селективными средами. Отдельные колонии собирали и выращивали в течение ночи на 96-луночных планшетах с последующим выделением плазмид с применением Nucleospin 96 Plasmid Core Kit в соответствии с протоколом производителя (Macherey-Nagel, № по каталогу 740616.24). Плазмиды секвенировали и анализировали. Мутации VH обобщены в табл. 14.

Наблюдаемые мутации клонировали в различных комбинациях (табл. 14 для VH SEQ ID No и табл. 15 для VK SEQ ID NO) в векторе экспрессии родительского IgG1 млекопитающего (табл. 16).

Таблица 14

Мутации VH

Обозначение	VH
VH _p /WT (VH5_D98E)	SEQ ID NO: 49
VH-F100dY/N58Y/T30S	SEQ ID NO: 145
VH-F100dY/N58Y	SEQ ID NO: 161
VH-F100dY/T30S	SEQ ID NO: 177
VH-F100dY	SEQ ID NO: 193
VH-N58Y/T30S	SEQ ID NO: 209
VH-N58Y	SEQ ID NO: 225

Таблица 15

Мутации VK

Обозначение	VL
VK _p /WT(VK1_D28Q)	SEQ ID NO: 70
VK-A50S	SEQ ID NO: 243
VK-A50T	SEQ ID NO: 259
VK-M33L/A50S	SEQ ID NO: 275
VK-M33L	SEQ ID NO: 391

Таблица 16

Плазмиды

ID плазмиды	Мутация/Мутации	VH
SP#2764	WT	SEQ ID NO: 49
SP#3563	F100d_Y	SEQ ID NO: 193
SP#3564	N58Y	SEQ ID NO: 225
SP#3569	F100d_Y + N58Y	SEQ ID NO: 161
SP#3566	F100d_Y + T30S	SEQ ID NO: 177
SP#3567	N58Y + T30S	SEQ ID NO: 209
SP#3587	F100d_Y N58Y T30S	SEQ ID NO: 145
ID плазмиды	Мутация/Мутации	VL
SP#2445	WT	SEQ ID NO: 70
SP#3568	M33L	SEQ ID NO: 391
SP#3569	A50S	SEQ ID NO: 243
SP#3570	A50T	SEQ ID NO: 259
SP#3571	M33L + A50S	SEQ ID NO: 275

Впоследствии разрабатывали матрицу для трансфекции плазмид, кодирующих VH и VK либо дикого типа, либо мутированных версий, производящих 35 уникальных антител, как показано в табл. 17. Плазмиды вводили в клетки НЕК293F, растущие на 6-луночных планшетах, с применением Fugene® HD (Promega, № по каталогу E2311) в соответствии с протоколом производителя. Супернатанты собирали через три дня после осуществления трансфекции и определяли титр антител (текущий контроль качества, IPC) в супернатанте с применением белка А/ВЭЖХ (Holenstein F. et al. (2015), Automated harvesting and 2-step purification of unclarified mammalian cell-culture broths containing antibodies. J Chromatogr A., 1418, p. 103-9).

Таблица 17

Первая группа антител

Антитело №:	ID VH-плазмиды	VH-мутации	ID VK-плазмиды	VK-мутации
1	SP#2764	WT	SP#2445	WT
2			SP#3568	M33L
3			SP#3569	A50S
4			SP#3570	A50T
5			SP#3571	M33L + A50S
6	SP#3563	F100d_Y	SP#2445	WT
7			SP#3568	M33L
8			SP#3569	A50S
9			SP#3570	A50T
10			SP#3571	M33L + A50S
11	SP#3564	N58Y	SP#2445	WT
12			SP#3568	M33L
13			SP#3569	A50S
14			SP#3570	A50T
15			SP#3571	M33L + A50S
16	SP#3569	F100d_Y + N58Y	SP#2445	WT
17			SP#3568	M33L
18			SP#3569	A50S
19			SP#3570	A50T
20			SP#3571	M33L + A50S
21	SP#3566	F100d_Y + T30S	SP#2445	WT
22			SP#3568	M33L
23			SP#3569	A50S
24			SP#3570	A50T
25			SP#3571	M33L + A50S
26	SP#3567	N58Y + T30S	SP#2445	WT
27			SP#3568	M33L
28			SP#3569	A50S
29			SP#3570	A50T
30			SP#3571	M33L + A50S
31	SP#3587	F100d_Y + N58Y + T30S	SP#2445	WT
32			SP#3568	M33L
33			SP#3569	A50S
34			SP#3570	A50T
35			SP#3571	M33L + A50S

Последовательности антител изложены в табл. 41 и обобщены в табл. 18 ниже.

Таблица 18

Обзор последовательностей первого набора антител

Антитело	VH	VL	Полноразмерная тяжелая цепь	Полноразмерная легкая цепь
1	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 229	SEQ ID NO: 395
2	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 391	SEQ ID NO: 229	SEQ ID NO: 393
3	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 229	SEQ ID NO: 245
4	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 229	SEQ ID NO: 261
5	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 229	SEQ ID NO: 277
6	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 395
7	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 391	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 393
8	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 245
9	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 261
10	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 277
11	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 395
12	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 391	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 393
13	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 245
14	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 261
15	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 277
16	SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 395
17	SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 391	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 393
18	SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 245
19	SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 261
20	SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 277
21	SEQ ID NO: 177	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 395
22	SEQ ID NO: 177	SEQ ID NO: 391	SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 393
23	SEQ ID NO: 177	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 245
24	SEQ ID NO: 177	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 261
25	SEQ ID NO: 177	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 277
26	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 395
27	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 391	SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 393
28	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 245
29	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 261
30	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 277
31	SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 395
32	SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 391	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 393
33	SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 245
34	SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 261
35	SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 277

Впоследствии эффективность связывания антител hIL-2, которые присутствуют в супернатантах, определяли с применением ELISA. Вкратце планшеты ELISA (96-луночный черный микротитровальный

планшет Maxisorp) покрывали в течение ночи при 4°C с 100 мкл/лунка Proleukin® (5 мкг/мл PBS). Планшеты ELISA один раз промывали с помощью TBST (1×TBS/0,05% Твин 20) с применением устройства для отмывки иммунологических планшетов (BioTek). Планшеты блокировали посредством добавления 350 мкл/лунка блокирующего буфера (TBS/1X казеин (Vector laboratories 10X раствор #SP-5020), фильтрованный через поры размером 0,22 мкм) и инкубировали в течение 2 ч при RT при осторожном перемешивании. После удаления блокирующего буфера планшеты один раз промывали с помощью TBST с применением устройства для отмывки иммунологических планшетов. Супернатанты разводили в соотношении 1:2 в блокирующем буфере и 50 мкл переносили в обозначенную лунку планшета ELISA. Каждый образец присутствовал в трех планшетах ELISA. Три планшета инкубировали при RT при осторожном перемешивании. После 2 ч инкубации один из планшетов три раза промывали с помощью TBST, перед тем как добавляли 100 мкл/лунка детекторного антитела (TBST/поликлональное антитело козы к Fab2 человека, конъюгированное с HRP; Dianova/Jackson ImmunResearch, № по каталогу 109-036-006). Два других планшета промывали либо три раза каждые четыре часа с помощью TBST в течение 4 ч или промывали каждый час три раза в течение 12 ч перед добавлением детекторного антитела. После 1 ч инкубации при RT при осторожном перемешивании планшеты промывали три раза посредством буфера для промывания и использованные планшеты сушили на стопке бумажных салфеток перед добавлением 100 мкл/лунка субстрата BM ChemiLuminescence ELISA (POD) (Roche Diagnostics #11582950001). Сигнал люминесценции измеряли после 5 мин инкубации в темноте. Значения ELISA для 35 антител можно увидеть в табл. 19. Все значения ELISA представляют собой средние значения, основанные на двух измерениях.

Таблица 19

Значения ELISA

Антитело №:	IPC (мг/л)	Нормальное значение ELISA	Промывание 3х каждый час течение 4 часов	Промывание 3х каждый час в течение 12 часов
1	3,89	1182	1063	717
2	3,34	1355	1231	518
3	4,75	4496	4580	1313
4	4	2175	1987	705
5	4,17	4974	4490	873
6	2,77	5849	5115	1732
7	2,7	7638	6360	1553
8	2,75	9373	7314	2533
9	2,1	1944	1427	686
10	2,3	6047	4433	1630
11	3,78	12391	10500	3498
12	4,15	20047	17398	5960
13	3,17	14541	14591	4524
14	2,86	7181	7203	2538
15	2,71	11086	10494	3796
16	2,14	10215	9814	2277
17	1,85	3048	2815	1141
18	1,91	8060	7319	3656
19	1,89	5402	4875	2208
20	1,93	11719	11055	5200
21	2,15	2195	1839	892
22	2,27	3972	3188	1204
23	2,39	6168	4635	1248
24	2,06	2772	1877	674
25	2,16	3574	3050	1084
26	2,74	4029	4212	1800
27	3,01	7755	6997	2770
28	3,27	18459	18060	5872
29	2,65	6954	6848	2724
30	2,8	14920	14375	2803
31	2,06	11389	10263	3403
32	1,9	7187	6211	3332
33	1,82	3988	3566	1823
34	1,84	3857	3077	1362
35	1,82	4914	4045	1789

Большая часть введенных мутаций (например, антитело № 8/11/12/13/15/16/20/28/30/31) демонстрировала подобные или более низкие титры по сравнению с родительским антителом (антитело № 1), но значительно улучшила эффективность связывания. Даже после 12 ч чрезмерного промывания некоторые мутанты все еще демонстрировали высокий уровень связывания (например, антитело № 12/13/15/20/28). Чтобы ранжировать различные антитела супернатанты серийно разводили и аффинность связывания определяли посредством ELISA.

Значения EC₅₀ рассчитывали с применением титров, определенных посредством белка А/ВЭЖХ, в

соответствии со стандартными способами, хорошо известными специалисту в данной области техники. Результаты обобщены в табл. 20.

Таблица 20

Значения EC ₅₀			
Антитело №:	VH-мутации	VK-мутации	Клеточные супернатанты EC ₅₀ (нМ)
1	WT	WT	1,04
2		M33L	0,79
3		A50S	0,51
4		A50T	0,73
5		M33L + A50S	0,50
6	F100d_Y	WT	0,34
7		M33L	0,31
8		A50S	0,24
9		A50T	0,50
10	M33L + A50S	0,35	
11	N58Y	WT	0,34
12		M33L	0,25
13		A50S	0,19
14		A50T	0,36
15	M33L + A50S	0,28	
16	F100d_Y + N58Y	WT	0,38
17		M33L	1,39
18		A50S	0,54
19	A50T	0,50	
20		M33L + A50S	0,27
21	F100d_Y + T30S	WT	0,65
22		M33L	0,43
23		A50S	0,26
24		A50T	0,59
25		M33L + A50S	0,42
26	N58Y + T30S	WT	0,49
27		M33L	0,39
28		A50S	0,16
29		A50T	0,24
30	M33L + A50S	0,22	
31	F100d_Y + N58Y + T30S	WT	0,39
32		M33L	0,65
33		A50S	0,67
34		A50T	0,65
35		M33L + A50S	0,72

На основе эффективности связывания и представлении мутации выбирали набор из 7 антител (табл. 21), обеспечивали экспрессию и очищали (Hollenstein et al., 2015) и дополнительно характеризировали.

Таблица 21

Выбранные антитела			
Антитело №:	VH-мутации	VK-мутации	Обозначение
8	F100d_Y	A50S	108923
12	N58Y	M33L	108924
13	N58Y	A50S	108925
15	N58Y	M33L + A50S	108926
20	F100d_Y + N58Y	M33L + A50S	108928
26	N58Y + T30S	WT	108929
28	N58Y + T30S	A50S	108930

Последовательности выбранных антител изложены в табл. 41 и обобщены в табл. 22 ниже.

Таблица 22

Обзор последовательностей выбранных антител

Антитело	VH	VL	Полноразмерная тяжелая цепь	Полноразмерная легкая цепь
108923	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 245
108924	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 391	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 393
108925	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 245
108926	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 277
108928	SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 277
108929	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 261
108930	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 277

Пример 7. Аффинность связывания 1. Ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA).

ELISA, хорошо известный специалисту в данной области техники, применяли чтобы подвергнуть кандидатов скринингу.

Планшеты ELISA (Corning) покрывали IL-2 человека (Proleukin®) при 10 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 6 раз с помощью PBST, затем блокировали в 1% BSA/PBST в течение 2 ч. После блокирования и промывания антитела к IL-2 человека добавляли на планшет в 11-точечной серии разведений в 1% BSA/PBST и инкубировали в течение 2 ч. После этого планшеты снова промывали с последующей инкубацией с детекторными антителами, или с биотинилированными антителами к IgG мыши (NARA1), или биотинилированными антителами к IgG человека (гуманизированные антитела) в разведении 1:10'000 в 1% BSA/PBST в течение 2 ч. Планшеты затем снова промывали и инкубировали с конъюгатом пероксидазы хрена и стрептавидина в 1% BSA/PBS в течение 45 мин. После промывания субстрат (системы R&D) добавляли в планшеты и ферментативную реакцию останавливали после 3 мин посредством добавления останавливающего раствора. Планшеты считывали посредством считывателя микропланшетов при 450 нм с коррекцией длины волны, установленной на 540 нм.

Весь процесс проводили при комнатной температуре.

Среднее значение 3 независимых экспериментов с участием ELISA можно найти в табл. 23.

2. Анализ равновесного титрования раствора (SET).

Анализ SET, хорошо известный специалисту в данной области техники, проводили для определения и сравнения аффинности (K_D) пяти гуманизированных антител к IL-2 и антитела к IL-2 (NARA1) - IgG2a мыши к белку IL-2.

Анализ равновесного титрования раствора (SET) позволяет определить аффинность (K_D) взаимодействия антитело-антиген для прочно связывающих веществ. Данная методика не требует иммобилизации или маркировки партнера по взаимодействию и является подходящей для сильных взаимодействий (K_D от пМ до низкого нМ диапазона).

Смеси антител постоянной концентрации (концентрации при ожидаемом K_D или ниже) совместно инкубировали с антигеном в пределах подходящего диапазона концентраций (значительно ниже и значительно выше K_D) до достижения равновесия. Количество свободных сайтов связывания антитела определяли посредством переноса смесей на покрытые антигеном планшеты и короткой инкубации. Свободное антитело, следовательно, связывалось с планшетом и обнаруживалось посредством детекторного антитела. Полученный сигнал наносили на график в зависимости от концентрации антигена. K_D точно определяли посредством построения нелинейной кривой.

(1) Материалы и способы.

Использовали следующие антитела:

антитело к IL-2 (NARA1)-mIgG2a: 8,7 мг/мл, 150 кДа, 58,00 мкМ;

антитело к IL-2-hsIgG1 104340 (гибридное антитело NARA1): 4,25 мг/мл, 150 кДа, 28,33 мкМ;

антитело к IL-2-hsIgG1 104343: 3,69 мг/мл, 150 кДа, 24,60 мкМ;

антитело к IL-2-hsIgG1 104347: 4,03 мг/мл, 150 кДа, 26,87 мкМ;

антитело к IL-2-hsIgG1 104348: 2,71 мг/мл, 150 кДа, 18,07 мкМ;

антитело к IL-2-hsIgG1 104349: 3,29 мг/мл, 150 кДа, 21,93 мкМ.

Антигены:

IL-2 (Proleukin®): 1,00 мг/мл, 15,33 кДа, 65,24 мкМ;

IL-2 (WT): 0,15 мг/мл, 15,55 кДа, 9,65 мкМ.

Детекторные антитела:

меченное MSD Sulfo-tag козье антитело к антителу человека, Meso Scale Discovery, № по каталогу R32AJ-5;

меченное MSD Sulfo-tag козье антитело к Ig мыши, Jackson IR, № по каталогу 115-005-071.

Инструменты и программное обеспечение:

MSD SECTOR Imager 6000, управляемый посредством программного обеспечения Discovery Workbench;

обработка данных посредством XLfit, расширительного ПО MS Excel.

Планшеты для анализа:

стандартный 384-луночный планшет для SECTOR Imager 6000, Meso Scale Discovery, № по каталогу L21XA;

полипропиленовый 384-луночный планшет, Greiner, № по каталогу 781280.

Реагенты:

альбумин бычьей сыворотки (BSA), VWR, № по каталогу 422351S;

фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) 10×, Teknova, № по каталогу P0195;

буфер считывания MSD T 4×, Meso Scale Discovery, № по каталогу R92TC-1;

трис-буферизированный солевой раствор (TBS) 20×, Teknova, № по каталогу T1680;

твин-20, VWR, № по каталогу 437082Q.

Буферы:

блокирующий буфер: 1×PBS+5 вес./об.% BSA;

покрывающий буфер: 1×PBS;

буфер для образца: 1×PBS+0,5 вес./об.% BSA+0,02 об.% Твин-20;

буфер для промывания: 1×TBS+0,05 об. % Твин-20;

буфер для считывания: 1×буфер для считывания MSD.

22-Серийное 2n разведение антигена готовили в буфере для образца. Добавляли антитело с постоянной концентрацией. Концентрации антигена и антитела перечислены ниже. Объем 60 мкл каждой смеси антиген:антитело распределяли в двух повторностях в 384-луночный полипропиленовый микротитровальный планшет (PP MTP). Буфер для образца служил в качестве негативного контроля и образец, не содержащий антиген, в качестве положительного контроля (B_{max}). Планшет запечатывали и инкубировали в течение ночи (o/n) при комнатной температуре (RT).

384-Луночный стандартный планшет MSD Argaу покрывали o/n с помощью 2 мкг/мл IL-2. После трехкратного промывания с помощью буфера для промывания планшет блокировали посредством 50 мкл/лунка блокирующего буфера в течение 1 ч при RT. После промывания объем 30 мкл/лунка смеси антиген:антитело переносили с PP MTP в покрытый планшет MSD и инкубировали в течение 20 мин при RT.

После дополнительной стадии промывки 30 мкл детекторного антитела (разбавленное в соотношении 1:2000) в буфере для образца добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 30 мин при RT. Планшет MSD промывали, и добавляли 35 мкл/лунка буфера для считывания, и инкубировали в течение 5 мин. Сигналы ECL измеряли посредством MSD SECTOR Imager 6000.

(2) Результаты.

Результаты анализа SET можно найти в табл. 23. Все тестируемые антитела к IL-2 показывали положительную аффинность к белкам IL-2 в низком пМ диапазоне (IL-2 wt не показан).

Таблица 23

Данные по аффинности связывания

Антитело	EC50 ELISA (нМ)	из IL-2	Kd из анализа SET (нМ)
NARA1	0,3		0,078
104341	0,4		
104343	0,3		0,075
104344	0,7		
104345	2,9		
104346	1,7		
104347	39		10
104348	0,3		0,105
104349	0,3		0,082
104350	0,8		
104343_VH1_VK2D28Q	0,59		0,069
104343_VH1D98E_VK2	0,57		0,098
104343_VH1D98E_VK2D28Q	0,75		0,111
104348_VH5_VK1D28Q	0,97		0,155
104348_VH5D98E_VK1	0,77		0,206
104348_VH5D98E_VK1D28Q	1,18		0,272
104349_VH5_VK2D28Q	0,43		0,069
104349_VH5D98E_VK2	0,56		0,178
104349_VH5D98E_VK2D28Q	0,66		0,188
108923	0,05		
108924	0,11		
108925	0,06		
108926	0,05		
108928	0,71		
108929	0,15		
108930	0,06		

Как можно увидеть в табл. 23, большая часть гуманизированных антител имеет подобную аффинность связывания с IL-2 человека, как NARA1. Однако, на удивление, некоторые гуманизированные антитела имеют более низкую аффинность связывания, что соответствует 104347.

Пример 8. Оценка комплекса hIL-2/mAb к IL-2 in vitro.

Активность гуманизированных антител к IL-2 сравнивали с NARA1 в анализе пролиферации в отношении полученных из РВМС CD8 Т клеток.

CD8 Т-клетки человека, выделенные путем отрицательного разделения в магнитном поле, после очищения от лейкоцитарной пленки посредством центрифугирования в градиенте плотности Фикола высеивали при 100000 клеток/лунка в полную среду RPMI, дополненную 5% сывороткой крови человека. Клетки стимулировали в течение 48 ч при 37°C с помощью антитела к IL-2 (0,5 мкг/мл) в отдельности или с IL-2 (Proleukin®; 0,1 мкг/мл) плюс антитела к IL-2 антитела (0,5 мкг/мл) при молярном соотношении 2:1. Клетки активировали в течение последних 16 ч с помощью 3H-тимидина, собирали и измеряли уровень пролиферации посредством β-счетчика. Эксперимент выполняли в трех повторностях, и количества антител в отдельности были эквивалентны уровню фонового сигнала не стимулированных клеток.

Таблица 24

Данные по пролиферации клеток CD8 Т

Антитело	Включения тимидина [H3] (импульсов в мин.) Антитело (0,5мкг/мл)	Включения тимидина [H3] (импульсов в мин.) Proleukin® (0,1мкг/мл) + антитело (0,5мкг/мл) Молярное соотношение 2:1
NARA1	453	2766
104340	491	3363
104341	671	3463
104343	639	3457
104344	532	3799
104345	577	4874
104346	626	4607
104347	645	4636
104348	543	3360
104349	560	3348
104350	653	3974

Как показано в табл. 24, большая часть гуманизированных антител имеет способность, подобную способности NARA1, в отношении индукции пролиферации клеток CD8 Т человека in vitro.

В альтернативном способе активность некоторых гуманизированных антител к IL-2 оценивали в

7-дневном анализе пролиферации в отношении полученных из PBMC CD8 T-клеток и NK-клеток человека.

PBMC человека, очищенные от лейкоцитарных пленок посредством центрифугирования в градиенте плотности Фиколла, подвергали отрицательному отбору с использованием магнитного носителя для выделения CD8⁺ T-клеток и NK-клеток. Клетки помечали посредством набора CellTrace Violet Proliferation и высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном при 50000 клеток/луночка в среде RPMI 1640, дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки. Клетки стимулировали посредством hIL-2 или комплекса hIL-2/mAb к IL-2 (при молярном соотношении 2:1, 10-кратном серийном разведении) и инкубировали в течение 7 дней при 37°C. Пролиферацию оценивали посредством включения CellTrace Violet, измеренного посредством FACS. Эксперимент выполняли в трех повторностях и средние значения EC₅₀ рассчитывали из 2 независимых экспериментов.

Таблица 25

Данные по пролиферации CD8 T-клеток и NK-клеток

Комплекс IL-2/антитела к IL-2	Значения EC ₅₀ пролиферации hCD8 T-клеток (нМ)	Пролиферация hNK-клеток EC ₅₀ (нМ)
Только Proleukin®	3,5	0,3
Proleukin® / 104343_VH1D98E_VK2D28Q	8,1	0,5
Proleukin® / 104348_VH5D98E_VK1D28Q	9,2	0,5
Proleukin® / 104349_VH5D98E_VK2D28Q	6,9	0,4
Proleukin® / 108923	19,1	1,6
Proleukin® / 108924	18,5	1,6
Proleukin® / 108925	12,1	1,1
Proleukin® / 108926	14,8	1,1
Proleukin® / 108929	11,9	0,8
Proleukin® / 108930	12,1	1,0

Пример 9. Оценка комплекса hIL-2/mAb к IL-2 in vivo.

Количества CD8⁺ T-клеток, CD4⁺ T-клеток и NK-клеток определяли у мышей C57BL/6 WT, получающих комплекс IL-2/mAb к IL-2, как описано ниже. Параллельно оценивали уровни пролиферации CD8⁺ T-клеток и NK-клеток с применением бромдезоксисуридина (BrdU).

(1) Материалы и способы.

Использовали следующие антитела: 104340 (гибридное антитело NARA1), 104343, 104347, 104348, 104349, 104341.

Использовали IL-2 Proleukin®.

Данный эксперимент проводили в двух повторностях; в первый раз гуманизированные 104341 не включали.

Мыши получали 4 последовательных инъекции hIL-2 в количестве 1,5 мкг (низкая доза; LD), или 20 мкг (высокая доза; HD), или hIL-2/моноклональное антитело (1,5 и 15 мкг соответственно, что соответствует молярному соотношению 1:1). В день последней инъекции 5-бromo-2'-дезоксисуридин (BrdU) давали в составе питьевой воды при концентрации 0,8 мг/мл в течение 24 ч. На следующий день мышей умерщвляли и анализировали селезенки и лимфоузлы (LN) посредством проточной цитометрии. Для этого подготавливали суспензии отдельных клеток LN и селезенки в соответствии со стандартными протоколами и 2×10⁶ клеток окрашивали для анализа с помощью проточной цитометрии с применением PBS с 2% фетальной телячьей сыворотки (FCS), 2 mM EDTA и флуорохром-конъюгированными антителами (см ниже).

Проводили два разных окрашивания. Первое окрашивание проводили для идентификации и количественного определения регуляторных CD4⁺CD25⁺ forkhead box P3 (FoxP3)⁺ T-клеток. В связи с этим суспензии отдельных клеток окрашивали с применением буфера для окрашивания FoxP3, следуя рекомендациям поставщика (eBiosciences, 00-5523-00), а также с применением флуорохром-конъюгированных антител к следующим маркерам: CD25, CD8a, CD4, CD3, FoxP3.

Второе окрашивание проводили для идентификации и количественного определения уровня пролиферации конкретных подгрупп иммунных клеток, при этом флуорохром-конъюгированное антитело к BrdU использовали для окрашивания клеток, которые пролиферировали. Окрашивание BrdU проводили с применением набора FITC BrdU, следуя рекомендациям поставщика (BD Pharmingen, 51-2354 AK), а также с применением флуорохром-конъюгированных антител к следующим маркерам: CD44, CD8a, CD4, NK1.1, CD3, CD122, BrdU.

Данные собирали с применением проточного пипетметра Becton Dickinson LSR Fortessa, хорошо из-

вестного специалисту в данной области техники.

(2) Результаты.

Результаты на основе данных количества клеток показаны в табл. 26 и 27.

Таблица 26

Данные количества клеток

	Количества клеток ($\times 10^6$)					
	CD3 ⁺ CD8 ⁺		CD3 ⁺ CD4 ⁺		CD3 ⁺ NK1.1 ⁺	
IL-2 LD	13,41994	11,89759	19,95176	16,30791	2,042918	1,484522
IL-2/104340	23,41843	25,82988	11,81956	11,59474	5,065738	5,448658
IL-2/104343	14,45484	20,53916	18,5848	15,89161	5,286026	7,333515
IL-2/104347	13,79718	14,83423	18,27195	21,03542	2,442164	2,597084
IL-2/104348	23,68391	28,30016	14,75169	19,55284	7,37502	10,09379
IL-2/104349	21,18129	24,34502	16,2933	14,88262	5,719003	11,14665
IL-2/104341	27,68841	25,55466	19,12686	18,45614	13,83036	9,069159
IL-2 HD	21,4074	15,66434	27,66495	19,26853	5,97563	3,492621
PBS	8,776036	11,32218	12,99657	14,99693	0,730655	1,437321

Таблица 27

Данные количества клеток

	Количества клеток ($\times 10^6$)			
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺		CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	
IL-2 LD	1,599656	1,169533	1,701715	1,612555
IL-2/104340	14,98077	17,97501	3,949957	3,390384
IL-2/104343	3,928826	7,53171	2,086871	3,359948
IL-2/104347	2,127526	1,809776	2,563509	2,514805
IL-2/104348	12,50984	12,61338	4,282856	4,927512
IL-2/104349	7,286364	3,648101	3,578653	3,063865
IL-2/104341	12,83635	11,69892	5,273673	4,708051
IL-2 HD	4,964377	3,648225	7,348498	4,172373
PBS	0,581851	1,25563	0,802762	1,019274

Как можно увидеть в табл. 26 и 27, антитела 104343, 104347, 104348, 104349 и 104341 в комплексе с IL-2 могут стимулировать CD8 и NK-клетки *in vivo*.

Также на фиг. 6 показано количество иммуноцитов, полученных в селезенке мыши. Нанесенные на график значения представлены в табл. 23 и 24. На фиг. 7 показаны характерные BrdU профили CD8⁺CD44⁺CD122⁺ Т-клеток в селезенке мыши. На фиг. 8 показаны характерные BrdU профили CD3⁺NK1.1⁺ NK-клеток в селезенке мыши.

Исходя из данных результатов можно сделать вывод, что гуманизированные антитела 104343, 104348, 104349 и 104341, подобные гибриднему антителу NARA1 104340 в комбинации с IL-2, способны предпочтительно стимулировать CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки. Это не относится к гуманизованному антителу 104347.

Пример 10. Получение слитого белка IL-2/mAb к IL-2 с применением линкера.

С применением кристаллической структуры NARA1/hIL-2, полученной в примере 2, идентифицировали пути соединения N-терминальных областей тяжелых и легких цепей NARA1 с hIL-2.

Структуру комплекса анализировали посредством применения программного обеспечения для моделирования, такого как PyMOL или MOE, и наблюдали, что C-терминальный конец hIL-2 находится на противоположной стороне антигенсвязывающего сайта антитела. Таким образом, для соединения необходимы линкеры. Полученный слитый белок состоит из IL-2, следующей за ним линкерной области, следующей за ней области тяжелой цепи антитела. Линкерная область должна покрывать расстояние, которое составляет по меньшей мере 60 ангстрем (Å). Таким образом, можно создавать и тестировать разные длины линкеров, а также композиции для оптимального соединения.

Слитая молекула также может представлять собой IL-2, следующий за ним линкер, следующую за ним легкую цепь антитела. При таком типе слияния линкерная область должна покрывать расстояние, которое составляет по меньшей мере 50 ангстрем (Å). Таким образом, при этом способе также можно

создавать и тестировать несколько длин линкеров и композиции, чтобы найти оптимальных кандидатов.

Последовательность тяжелой или легкой цепи антитела может являться любой из последовательностей антител, которые получали с применением Fc-домена IgG1 человека, как представлено под SEQ ID NO: 93, и варибельных доменов, как сообщается в табл. 10.

Последовательность IL-2 может представлять собой IL-2 wt, представленную под SEQ ID NO: 109, или альдеслейкин, представленный под SEQ ID NO: 110.

Линкерные последовательности, которые можно применять для соединения C-терминального конца IL-2 и N-терминального остатка легких или тяжелых цепей антитела, приведена в табл. 28.

Таблица 28

Примеры длины линкера и композиции

Линкер	ID последовательности
(G4S)3	SEQ ID NO: 397
(G4S)4	SEQ ID NO: 398
(G4S)5	SEQ ID NO: 399
(G4S)6	SEQ ID NO: 400
(G4S)7	SEQ ID NO: 401
(G4S)8	SEQ ID NO: 402
(G4S)9	SEQ ID NO: 403
(G3S)4	SEQ ID NO: 404
(G3S)5	SEQ ID NO: 405
(G3S)6	SEQ ID NO: 406
(G3S)7	SEQ ID NO: 407
(G3S)8	SEQ ID NO: 408
(G3S)9	SEQ ID NO: 409
(G3S)10	SEQ ID NO: 410
(G3S)11	SEQ ID NO: 411

В соответствии с табл. 29 получали два специфических слитых белка.

Таблица 29

Слитые белки

Обозначение	IL-2	Линкер	mAb
107348	Альдеслейкин	(G4S)5, 25 aa	VH5_D98E_VK1_D28Q-hIgG1
107350	Альдеслейкин	(G4S)7, 35 aa	VH5_D98E_VK1_D28Q-hIgG1

Пример 11. Получение слитого белка IL-2/mAb к IL-2.

Структуру комплекса NARA1/hIL-2 применяли с целью направлять внедрение IL-2 в тяжелую или легкую цепь антитела NARA1. LCDR1 антитела и область, соединяющую спираль hIL-2 В и спираль С между остатками K96 и N97, можно идентифицировать как области, которые будут применять для дальнейшей разработки. LCDR1 открывали между Y27d и D28 и между G29 и D30, нумеруя согласно определению Kabat. hIL-2 открывали между K96 и N97. См. фиг. 9.

Остатки D28G29 из LCDR1 антитела заменяли на Gs. N97 нового N-терминального конца hIL-2 соединяют посредством GGG-линкера с новым C-терминальным концом Y27d LCDR1. C-терминальный конец K96 hIL-2 соединяют посредством GGG-линкера с N-терминальным D30 LCDR1. См. фиг. 10. Два исходных N- и C-терминальных конца hIL-2 соединяли вместе, т.е. C-терминальный остаток IL-2-T153 непосредственно сливаются с N-терминальным остатком P22 IL-2. Фиг. 11 представляет собой схематический обзор того, как последовательности VL IL-2 и антитела сливались вместе.

Полученный слитый белок обозначали 107351.

Данная разработанная процедура позволила hIL-2 полностью внедриться в легкую цепь антитела NARA1. Данное внедрение можно выполнять посредством применения любой из гуманизированных последовательностей, как сообщается в табл. 10. Последовательность и длина линкера, применяемые для внедрения hIL-2 в легкую цепь, могут представлять собой повторение 1-10 глицинов (G), также может быть протестировано слияние, в котором Y27d LCDR1 и N97 hIL-2, D30 LCDR1 и K96 hIL-2 непосредственно связаны без какой-либо линкерной последовательности между ними. Нумерация hIL-2 относится к полноразмерной последовательности, как сообщается в SEQ ID NO: 109. Соответствующие остатки в альдеслейкине, представленные SEQ ID NO: 110, также могут применяться для процедуры внедрения.

Пример 12. Активность слитого белка IL-2/mAb к IL-2.

Активность некоторых слитых белков IL-2/mAb к IL-2 оценивали в 7-дневном анализе пролиферации в отношении полученных из PBMC CD8 T-клеток и NK-клеток человека.

PBMC человека, очищенные от лейкоцитарных пленок посредством центрифугирования в градиенте плотности Фиколла, подвергали отрицательному отбору с использованием магнитного носителя для выделения CD8⁺ T-клеток и NK-клеток. Клетки помечали посредством набора CellTrace Violet Proliferation и высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном при 50000 клеток/луночка в среде RPMI 1640, дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки. Клетки стимулировали посредством hIL-2 или ком-

плекса hIL-2/mAb к IL-2 (при молярном соотношении 2:1, 10-кратном серийном разведении) и инкубировали в течение 7 дней при 37°C. Пролиферацию оценивали посредством включения CellTrace Violet, измеренного посредством FACS. Эксперимент выполняли в трех повторностях и средние значения EC₅₀ рассчитывали из 3 независимых экспериментов, как показано в табл. 30.

Таблица 30

Данные по пролиферации CD8 Т-клеток и NK-клеток

Слитый белок на основе IL-2/mAb к IL-2	Средние значения EC ₅₀ пролиферации hCD8 Т-клеток (нМ)	Пролиферация hNK-клеток Среднее значение EC ₅₀ (нМ)
Только Proleukin®	3,24	0,34
107348 [L25=(G4S)5]	>100	8,72
107350 [L35=(G4S)7]	>100	2,21
107351 [LCDR1, привитая]	3,79	0,15

Слитые белки на основе IL-2/mAb к IL-2 с применением линкерных последовательностей из 25 или 35 остатков ограничивали активность пролиферации NK-клеток и CD8 Т-клеток соответственно. Напротив, слитый белок на основе IL-2/mAb к IL-2, привитый к легкой цепи гуманизированного антитела NARA1, также активен как IL-2 в отдельности для активации пролиферации CD8 Т-клеток и более активен, чем IL-2 для стимуляции пролиферации NK-клеток.

Данный последний слитый белок впоследствии оценивали *in vivo*. Мыши получали одну разовую дозу 107351 (360, 720 или 1440 мкг/кг) или PBS, и их умерщвляли через 96 ч после инъекции. Спленциты анализировали посредством проточной цитометрии в соответствии со стандартными протоколами, и результаты обобщены в табл. 31.

Таблица 31

Количества CD8 Т-, NK- и Treg-клеток

Реагент	Среднее количество CD8+CD44+ Т-клеток (10 ⁶)	Среднее количество CD3-NK1.1+ NK-клеток (10 ⁶)	Среднее количество CD4+CD25+FoxP3+ Treg-клеток (10 ⁶)
PBS	1,5	1,3	0,5
107351 (360 мкг/кг)	41,5	17,3	1,1
107351 (720 мкг/кг)	57,2	24,8	1,5
107351 (1440 мкг/кг)	65,5	26,3	2,6

Слитый белок 107351 может включать в зависимости от дозы, стабильное размножение CD8⁺ и NK-клеток с сильно ограниченной активацией регуляторных Т-клеток *in vivo*.

Пример 13. Оценка комплекса hIL-2/mAb к IL-2 *in vivo* (гуманизированные антитела и гуманизированные антитела с созревшей аффинностью к hIL-2).

Чтобы оценить эффект комплекса hIL-2/mAb к IL-2 *in vivo*, выполняли два экспериментальных подхода. В первом из них определяли количества CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток и NK-клеток у мышей C57BL/6 WT, которые получали две инъекции комплекса hIL-2/mAb к IL-2, как описано ниже. Во втором эксперименте уровни пролиферации CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток и NK-клеток оценивали, применяя BrdU после одной разовой инъекции комплексов на основе hIL-2/mAb к IL-2.

(1) Материалы и способы.

Использовали следующие антитела: NARA1, 104348, 106260, 108923, 108924, 108925, 108926, 108929 и 108930.

Использовали IL-2 Proleukin®.

В первом эксперименте мыши получали 2 инъекции в дни 1 и 3 hIL-2 при 1,5 мкг и hIL-2/моноклональное антитело (15 мкг, в соответствии с молярным соотношением 1:1). На 5-й день мышей умерщвляли и анализировали селезенки и лимфоузлы (LN) посредством проточной цитометрии. Для этого подготавливали суспензии отдельных клеток LN и селезенки в соответствии со стандартными протоколами и 2-3×10⁶ клеток окрашивали для анализа посредством проточной цитометрии, применяя PBS с 2% фетальной телячьей сыворотки (FCS), 2 мМ EDTA и флуорохром-конъюгированными антителами. Окрашивание проводили для идентификации и количественного определения регуляторных CD4⁺CD25⁺ forkhead box P3 (FoxP3)⁺ Т-клеток (Treg). В связи с этим суспензии отдельных клеток окрашивали с применением буфера для окрашивания FoxP3 и следуя рекомендациям поставщика (eBiosciences, 00-5523-00), а также с применением флуорохром-конъюгированных антител к следующим маркерам: CD25, CD8a, CD44, CD122, NK1.1, DX5, CD4, CD3, FoxP3.

Во втором эксперименте мыши получали одну разовую инъекцию hIL-2 при 1,5 мкг и hIL-2/моноклональное антитело (15 мкг в соответствии с молярным соотношением 1:1). Параллельно давали BrdU в составе питьевой воды при концентрации 0,8 мг/мл. На следующий день (24 ч после инъекции)

екции и BrdU) окрашивание проводили для идентификации и количественного определения уровня пролиферации конкретных подгрупп иммунных клеток, при этом флуорохром-конъюгированное антитело к BrdU использовали для окрашивания клеток, которые пролиферировали. Окрашивание BrdU проводили с применением набора FITC BrdU и следуя рекомендациям поставщика (BD Pharmingen, 51-2354 AK), а также с применением флуорохром-конъюгированных антител к следующим маркерам: CD44, CD8a, CD4, NK1.1, CD3, CD122, Brdu, CD4.

Данные собирали с применением проточного пситометра Becton Dickinson LSR Fortessa, хорошо известного специалисту в данной области техники.

(2) Результаты.

Результаты на основе данных количества клеток показаны в табл. 32 и 33.

Таблица 32

Данные количества клеток						
	Количества клеток ($\times 10^6$)					
	CD3 ⁺ CD8 ⁺		CD3 ⁺ CD4 ⁺		CD3 ⁻ NK1.1 ⁺ DX5 ⁺	
PBS	2,495371	2,543511	3,8753	3,765718	0,936491	0,865639
IL-2/NARA1 (105192)	9,711202	24,05544	10,23144	12,94353	8,302392	27,26912
IL-2/104348	3,434657	3,326519	4,306137	4,117778	4,371078	2,262703
IL-2/106260	4,819404	5,134374	5,958536	5,784579	4,108989	5,38501
IL-2/108923	43,34794	24,56542	9,965975	8,123486	22,66742	20,29286
IL-2/108924	12,17483	14,31066	6,465253	7,388885	11,60917	12,92698
IL-2/108925	16,40202	19,57112	6,966743	7,345211	13,00835	16,15564
IL-2/108926	15,40003	8,585168	5,453268	4,761522	15,08973	9,894915
IL-2/108929	10,28953	10,05284	6,239835	3,892643	8,272205	10,35257
IL-2/108930	16,0777	6,489082	6,878161	2,625737	17,55283	7,434181

Таблица 33

Данные количества клеток				
	Количества клеток ($\times 10^6$)			
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺		CD3 ⁺ CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	
PBS	0,341866	0,278769	0,215854	0,1562773
IL-2/NARA1 (105192)	4,269044	15,16695	0,640488	1,695603
IL-2/104348	0,950713	0,959035	0,368605	0,3528936
IL-2/106260	0,918578	1,969546	0,57619	0,6478728
IL-2/108923	31,60932	15,84961	1,574624	1,186029
IL-2/108924	6,8873	9,234667	0,724108	0,8127773
IL-2/108925	10,79581	13,11657	0,766342	0,7146891
IL-2/108926	9,517218	4,714974	0,504427	0,359971
IL-2/108929	4,882382	5,851761	0,582177	0,4671171
IL-2/108930	8,355582	4,038156	0,818501	0,3413458

Таблица 34

Соотношения данных количества клеток		
	Соотношения количеств клеток	
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺ / CD3 ⁺ CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	
PBS	1,583781	1,783809
IL-2/NARA1 (105192)	6,665295	8,944873
IL-2/104348	2,579217	2,717633
IL-2/106260	1,594227	3,040019
IL-2/108923	20,0742	13,36359
IL-2/108924	9,511421	11,36187
IL-2/108925	14,08746	18,35283
IL-2/108926	18,86737	13,0982
IL-2/108929	8,386427	12,5274
IL-2/108930	10,20839	11,8301

Как можно увидеть в табл. 32, 33 и 34, антитела 104348, 106260, 108923, 108924, 108925, 108926, 108929 и 108930 в комплексе с IL-2 могут предпочтительно стимулировать CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки *in vivo*.

Также на фиг. 12-15 показана фенотипическая характеристика эндогенных CD8⁺, CD8⁺CD44⁺CD122⁺, CD4⁺ Т-клеток, Трег-клеток и NK-клеток. На фиг. 16, 17 показано количество подгрупп иммунных клеток, полученных из селезенки мыши; нанесенные на график значения или

табл. 32, 33 и 34. На фиг. 18-22 показаны характерные BrdU профили CD8⁺, CD8⁺CD44⁺CD122⁺ Т-клеток, CD3⁺NK1.1⁺DX5⁺ NK-клеток, CD4⁺ и CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в селезенке мыши. Как можно видеть, гуманизированные антитела 104348, 106260 и гуманизированные антитела с созревшей аффинностью 108923, 108924, 108925, 108926, 108929 и 108930 в комплексе с IL-2 усиливают уровни пролиферации CD8⁺ Т-клеток (особенно CD8⁺CD44⁺CD122⁺ Т-клеток) и NK-клеток *in vivo* над CD4⁺ и CD4⁺CD25⁺ Т-клетками.

Исходя из данных результатов можно сделать вывод, что гуманизированные антитела 104348, 106260, гуманизированные антитела с созревшей аффинностью 108923, 108924, 108925, 108926, 108929 и 108930 являются подобными родительскому антителу NARA1 (105192), и когда смешаны с hIL-2 (Pro-leukin®), способны предпочтительно стимулировать CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки.

Пример 14. Получение плазмид экспрессии слитых белков на основе NARA1.

ДНК-последовательности, кодирующие IL-2 человека (pORF-hIL-2 плазида, Invivogen, porf-hIL-2) и легкую цепь NARA1, субклонировали посредством вырезания и вставки и лигировали с применением стандартных методик клонирования (ПЦР-амплификация/образование с применением полимеразы Phusion, Finnzymes, F-530S), добавляя в праймеры необходимые линкеры (например 15-, 20- или 25-аминокислотные линкеры, как показано в табл. 35, 36 и 37). Полученные в результате ПЦР-продукты вставляли посредством вырезания и вставки в векторы экспрессии, подходящие для секреции в клетках млекопитающих. Тяжелая цепь NARA1 и легкая цепь NARA1, слитые с hIL-2, клонировали в отдельные векторы экспрессии для обеспечения возможности котрансфекции. Элементы вектора экспрессии включают промотор (энхансер-промотор цитомегаловируса (CMV)), сигнальную последовательность для облегчения секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий возможность эписомальной репликации и репликации у прокариот (например, исходный SV40 и ColE1 или другие, известные из уровня техники), и элементы для обеспечения возможности осуществления отбора (ген устойчивости к ампициллину и зеоциновый маркер).

Таблица 35

Области легкой цепи

Область цепи	легкой	Перечень последовательностей
IL-2-(G4S) ₃ - (NARA1)	L	SEQ ID NO: 413 (ДНК)
IL-2-(G4S) ₄ - (NARA1)	L	SEQ ID NO: 414 (ДНК)
IL-2-(G4S) ₅ - (NARA1)	L	SEQ ID NO: 415 (ДНК)

Пример 15. Экспрессия и очищение слитых белков на основе NARA1.

Клетки яичника китайского хомячка (CHO) являются одними из предпочтительных линий клеток-хозяев для осуществления транзientной экспрессии белков IgG. Трансфекцию проводили с применением PEI (полиэтиленимина, MW 25000, линейного, Polysciences, США, № по каталогу 23966) в качестве реагента трансфекции. Исходный раствор PEI готовили посредством тщательного растворения 1 г PEI в 900 мл воды, приемлемой для культивирования клеток при комнатной температуре (RT). Для облегчения растворения PEI раствор подкисляли посредством добавления HCl до pH 3-5 с последующей нейтрализацией с помощью NaOH с получением конечного pH, составляющего 7. В заключение объем довели до 1 л и фильтровали раствор через фильтр с размером пор, составляющим 0,22 мкм, разделяли на аликвоты и замораживали при -80°C до дальнейшего применения. Клетки CHO культивировали с применением среды Power CHO-2D и среды ProCHO-4 (культуральных сред 12-770Q и 12-029Q Lonza, не содержащих сыворотку крови для распространения и трансфекции соответственно) с гипоксантином натрия и тимидином (HT, 41065012, Invitrogen), L-глутамином (17-605C, Lonza) и веществами, характеризующимися антибиотическими и фунгицидными свойствами (15240062, ThermoFisher) в качестве дополнений. Клетки, приготовленные для временных трансфекций, культивировали в виде суспензионной культуры на шейкере при 150 об./мин. Для трансфекции клетки в посевных культурах следует поддерживать в экспоненциальной фазе роста (концентрации клеток от 1,5×10⁵ до 3×10⁶ /мл), и они должны характеризоваться жизнеспособностью >98%. Концентрации клеток за пределами данного диапазона приводят либо к лаг-фазе после разведения, либо к уменьшению эффективности трансфекции. Для трансфекций аликвоту клеток отбирали из посевных культур и регулировали до 2×10⁶ клеток/мл в 50% конечного объема с помощью культуральной среды Power CHO-4, не содержащей сыворотку крови. Раствор ДНК (общая ДНК=125 мкг для масштаба 100 мл, регулировали до молярного соотношения 1:1 тяжелой цепи и легкой(легких) цепи(цепей), слитых с IL-2) готовили посредством разбавления ДНК в 150 мМ раствора NaCl. Затем раствор PEI (0,5 мл для масштаба 100 мл) добавляли к раствору ДНК. Смесь перемешивали вихревым способом и инкубировали в течение 10-12 мин при комнатной температуре. Затем смесь для трансфекции добавляли к клеткам и продолжали культивирование клеток в течение 3-4 ч. В заключение оставшихся 50% общего получаемого объема достигали посредством добавления культуральной среды Power CHO-2D, не содержащей сыворотку крови. Культивирование клеток продолжали от четырех до

шести дней после осуществления трансфекции. Культуру собирали посредством центрифугирования при 4700 об./мин в течение 45 мин при 4°C (Heraeus®, Multifuge 3 S-R, Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс). Клеточный супернатант выделяли путем стерилизующего фильтрования через стерикап-фильтр (0,22 мкм) и хранили при 4°C с 2,5 мМ EDTA и азида натрия (0,01%) до дополнительной обработки.

Очищение выполняли с применением агарозы с G-белком (20397, Thermo Scientific) при 4°C. Соответственно, создавали три слитых белка, где С-конец IL-2 сливали с N-концом легкой цепи NARA1 с линкерами глицин-серин длиной 15, 20 или 25 аминокислот, как освещено в табл. 36. Тяжелая цепь NARA1 оставалась такой же (SEQ ID NO: 115).

Таблица 36

Области легкой цепи		Перечень последовательностей
Область цепи	легкой	
IL-2-(G4S) ₃ - (NARA1)	L	SEQ ID NO: 416
IL-2-(G4S) ₄ - (NARA1)	L	SEQ ID NO: 417
IL-2-(G4S) ₅ - (NARA1)	L	SEQ ID NO: 418

Таблица 37

Слитый белок на основе NARA1

Слитый белок	Область легкой цепи	Легкая цепь SEQ ID	Область тяжелой цепи	Тяжелая цепь SEQ ID
L15	IL-2-(G4S) ₃ - L (NARA1)	SEQ ID NO: 416 (AA)	H1	SEQ ID NO: 115
L20	IL-2-(G4S) ₄ - L (NARA1)	SEQ ID NO: 417 (AA)	H1	SEQ ID NO: 115
L25	IL-2-(G4S) ₅ - L (NARA1)	SEQ ID NO: 418 (AA)	H1	SEQ ID NO: 115

Пример 16. Оценка слитых белков на основе NARA1 *in vivo*.

Определяли процентное содержание и количества CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток и NK-клеток у мышей C57BL/6 WT, которые получали L15, L20, L25 или IL-2/NARA1, как описано ниже. Параллельно оценивали уровни пролиферации CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток с применением бромдезоксисуридина (BrdU).

(1) Материалы и способы.

Использовали следующие антитела и слитые белки: NARA1, L15, L20 и L25.

Использовали рекомбинантный IL-2 человека (Teceleukin®).

Мыши получали 3 последовательные инъекции hIL-2 при 2 мкг (20000 IU) с hIL-2/моноклональным антителом (NARA1, 10 мкг, в соответствии с молярным соотношением 2:1), L15, L20, L25 (соответствующее количество IL-2 на основе активности) или PBS. В день когда делали последнюю инъекцию, BrdU давали в питьевой воде при концентрации 0,8 мг/мл в течение 24 ч. На следующий день мышей умерщвляли и анализировали селезенки и лимфоузлы (LN) посредством проточной цитометрии. Для этого подготавливали суспензии отдельных клеток LN и селезенки в соответствии со стандартными протоколами и 2×10⁶ клеток окрашивали для анализа с помощью проточной цитометрии с применением PBS с 2% фетальной телячьей сыворотки (FCS), 2 мМ EDTA и флуорохром-конъюгированными антителами (см ниже).

Проводили два разных окрашивания. Первое окрашивание проводили для идентификации и количественного определения регуляторных CD4⁺CD25⁺ forkhead box P3 (FoxP3)⁺ Т-клеток. В связи с этим суспензии отдельных клеток окрашивали с применением буфера для окрашивания FoxP3 и следуя рекомендациям поставщика (eBiosciences, 00-5523-00), а также с применением флуорохром-конъюгированных антител к следующим маркерам: CD25, CD8a, CD4, CD3, FoxP3.

Второе окрашивание проводили для идентификации и количественного определения уровня пролиферации конкретных подгрупп иммунных клеток, при этом флуорохром-конъюгированное антитело к BrdU использовали для окрашивания клеток, которые пролиферировали. Окрашивание BrdU проводили с применением набора FITC BrdU и, следуя рекомендациям поставщика (BD Pharmingen, 51-2354 AK), а также с применением флуорохром-конъюгированных антител к следующим маркерам: CD44, CD8a, CD4, NK1.1, CD3, CD122, BrdU.

Данные собирали с применением проточного питометра Becton Dickinson LSR Fortessa, хорошо известного специалисту в данной области техники.

(2) Результаты.

Результаты на основе данных количества клеток показаны в табл. 38.

Таблица 38

	Количества клеток					
	CD8 ⁺ CD44 ⁺		CD3 ⁺ NK1.1 ⁺ DX5 ⁺		CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	
PBS	2,988014	1,905477	2,636173	2,153964	1,704692	1,612001
hIL-2/NARA1	11,58204	12,41452	4,885715	5,945634	3,763952	4,461254
L15	21,08623	9,229327	6,761334	4,056121	8,416243	7,998698
L20	12,9221	15,2443	7,870497	6,671924	8,024002	3,606802
L25	12,36608	14,4394	6,9261	6,736377	7,07191	5,494133

Как можно увидеть в табл. 38, слитые белки L15, L20 и L25 могут стимулировать CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки *in vivo*.

Также на фиг. 23 показана фенотипическая характеристика эндогенных CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток. На фиг. 24 показано количество иммунных клеток, полученных в селезенке мыши (нанесенные на график значения из табл. 38). На фиг. 25 показаны характерные BrdU профили CD8⁺CD44⁺CD122⁺ Т-клеток и CD3⁺NK1.1⁺ NK-клеток в селезенке мышей.

Исходя из данных результатов можно сделать вывод, что слитые белки на основе NARA1 способны предпочтительно стимулировать CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки, подобные родительскому антителу NARA1, в комбинации с IL-2 человека.

Пример 17. Оценка слитых белков на основе NARA1 *in vitro*.

Активность слитых белков на основе NARA1 сравнивали с NARA1 и IL-2 в отдельности в анализе пролиферации клеток с применением линий клеток мышей CTLL-2, поддающихся влиянию IL-2 человека.

Клетки CTLL-2 высевали в 96-луночные планшеты (10000 клеток/луночка) и стимулировали с применением hIL-2 или комплекса hIL-2/NARA1 (молярное соотношение 2:1), L15, L20 или L25 (соответствующее количество IL-2) и оценивали пролиферацию после 48 ч инкубации при 37°C. Пролиферацию оценивали посредством добавления WST-1 (Sigma-Aldrich) к клеткам в течение не менее 4 ч с последующим считыванием при 450 нм на считывателе микропланшетов iMark.

Эксперимент выполняли в двух повторностях, и в табл. 39 представлены полученные значения EC₅₀.

Таблица 39

Данные по пролиферации клеток CTLL-2 (EC₅₀)

	L15	L20	L25	hIL-2	hIL-2/Nara1
EC50 (нг/мл)	2,7	1,6	2,6	0,8	0,7

Как показано в табл. 39, слитые белки на основе NARA1 имеют способность индуцировать пролиферацию клеток CTLL-2 *in vitro*, но в меньшей степени по сравнению с hIL-2 и hIL-2/NARA1.

Также на фиг. 26 показаны полученные кривые пролиферации.

Активность слитых белков на основе NARA1 сравнивали с NARA1 и IL-2 в отдельности в анализе фосфорилирования STAT5 (P-STAT5) с применением линий клеток мышей CTLL-2, поддающихся влиянию IL-2 человека. CTLL-2 (200000 клеток/луночка) высевали в 96-луночные планшеты и стимулировали с применением комплекса hIL-2 hIL-2/NARA1 (при молярном соотношении 2:1), L15, L20 или L25 (соответствующее количество IL-2). Фосфорилирование STAT5 оценивали после 15 мин стимуляции и обнаруживали, применяя метод внутриклеточного окрашивания с помощью pSTAT5-специфических mAb (BD Biosciences).

Эксперимент выполняли в двух повторностях, и в табл. 40 представлены полученные значения EC₅₀.

Таблица 40

P-STAT5 (EC₅₀)

	hIL-2	hIL-2/NARA1	L15	L20	L25
EC50 (нг/мл)	1,03	1,4	107,2	~ 426,6	~ 434,8

Также на фиг. 27 представлены полученные уровни пролиферации. Как наблюдалось, эффект *in vitro*, полученный на клетках, которые экспрессируют высокие уровни CD25, таких как клетки CTLL-2, ниже, когда клетки стимулируют с помощью L15, L20 и L25, чем с помощью IL-2 или IL-2/NARA1. Эта разница более заметна в течение короткого периода времени (такого как 15 мин стимуляции для P-STAT5). Действительно с наиболее коротким линкером L15, IL-2 может проще диссоциировать с NARA1, что позволяет стимулировать клетки за короткий период времени. С другой стороны, для слияний L20 и L25, IL-2 может оставаться связанным с NARA1 дольше, предотвращая стимуляцию клеток CTLL-2.

Таблица последовательностей.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности, полезные для реализации на практике настоящего изобретения, можно найти в табл. 41. По всему тексту настоящей заявки может быть несоответствие между текстом описания (например, табл. 41) и перечнем последовательностей, при этом текст

описания имеет преимущественную силу.

Таблица 41

Перечень последовательностей

>VH1		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 3 (комбинированная)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 3 (Chothia)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 7	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGRV TTTADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWRGDGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 8	ДНК VH	CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GCGCTGAAGTGAAGAAACCCGG CTCCTCCGTGAAAGTGCCTGCA AGGCTCCGGCTACGCCTTAC CAACTACCTGATCGAGTGGGTC CGACAGGCCCCAGGCCAGGGCC TGGAGTGGATGGGCGTGATCAA CCCTGGCTCCGGCGGCACCAAC TACAACGAGAAGTTCAAGGGCA GAGTGACCATCACCGCCGACAA GTCCACCTCCACCGCTACATG GAACTGTCCTCCCTGCGGAGCG AGGACACCGCGTGTACTACTG TGCCCGGTGGCGGGGAGATGGC TACTACGCCTACTTCGACGTGTG GGGCCAGGGCACCCGTGACC GTGTCCTCT
>VH3		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 3 (комбинированная)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 4	HCDR1	NYLIE

(Kabat)		
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 3 (Chothia)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 9	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLE WVAVINPGSGGTNYNEKFKGRFT ISADKSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARWRGDGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 10	ДНК VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCG GCGGCGCGGTGGTGCAGCCCGG CCGGAGCCTGCGGCTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTACGCCTTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGGCAGGCCCGGCAAGGGC CTGGAGTGGGTGGCCGTGATCA ACCCCGGAGCGGCGGCACCAA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CGGTTACCATCAGCGCCGACA AGAGCAAGAGCACCGCTACCT GCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCGTGTACTACT GCGCCCGGTGGCGGGGCGACGG CTACTACGCCTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACCACCGTGAC CGTGAGCAGC
>VH3		
SEQ ID NO: 11 (комбинированная)	HCDR1	GYTFSSYLIE
SEQ ID NO: 12 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYADSVKG
SEQ ID NO: 3 (комбинированная)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 13 (Kabat)	HCDR1	SYLIE

SEQ ID NO: 12 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYADSVKG
SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 14 (Chothia)	HCDR1	GYTFSSY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 3 (Chothia)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 15	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGYTFSSYLIEWVRQAPGKGLE WVAVINPGSGGTNYADSVKGRFT ISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARWRGDGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 16	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCG GCGGAGGCGTGGTGCAGCCTGG AAGAAGCCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTACACCTCA GCAGCTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGGCCCTGGCAAAGGA CTGGAATGGGTGGCCGTGATCA ACCCTGGCAGCGGCGGCACCAA TTACGCCGATAGCGTGAAGGGC CGGTTACCATCAGCGCCGACA AGAGCAAGAACACCGCTACCT CCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTACTATT GTGCTCGGTGGCGGGGAGATGG CTACTACGCCTACTTCGACGTGT GGGCCCAGGGCACCACAGTGAC CGTCAGCTCA
>VH5		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 3 (комбинированная)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG

(Kabat)		
SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 3 (Chothia)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 17	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARWRGDGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 18	ДНК VH	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GCGCTGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGTCCCTGAAGATCTCCTGC AAGGGCTCCGGCTACGCCTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT CCGACAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAGTGGATGGGCGTGATCA ACCCCGGCTCCGGCGGCACCAA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTCACAATCTCCGCCGACA AGTCCATCTCCACCGCCTACCTG CAGTGGTCTCCCTGAAGGCCT CCGACACCGCCATGTACTACTG CGCCAGATGGCGGGGAGATGGC TACTACGCCTACTTCGACGTGTG GGGCCAGGGCACCACCGTGACC GTGTCCTCT
>VK1		
SEQ ID NO: 19 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVDYDGD SYMN
SEQ ID NO: 20 (комбинированная)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 19 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYDGD SYMN
SEQ ID NO: 20 (Kabat)	LCDR2	AASNLES

SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 22 (Chothia)	LCDR1	SQSVDYDGDSY
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 25	VL	AIRLTQSPSSFSASTGDRVTITCKA SQSVDYDGDSYMNWYQQKPGK APKLLIYAASNLESGVPSRFGSG SGTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQ SNEDPYTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 26	ДНК VL	GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCTCCAGCTTCTCCGCCTCCACC GGCGACAGAGTGACCATCACAT GCAAGGCCTCCCAGTCCGTGGA CTACGACGGCGACTCCTACATG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGAT CTACGCCGCTCCAACCTGGAA TCCGGCGTGCCCTCCCGTTCTC CGGCTCTGGCTCTGGCACCGAC TTCACCCTGACCATCTCCAGCCT GCAGTCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTCCAACG AGGACCCCTACACCTTCGGCGG AGGCACCAAAGTGGAATCAAG
>VK2		
SEQ ID NO: 19 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVDYDGDSYMN
SEQ ID NO: 20 (комбинированная)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 19 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYDGDSYMN
SEQ ID NO: 20 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 22 (Chothia)	LCDR1	SQSVDYDGDSY

SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 27	VL	DIVLTQSPVLSLPLVTLGQPASISCKA SQSVVDYDGDSYMNWYQQRPGQS PRLLIYAASNLESGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQ SNEDPYTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 28	ДНК VL	GACATCGTGCTGACACAGAGCC CTCTGTCCCTGCCCGTGACCCTG GGCCAGCCTGCCTCCATCTCCTG CAAGGCCTCCAGTCCCGTGGAC TACGACGGCGACTCCTACATGA ACTGGTATCAGCAGCGGCCTGG CCAGTCCCCTCGGCTGCTGATCT ACGCCGCCTCCAACCTGGAATC CGGCGTGCCCGACAGATTCTCC GGCTCCGGCTCTGGCACCGACT TCACCCTGAAGATCTCCCGGGT GGAAGCCGAGGACGTGGGCGTG TACTACTGCCAGCAGTCCAACG AGGACCCCTACACCTTCGGCGG AGGCACCAAAGTGGAATCAAG
>VK3		
SEQ ID NO: 19 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVVDYDGDSYMN
SEQ ID NO: 20 (комбинированная)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 19 (Kabat)	LCDR1	KASQSVVDYDGDSYMN
SEQ ID NO: 20 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 22 (Chothia)	LCDR1	SQSVVDYDGDSY
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY

SEQ ID NO: 29	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCK ASQSVDYDGD SYMNWYQQKPG QAPRLLIYAASNLESGIPARFSGS GSGTEFTLTISLQSEDAAVYYCQ QSNEDPYTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 30	ДНК VL	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCC CCGCCACCCTGAGCGTGAGCCC CGGCGAGCGGGCCACCCTGAGC TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACGACGGCGACAGCTACAT GAACTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCCAGGCCCCCGGCTGCTGA TCTACGCCGCCAGCAACCTGGA GAGCGGCATCCCCGCCCGTTC AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCG AGTTCACCCTGACCATCAGCAG CCTGCAGAGCGAGGACGCCGCC GTGTACTACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTCGG CGGCGGCACCAAGGTGGAGATC AAG
>VK3		
SEQ ID NO: 31 (комбинированная)	LCDR1	RASQSVSYDGD SYMN
SEQ ID NO: 32 (комбинированная)	LCDR2	AASNLAS
SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QSNEDPYT
SEQ ID NO: 31 (Kabat)	LCDR1	RASQSVSYDGD SYMN
SEQ ID NO: 32 (Kabat)	LCDR2	AASNLAS
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QSNEDPYT
SEQ ID NO: 33 (Chothia)	LCDR1	SQSVSYDGD SY
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 34	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSR ASQSVSYDGD SYMNWYQQKPGQ APRLLIYAASNLAGIPARFSGSGS

		GTEFTLTISSLQSEDAAVYYCQQS NEDPYTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 35	ДНК VL	GAAATCGTGCTGACCCAGAGCC CTGCCACCCTGAGTGTGTCTCCA GGCGAGAGAGCCACACTGAGCT GTAGAGCCAGCCAGAGCGTGTG CTACGACGGCGACAGCTACATG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCCAGGCCCCAGACTGCTGAT CTACGCCGCTTCCAATCTGGCCA GCGGCATCCCCGCCAGATTTCC GGCTCTGGCTCCGGCACCGAGT TCACCCTGACAATCAGCAGCCT CCAGAGCGAGGACGCCGCCGTG ТАCTACTGCCAGCAGAGCAACG AGGACCCCTACACCTTTGGCGG AGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
>VH1_D98E		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 36 (комбинированная)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 36 (Kabat)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 36 (Chothia)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 37	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWRGEGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 38	ДНК VH	CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTG

		GCGCTGAAGTGAAGAAACCCGG CTCCTCCGTGAAAGTGTCTGCA AGGCTCCGGCTACGCCTTAC CAACTACCTGATCGAGTGGGTC CGACAGGCCCCAGGCCAGGGCC TGGAGTGGATGGGCGTGATCAA CCCTGGCTCCGGCGGCACCAAC TACAACGAGAAGTTCAAGGGCA GAGTGACCATCACCGCCGACAA GTCCACCTCCACCGCCTACATG GAACTGTCTCCTGCGGAGCG AGGACACCGCGTGTACTACTG CGCCAGATGGCGGGGAGAGGGC TACTACGCCTACTCGACGTGTG GGGCCAGGGCACCACCGTGACC GTGTCTCT
>VH1 G99A		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 39 (комбинированная)	HCDR3	WRGDYYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 39 (Kabat)	HCDR3	WRGDYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 39 (Chothia)	HCDR3	WRGDYYAYFDV
SEQ ID NO: 40	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWRGDYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 41	ДНК VH	CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GCGCTGAAGTGAAGAAACCCGG

		CTCCTCCGTGAAAGTGCCTGCA AGGCCTCCGGCTACGCCTTAC CAACTACCTGATCGAGTGGGTC CGACAGGCCCCAGGCCAGGGCC TGGAGTGGATGGGCGTGATCAA CCCTGGCTCCGGCGGCACCAAC TACAACGAGAAGTTCAAGGGCA GAGTGACCATCACCGCCGACAA GTCCACCTCCACCGCCTACATG GAACTGTCCTCCCTGCGGAGCG AGGACACCGCCGTGTACTACTG TGCCCGGTGGCGGGGAGATGCC TACTACGCCTACTTCGACGTGTG GGGCCAGGGCACCAACCGTGACC GTGTCCTCT
>VH1_D98Q		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 42 (комбинированная)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 42 (Kabat)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 42 (Chothia)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 43	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWRGQGYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 44	ДНК VH	CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GCGCTGAAGTGAAGAAACCCGG CTCCTCCGTGAAAGTGCCTGCA

		AGGCCTCCGGCTACGCCTTCAC CAACTACCTGATCGAGTGGGTC CGACAGGCCCCAGGCCAGGGCC TGGAGTGGATGGGCGTGATCAA CCCTGGCTCCGGCGGCACCAAC TACAACGAGAAGTTCAAGGGCA GAGTGACCATCACCGCCGACAA GTCCACCTCCACCGCTACATG GAACTGTCCTCCCTGCGGAGCG AGGACACCGCCGTGTACTACTG CGCCAGATGGCGGGGACAGGGC TACTACGCCTACTTCGACGTGTG GGGCCAGGGCACCCCGTGACC GTGTCTCT
>VH1_D98S		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 45 (комбинированная)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 45 (Kabat)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 45 (Chothia)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 46	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGYAFTNYLIEWVRQAPGGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWRGSGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 47	ДНК VH	CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GCGCTGAAGTGAAGAAACCCGG CTCCTCCGTGAAAGTGTCTGCA AGGCCTCCGGCTACGCCTTCAC

		CAACTACCTGATCGAGTGGGTC CGACAGGCCCCAGGCCAGGGCC TGGAGTGGATGGGCGTGATCAA CCCTGGCTCCGGCGGCACCAAC TACAACGAGAAGTTCAAGGGCA GAGTGACCATCACCGCCGACAA GTCCACCTCCACCGCTACATG GAACTGTCCTCCCTGCGGAGCG AGGACACCGCCGTGTACTIONG CGCCAGATGGCGGGGATCTGGC TACTACGCTACTTCGACGTGTG GGGCCAGGGCACCACCGTGACC GTGTCCTCT
> VH3 D98E		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 36 (комбинированная)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 36 (Kabat)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 36 (Chothia)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 48	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLE WVAVINPGSGGTNYNEKFKGRFT ISADKSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARWRGEGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 419	ДНК VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCG GCGGCGGCGTGGTGCAGCCCGG CCGGAGCCTGCGGCTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTACGCCTCA CCAACCTGATCGAGTGGGT

		GCGGCAGGCCCCGGCAAGGGC CTGGAGTGGGTGGCCGTGATCA ACCCCGGCAGCGGCGGCACCAA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CGGTTACCATCAGCGCCGACA AGAGCAAGAGCACCGCTACCT GCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACT GCGCCCGGTGGCGGGGCGAGGG CTACTACGCCTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACCCCGTGAC CGTGAGCAGC
> VH3 G99A		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 39 (комбинированная)	HCDR3	WRGDYYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 39 (Kabat)	HCDR3	WRGDYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 39 (Chothia)	HCDR3	WRGDYYAYFDV
SEQ ID NO: 51	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLE WVAVINPGSGGTNYNEKFKGRFT ISADKSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARWRGDYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 52	ДНК VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCG GCGGCGGCGTGGTGCAGCCCGG CCGGAGCCTGCGGCTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTACGCCTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGGCAGGCCCCGGCAAGGGC

		CTGGAGTGGGTGGCCGTGATCA ACCCCGGCAGCGGGCGCACAA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CGGTTACCATCAGCGCCGACA AGAGCAAGAGCACCGCTACCT GCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCGTGTACTACT GCGCCCGGTGGCGGGGCGACGC CTACTACGCCTACTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACCACCGTGAC CGTGAGCAGC
> VH3 D98Q		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 42 (комбинированная)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 42 (Kabat)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 42 (Chothia)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 53	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLE WVAVINPGSGGTNYNEKFKGRFT ISADKSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARWRGQGYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 54	ДНК VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCG GCGGCGGCGTGGTGCAGCCCGG CCGGAGCCTGCGGCTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTACGCCTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGGCAGGCCCCCGCAAGGGC CTGGAGTGGGTGGCCGTGATCA

		ACCCCGGCAGCGGCGGCACCAA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CGGTTACCATCAGCGCCGACA AGAGCAAGAGCACCGCCTACCT GCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACT GCGCCCGGTGGCGGGGCCAGGG CTACTACGCCTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACCCCGTGAC CGTGAGCAGC
> VH3_D98S		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 45 (комбинированная)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 45 (Kabat)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 45 (Chothia)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 55	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGYAFTNYLIEWVRQAPGKGLE WVAVINPGSGGTNYNEKFKGRFT ISADKSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARWRGSGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 56	ДНК VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCG GCGGCGGCGTGGTGCAGCCCGG CCGGAGCCTGCGGCTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTACGCCTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGGCAGGCCCCCGCAAGGGC CTGGAGTGGGTGGCCGTGATCA ACCCCGGCAGCGGCGGCACCAA

		CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CGGTTACCATCAGCGCCGACA AGAGCAAGAGCACCGCTACCT GCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCGTGTACTACT GCGCCCGGTGGCGGGCAGCGG CTACTACGCCTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACCCCGTGAC CGTGAGCAGC
> VH3 D98E		
SEQ ID NO: 11 (комбинированная)	HCDR1	GYTFSSYLIE
SEQ ID NO: 12 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYADSVKG
SEQ ID NO: 36 (комбинированная)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 13 (Kabat)	HCDR1	SYLIE
SEQ ID NO: 12 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYADSVKG
SEQ ID NO: 36 (Kabat)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 14 (Chothia)	HCDR1	GYTFSSY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 36 (Chothia)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 57	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGYTFSSYLIEWVRQAPGKGLE WVAVINPGSGGTNYADSVKGRFT ISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARWRGEGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 58	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCG GCGGAGGCGTGGTGCAGCCTGG AAGAAGCCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTACACCTTCA GCAGCTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGGCCCTGGCAAAGGA CTGGAATGGGTGGCCGTGATCA ACCTGGCAGCGGCGGCACCAA TTACGCCGATAGCGTGAAGGGC

		CGGTTACCATCAGCGCCGACA AGAGCAAGAACACCGCTACCT CCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGACTATT GTGCTCGGTGGCGGGGAGAGGG CTACTACGCCTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACCACAGTGAC CGTCAGCTCA
> VH3 G99A		
SEQ ID NO: 11 (комбинированная)	HCDR1	GYTFSSYLIE
SEQ ID NO: 12 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYADSVKG
SEQ ID NO: 39 (комбинированная)	HCDR3	WRGDAYYAYFDV
SEQ ID NO: 13 (Kabat)	HCDR1	SYLIE
SEQ ID NO: 12 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYADSVKG
SEQ ID NO: 39 (Kabat)	HCDR3	WRGDAYYAYFDV
SEQ ID NO: 14 (Chothia)	HCDR1	GYTFSSY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 39 (Chothia)	HCDR3	WRGDAYYAYFDV
SEQ ID NO: 59	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGYTFSSYLIEWVRQAPGKGLE WVAVINPGSGGTNYADSVKGRFT ISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARWRGDAYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 60	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCG GCGGAGGCGTGGTGCAGCCTGG AAGAAGCCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTACACCTTCA GCAGCTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGGCCCTGGCAAAGGA CTGGAATGGGTGGCCGTGATCA ACCCTGGCAGCGGCGGCACCAA TTACGCCGATAGCGTGAAGGGC CGGTTACCATCAGCGCCGACA

		AGAGCAAGAACACCGCTACCT CCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTATT GTGCTCGGTGGCGGGGAGATGC CTACTACGCCTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACACAGTGAC CGTCAGCTCA
> VH3_D98Q		
SEQ ID NO: 11 (комбинированная)	HCDR1	GYTFSSYLIE
SEQ ID NO: 12 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYADSVKG
SEQ ID NO: 42 (комбинированная)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 13 (Kabat)	HCDR1	SYLIE
SEQ ID NO: 12 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYADSVKG
SEQ ID NO: 42 (Kabat)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 14 (Chothia)	HCDR1	GYTFSSY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 42 (Chothia)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 61	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGYTFSSYLIEWVRQAPGKGLE WVAVINPGSGGTNYADSVKGRFT ISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARWRGQGYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 62	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCG GCGGAGGCGTGGTGCAGCCTGG AAGAAGCCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTACACCTTCA GCAGCTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGGCCCTGGCAAAGGA CTGGAATGGGTGGCCGTGATCA ACCCTGGCAGCGGGCGCACCAA TTACGCCGATAGCGTGAAGGGC CGGTTACCATCAGCGCCGACA AGAGCAAGAACACCGCTACCT

		CCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGACTATT GTGCTCGGTGGCGGGGACAGGG CTACTACGCCTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACCACAGTGAC CGTCAGCTCA
> VH3 D98S		
SEQ ID NO: 11 (комбинированная)	HCDR1	GYTFSSYLIE
SEQ ID NO: 12 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYADSVKG
SEQ ID NO: 45 (комбинированная)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 13 (Kabat)	HCDR1	SYLIE
SEQ ID NO: 12 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYADSVKG
SEQ ID NO: 45 (Kabat)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 14 (Chothia)	HCDR1	GYTFSSY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 45 (Chothia)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 63	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGYTFSSYLIEWVRQAPGKGLE WVAVINPGSGGTNYADSVKGRFT ISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARWRGSGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 64	ДНК VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCG GCGGAGGCGTGGTGCAGCCTGG AAGAAGCCTGAGACTGAGCTGT GCCGCCAGCGGCTACACCTCA GCAGCTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGGCCCTGGCAAAGGA CTGGAATGGGTGGCCGTGATCA ACCCTGGCAGCGGCGGCACCAA TTACGCCGATAGCGTGAAGGGC CGGTTACCATCAGCGCCGACA AGAGCAAGAACACCGCCTACCT CCAGATGAACAGCCTGCGGGCC

		GAGGACACCGCCGTGACTATT GTGCTCGGTGGCGGGGAAGCGG CTACTACGCCTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACACAGTGAC CGTCAGCTCA
>VH5 D98E		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 36 (комбинированная)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 36 (Kabat)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPSSGG
SEQ ID NO: 36 (Chothia)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 49	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPKGLK WMGVINPGSGGTNYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARWRGEGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 50	ДНК VH	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GCGCTGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGTCCCTGAAGATCTCCTGC AAGGGCTCCGGCTACGCCTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT CCGACAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAGTGGATGGGCGTGATCA ACCCCGGCTCCGGCGGCACCAA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTCACAATCTCCGCCGACA AGTCCATCTCCACCGCCTACCTG CAGTGGTCCTCCCTGAAGGCT CCGACACCGCCATGTACTACTG

		CGCCAGATGGCGGGGAGAGGGC TACTACGCCTACTTCGACGTGTG GGGCCAGGGCACCCCGTGACC GTGTCTCT
> VH5 G99A		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 39 (комбинированная)	HCDR3	WRGDAYYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 39 (Kabat)	HCDR3	WRGDAYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 39 (Chothia)	HCDR3	WRGDAYYAYFDV
SEQ ID NO: 65	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPKGL WMGVINPGSGGTNYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYTCARWRGDAYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 66	ДНК VH	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTTCA CCAACCTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCAA TTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGATGC

		CTACTACGCCTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACCACAGTGAC CGTCAGCTCA
> VH5 D98Q		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 42 (комбинированная)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 42 (Kabat)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 42 (Chothia)	HCDR3	WRGQGYAYFDV
SEQ ID NO: 67	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPKGL WMGVINPGSGGTNYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARWRGQGYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 68	ДНК VH	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCCGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCAA TTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGACAGGG CTACTACGCCTACTTCGACGTGT

		GGGGCCAGGGCACCACAGTGAC CGTCAGCTCA
> VH5 D98S		
SEQ ID NO: 1 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 2 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 45 (комбинированная)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 45 (Kabat)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 6 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 45 (Chothia)	HCDR3	WRGSGYYAYFDV
SEQ ID NO: 46	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYFCARWRGSGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 47	ДНК VH	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCAA TTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAAGCGG CTACTACGCCTACTTCGACGTGT GGGGCCAGGGCACCACAGTGAC

		CGTCAGCTCA
>VK1_D28Q		
SEQ ID NO: 69 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVQDYSYMN
SEQ ID NO: 20 (комбинированная)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QSNEDPYT
SEQ ID NO: 69 (Kabat)	LCDR1	KASQSVQDYSYMN
SEQ ID NO: 20 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QSNEDPYT
SEQ ID NO: (Chothia)	LCDR1	SQSVQDYSY
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 70	VL	AIRLTQSPSSFSASTGDRVTITCKA SQSVQDYSYMNWYQKPGK APKLLIYAASNLESGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQ SNEDPYTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 71	ДНК VL	GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCTCCAGTTCTCCGCCTCCACC GGCGACAGAGTGACCATCACAT GCAAGGCCTCCAGTCCGTGGA CTACCAGGGCGACTCCTACATG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGAT CTACGCCGCCTCCAACCTGGAA TCCGGCGTGCCCTCCCGTTCTC CGGCTCTGGCTCTGGCACCGAC TTCACCCTGACCATCTCCAGCCT GCAGTCCGAGGACTTCGCCACC ТАCTACTGCCAGCAGTCCAACG AGGACCCCTACACCTTCGGCGG AGGCACCAAAGTGAAATCAAG
>VK1_G29A		
SEQ ID NO: 72 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVQDYSYMN

ная)		
SEQ ID NO: 20 (комбинированная)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 72 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYDADSYMN
SEQ ID NO: 20 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 78 (Chothia)	LCDR1	SQSVDYDADSY
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 73	VL	AIRLTQSPSSFSASTGDRVTITCKA SQSVDYDADSYMNWYQQKPGK APKLLIYAASNLESGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQ SNEDPYTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 74	ДНК VL	GACATCGTGCTGACACAGAGCC CTCTGTCCCTGCCCGTGACCCTG GGCCAGCCTGCCTCCATCTCCTG CAAGGCCTCCCAGTCCGTGGAC TACGACGCCGACTCCTACATGA ACTGGTATCAGCAGCGGCCTGG CCAGTCCCCTCGGCTGCTGATCT ACGCCGCCTCCAACCTGGAATC CGGCGTGCCCGACAGATTCTCC GGCTCCGGCTCTGGCACCGACT TCACCCTGAAGATCTCCCGGT GGAAGCCGAGGACGTGGGCGTG TACTACTGCCAGCAGTCCAACG AGGACCCCTACACCTTCGGCGG AGGCACCAAAGTGGAATCAAG
> VK2_D28Q		
SEQ ID NO: 69 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVDYQGDSYMN
SEQ ID NO: 20 (комбинированная)	LCDR2	AASNLES

SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 69 (Kabat)	LCDR1	KASQSVQDYQGDSYMN
SEQ ID NO: 20 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 75 (Chothia)	LCDR1	SQSVQDYQGDSY
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 79	VL	DIVLTQSPVLSLQPELTKGQPASISCKA SQSVQDYQGDSYMNWYQQRPGQS PRLLIYAASNLESGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQ SNEDPYTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 80	ДНК VL	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCC CCGCCACCCTGAGCGTGAGCCC CGGCGAGCGGGCCACCCTGAGC TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACCAGGGCGACAGCTACAT GAACTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCCAGGCCCCCCGGCTGCTGA TCTACGCCGCCAGCAACCTGGA GAGCGGCATCCCCGCCCGGTTT AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCG AGTTCACCCTGACCATCAGCAG CCTGCAGAGCGAGGACGCCGCC GTGTAATACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTCGG CGGCGGCACCAAGGTGGAGATC AAG
> VK2_G29A		
SEQ ID NO: 72 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVQDYDADSYMN
SEQ ID NO: 20 (комбинированная)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEDPYT

SEQ ID NO: 72 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYDADSYMN
SEQ ID NO: 20 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 78 (Chothia)	LCDR1	SQSVDYDADSY
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 81	VL	DIVLTQSPVSLPVTLSGQPASISCKA SQSVDYDADSYMNWYQQRPGQS PRLLIYAASNLESGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQ SNEDPYTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 82	ДНК VL	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCC CCGCCACCCTGAGCGTGAGCCC CGGCGAGCGGGCCACCCTGAGC TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACGACGCCGACAGCTACAT GAACTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCCAGGCCCGGCTGCTGA TCTACGCCGCCAGCAACCTGGA GAGCGGCATCCCCGCCCGGTTT AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCG AGTTCACCCTGACCATCAGCAG CCTGCAGAGCGAGGACGCCGCC GTGTACTACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTCGG CGGCGGCACCAAGGTGGAGATC AAG
> VK3_D28Q		
SEQ ID NO: 69 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVDYQGDSYMN
SEQ ID NO: 20 (комбинированная)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 69 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYQGDSYMN
SEQ ID NO: 20	LCDR2	AASNLES

(Kabat)		
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 75 (Chothia)	LCDR1	SQSVDYQGDSY
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 76	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCK ASQSVDYQGDSYMNWYQQKPG QAPRLLIYAASNLESGIPARFSGS GSGTEFTLTISLQSEDAAVYYCQ QSNEDPYTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 77	ДНК VL	GAAATCGTGCTGACCCAGAGCC CTGCCACCCTGAGTGTGTCTCCA GGCGAGAGAGCCCACTGAGCT GTAGAGCCAGCCAGAGCGTGTG CTACCAGGGCGACAGCTACATG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCCAGGCCCCAGACTGCTGAT CTACGCCGCTTCCAATCTGGCCA GCGGCATCCCCGCCAGATTTTCC GGCTCTGGCTCCGGCACCGAGT TCACCCTGACAATCAGCAGCCT CCAGAGCGAGGACGCCGCCGTG TACTACTGCCAGCAGAGCAACG AGGACCCCTACACCTTTGGCGG AGGCACCAAGGTGGAATCAAG
> VK3 G29A		
SEQ ID NO: 72 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVDYDADSYMN
SEQ ID NO: 20 (комбинированная)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 72 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYDADSYMN
SEQ ID NO: 20 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 78	LCDR1	SQSVDYDADSY

(Chothia)		
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 84	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCK ASQSVVDYDADSYMNWYQQKPG QAPRLLIYAASNLESGIPARFSGS GSGTEFTLTISSLQSEDAAVYYCQ QSNEDPYTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 85	ДНК VL	GAAATCGTGCTGACCCAGAGCC CTGCCACCCTGAGTGTGTCTCCA GGCGAGAGAGCCACACTGAGCT GTAGAGCCAGCCAGAGCGTGTG CTACGACGCCGACAGCTACATG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCCAGGCCCCCAGACTGCTGAT CTACGCCGCTTCCAATCTGGCCA GCGGCATCCCCGCCAGATTTCC GGCTCTGGCTCCGGCACCGAGT TCACCCTGACAATCAGCAGCCT CCAGAGCGAGGACGCCCGCGTG TACTACTGCCAGCAGAGCAACG AGGACCCCTACACCTTTGGCGG AGGCACCAAGGTGAAATCAAG
>VK3_D28Q		
SEQ ID NO: 86 (комбинированная)	LCDR1	RASQSVSYQGDSYMN
SEQ ID NO: 32 (комбинированная)	LCDR2	AASNLAS
SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QSNEDPYT
SEQ ID NO: 86 (Kabat)	LCDR1	RASQSVSYQGDSYMN
SEQ ID NO: 32 (Kabat)	LCDR2	AASNLAS
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QSNEDPYT
SEQ ID NO: 87 (Chothia)	LCDR1	SQSVSYQGDSY
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24	LCDR3	SNEDPY

(Chothia)		
SEQ ID NO: 88	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVSYQGDSYMNWYQQKPGQ APRLLIYAASNLAGIPARFSGSGS GTEFTLTISSLQSEDAAVYYCQQS NEDPYTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 89	ДНК VL	GAAATCGTGCTGACCCAGAGCC CTGCCACCCTGAGTGTGTCTCCA GGCGAGAGAGCCCACTGAGCT GTAGAGCCAGCCAGAGCGTGTG CTACCAGGGCGACAGCTACATG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCCAGGCCCCAGACTGCTGAT CTACGCCGCTTCCAATCTGGCCA GCGGCATCCCCGCCAGATTTTCC GGCTCTGGCTCCGGCACCGAGT TCACCCTGACAATCAGCAGCCT CCAGAGCGAGGACGCCGCCGTG TACTACTGCCAGCAGAGCAACG AGGACCCCTACACCTTTGGCGG AGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
> VK3 G29A		
SEQ ID NO: 90 (комбинированная)	LCDR1	RASQSVSYDADSYMN
SEQ ID NO: 32 (комбинированная)	LCDR2	AASNLAG
SEQ ID NO: 21 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEPDT
SEQ ID NO: 90 (Kabat)	LCDR1	RASQSVSYDADSYMN
SEQ ID NO: 32 (Kabat)	LCDR2	AASNLAG
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QQSNEPDT
SEQ ID NO: 420 (Chothia)	LCDR1	SQSVSYDADSY
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR3	SNEDPT
SEQ ID NO: 91	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVSYDADSYMNWYQQKPGQ APRLLIYAASNLAGIPARFSGSGS

		GTEFTLTISSLQSEDAAVYYCQQS NEDPYTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 92	ДНК VL	GAAATCGTGCTGACCCAGAGCC CTGCCACCCTGAGTGTGTCTCCA GGCGAGAGAGCCACACTGAGCT GTAGAGCCAGCCAGAGCGTGTG CTACGACGCCGACAGCTACATG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCCAGGCCCCAGACTGCTGAT CTACGCCGCTTCCAATCTGGCCA GCGGCATCCCCGCCAGATTTTCC GGCTCTGGCTCCGGCACCGAGT TCACCCTGACAATCAGCAGCCT CCAGAGCGAGGACGCCGCCGTG TACTACTGCCAGCAGAGCAACG AGGACCCCTACACCTTTGGCCG AGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
>hIgG1		
SEQ ID NO: 93	Константная HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
SEQ ID NO: 94	Константная ДНК HC	GCGTCGACCAAGGGCCCCAGCG TGTTCCCCCTGGCCCCAGCAGC AAGAGCACCAGCGGCGGCACAG CCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCTTGAACAGCGGAG CCCTGACCTCCGGCGTGACAC CTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGC AGCGGCCTGTACAGCCTGTCCA GCGTGGTGACAGTGCCAGCAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA

		GAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGC GACAAGACCCACACCTGCCCCC CCTGCCAGCCCCAGAGCTGCT GGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGT TCCCCCCAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCAGGACCCCC GAGGTGACCTGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAGGACCCAGA GGTGAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGA GCAGTACAACAGCACCTACAGG GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT GCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAGGAATACAAGTGAAGGTCT CCAACAAGGCCCTGCCAGCCCC CATCGAAAAGACCATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCC CTCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAACGGCCAGCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTG CTGGACAGCGACGGCAGCTTCT TCCTGTACAGCAAGCTGACCGT GGACAAGTCCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTAGCTGCAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGAGCCTG AGCCTGTCCCCCGGCAAG
>hIgG2		
SEQ ID NO: 95	Константная HC	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKV DKTVERKCCVECPAPPVAGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF

		SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO: 96	Константная НС	ДНК GCCAGCACCAAGGGCCCCAGCG TGTTCCCCCTGGCCCCCTGCAGC AGAAGCACCAGCGAGAGACA GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA AGGACTACTTCCCCGAGCCAGT GACCGTGTCTGGAAACAGCGGA GCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG CAGCGGCCTGTACAGCCTGTCC AGCGTGGTGACCGTGCCAGCA GCAACTTCGGCACCCAGACCTA CACCTGCAACGTGGACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGACCGTGGAGAGGAAGTGCTG CGTGGAGTGCCCCCCTGCCCA GCCCCCAGTGGCCGGACCCT CCGTGTTCTGTCCCCCAAG CCCAAGGACACCCTGATGATCA GCAGGACCCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAGGACCCAGAGGTGCAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGA GGTGCACAACGCCAAGACCAAG CCCAGAGAGGAACAGTTAACA GCACCTTCAGGGTGGTGTCCGT GCTGACCGTGGTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAGGG CCTGCCAGCCCCATCGAGAAA ACCATCAGCAAGACCAAGGGCC AGCCACGGGAGCCCCAGGTGTA CACCTGCCCCCCAGCCGGGAG GAAATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCC AGCCCAGAACTACAAGAC CACCCCCCATGCTGGACAGC GACGGCAGCTTCTCCTGTACA GCAAGCTGACAGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGCAACGTG TTCAGCTGCAGCGTATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCC

		CCCGGCAAG
>hIgG3		
SEQ ID NO: 97	Константная HC	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKV DKRVELKTPPLGDTHTCPRCPEP KSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCP RCPEPKSCDTPPPCPRCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESSGQPENNYNTTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN IFSCVMHEALHNRFTQKSLSLSP GK
SEQ ID NO: 98	Константная HC ДНК	GCCAGACCAAGGGCCCCAGCG TGTTCCCCCTGGCCCCTGCAGC CGGAGACCAAGCGGGCAGCCG CCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGAGCTGGAACAGCGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGACAC CTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGC AGCGGCCTGTACAGCCTGAGCA GCGTGGTGACCGTGCCAGCAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTAC ACCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GCGGGTGGAGCTGAAGACCCCC CTGGGCGACACCACCCACACCT GCCCCGGTGCCCCGAGCCCAA GAGCTGCGACACCCCCCCCCC TGCCCCCGGTGCCCCGAGCCAA AGAGCTGCGACACCCCCCCCCC CTGCCCCCGGTGCCCCGAGCCC AAGAGCTGCGACACCCCCCCCCC CCTGCCCCCGGTGCCCCGCCCC GAGCTGCTGGGCGGCCACAGCG TGTTCTGTTCACCCCCAAGCCC AAGGACACCCCTGATGATCAGCC GGACCCCCGAGGTGACCTGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAG

		GACCCCGAGGTGCAGTTCAAGT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCC CGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CCTTCCGGGTGGTGAGCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTGAGCAACAAGGCCCT GCCCCCCCCATCGAGAAGACC ATCAGCAAGACCAAGGGCCAGC CCCCGGAGCCCCAGGTGTACAC CCTGCCCCCAGCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTGAGCC TGACCTGCCTGGTGAAGGGCTT CTACCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAGCGGCCAGC CCGAGAACAACATAACACCAC CCCCCATGCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGAGCCG GTGGCAGCAGGGCAACATCTTC AGCTGCAGCGTGATGCACGAGG CCCTGCACAACCGGTTACCCA GAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCC GGCAAG
>hIgG4		
SEQ ID NO: 99	Константная HC	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV DKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDL DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLG K
SEQ ID NO: 10	Константная ДНК HC	GCCTTACCAAGGGCCCCAGCG TGTTCCCCCTGGCCCCCTGCAGC AGAAGCACCAAGCGAGAGCACA GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA AGGACTACTTCCCCGAGCCAGT

		GACCGTGCCTGGAACAGCGGA GCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG CAGCGGCTGTACAGCCTGTCC AGCGTGGTGACCGTGCCAGCA GCAGCCTGGGCACCAAGACCTA CACCTGCAACGTGGACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAGGGTGGAGAGCAAGTACG GCCACCCTGCCCCTTTGCCCA GCCCCGAGTTCTGGGCGGAC CCTCCGTGTTCTGTTCCTCC AAGCCAAGGACACCCTGATGA TCAGCAGGACCCCGAGGTGAC CTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CAGGAAGATCCAGAGGTCCAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCCAGAGAGGAACAGTTTA ACAGCACCTACAGGGTGGTGTG CGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA GGCCTGCCAGCTCCATCGAG AAAACCATCAGCAAGGCCAAGG GCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCACCCTCCCAG GAAGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAA GGGCTTCTACCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCCGAGAACAACACTCAA GACCACCCCCCAGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCTGT ACAGCAGGCTGACCGTGGACAA GTCCAGGTGGCAGGAAGGCAAC GTCTTTAGCTGCAGCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGAGCCTGAGCCTG TCCCTGGGCAAG
>hIgG1 LALA		
SEQ ID NO: 101	Константная HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA

		GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
SEQ ID NO: 102	Константная ДНК НС	GCCTCCACCAAGGGTCCATCGG TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGGTGTCGTGGAATCAGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACAC CTTCCCGGCTGTCTACAGTCTT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTTGAGCCAAATCTTGTG ACAAAATCACACATGCCACC GTGCCAGCACCTGAAGCAGCG GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCCAAACCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGG TGGTCAGCGTCCTACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCA TCCCGGGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGA

		GCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA
>hIgG1 N297A		
SEQ ID NO: 103	Константная HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSL SPGK
SEQ ID NO: 104	Константная ДНК HC	GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCG TGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGC AAGTCCACCTCTGGCGGCACCG CCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAA AGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCTGGAACCTGTGCG CCCTGACCTCCGGCGTGCACAC CTTTCCAGCCGTGCTGCAGTCCT CCGGCCTGTACTCCCTGTCTCTCC GTGGTGACCGTGCCCTCTAGCTC TCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCT CCAACACCAAGGTGGACAAGCG GGTGGAAACCAAGTCTGCGAC AAGACCCACACCTGTCCCCCT GCCCTGCCCTGAACTGCTGGG CGGACCTTCCGTGTTCTGTTCC CCCCAAGCCCAAGGACACCCT GATGATCTCCCGACCCCGAA GTGACCTGCGTGGTGGTGGACG TGTCACGAGGACCCTGAAGT

		GAAGTCAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAAAGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCCAGAGAGGAAC AGTACGCCTCCACCTACCGGGT GGTGTCTGTGCTGACCGTGTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAA AGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC ACAAGGCCCTGCCTGCCCCCA TCGAAAAAGACCATCTCCAAGGC CAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCA CAGGTGTACACACTGCCCCCA GCCGGGAAGAGATGACCAAGA ACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTG GTCAAAGGCTTCTACCCCTCCG ATATCGCCGTGGAGTGGGAGTC CAACGGACAGCCCAGAAACAAC TACAAGACCACCCCTGTGC TGGACTCCGACGGCTCATTCTTC CTGTACTCCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGA TGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGTCCCTGTCC CTGAGCCCCGGCAAG
>hIgG1 DAPA		
SEQ ID NO: 105	Константная HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNHYTQKLSL SPGK
SEQ ID NO:106	Константная ДНК HC	GCTAGCACCAAGGGCCCCAGCG TGTTCCCCCTGGCCCCAGCAGC AAGAGCACCAGCGCGGCACAG CCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCTGGAACAGCGGAG

		CCCTGACCTCCGGCGTGACAC CTTCCCCGCGTGTGCAGAGC AGCGGCCTGTACAGCCTGTCCA GCGTGGTGACAGTGCCCAGCAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGC GACAAGACCCACACCTGCCCCC CCTGCCAGCCCCAGAGCTGCT GGGCGGACCCTCCGTGTTCTGT TCCCCCAAGCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCAGGACCCCC GAGGTGACCTGCGTGGTGGTGG CCGTGAGCCACGAGGACCCAGA GGTGAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGA GCAGTACAACAGCACCTACAGG GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGT GCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAGGAATACAAGTGAAGGTCT CCAACAAGGCCCTGGCAGCCCC CATCGAAAAGACCATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCTGCCCCC CTCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCACAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAACGGCCAGCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTG CTGGACAGCGACGGCAGCTTCT TCCTGTACAGCAAGCTGACCGT GGACAAGTCCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTAGCTGCAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCAGAAGAGCCTG AGCCTGTCCCCGGCAAG
>hkappa		
SEQ ID NO: 107	Константная область LC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS TLTLISKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:	ДНК константной	CGTACGGTGGCCGCTCCCAGCG

108	LC	TGTTTCATCTTCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCG CCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAA CAACTTCTACCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA ACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCCCTGACCCT GAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCCTGCGAGG TGACCCACCAGGGCCTGTCCAG CCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
>IL-2		
SEQ ID NO: 109	IL-2 человека	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPT SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFCQSIISTLT
SEQ ID NO: 110	Proleukin® (альдеслейкин)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
>NARA1		
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 19 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYDGD SYMN
SEQ ID NO: 20 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 21 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 111	VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCK ASGYAFTNYLIEWVKQRPGGLE WIGVINPGSGGTNYNEKFKGKAT LTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSA VYFCARWRGDGYYAYFDVWGA

		GTTVTVSS
SEQ ID NO: 112	ДНК VH	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTG GAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGG GACTTCAGTGAAGGTGTCCTGC AAGGCTTCTGGATACGCCTTCA CTAATTACTTGATAGAGTGGGT AAAGCAGAGGCCTGGACAGGGC CTTGAGTGGATTGGAGTGATTA ATCCTGGAAGTGGTGGTACTAA CTACAATGAGAAGTTCAAGGGC AAGCAACACTGACTGCAGACA AATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAGCAGCCTGACATCT GATGACTCTGCGGTCTATTCTG TGCAAGATGGAGGGGGGATGGT TACTACGCGTACTTCGATGTCTG GGGCGCAGGGACCACGGTCACC GTCTCCTCA
SEQ ID NO: 113	VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCK ASQSVDYDGD SYMNWYQQKPG QPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSG SGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQ QSNEDPYTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 114	ДНК VL	GACATTGTGCTGACCCAATCTCC AGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAG GGCAGAGGGCCACCATCTCCTG CAAGGCCAGCCAAAGTGTGAT TATGATGGTGATAGTTATATGA ACTGGTACCAACAGAAACCAGG ACAGCCACCCAACTCCTCATC TATGCTGCATCCAATCTAGAATC TGGGATCCCAGCCAGGTTTAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACT TCACCCTCAACATCCATCCTGTG GAGGAGGAGGATGCTGCAACCT ATTACTGTCAGCAAAGTAATGA GGATCCGTACACGTTCCGAGGG GGGACCAAGCTGGAATAAAA
SEQ ID NO: 115	Тяжелая цепь	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSK ASGYAFTNYLIEWVKQRPGGLE WIGVINPGSGGTNYNEKFKGKAT LTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSA VYFCARWRGDGYAYFDVWGA GTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVC GDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVT LTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL

		YTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQI SWFVNNVEVHTAQTQTHREDYN STLRVVSALPIHQDWMSGKEFK CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVR APQVYVLPPEEEMTKKQVTLTC MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTEL NYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 116	ДНК тяжелой цепи	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTG GAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGG GACTTCAGTGAAGGTGTCCTGC AAGGCTTCTGGATACGCCTCA СТААТТАCTTGATAGAGTGGGT AAAGCAGAGGCCTGGACAGGGC CTTGAGTGGATTGGAGTGATTA ATCCTGGAAGTGGTGGTACTAA CTACAATGAGAAGTTCAAGGGC AAGGCAACACTGACTGCAGACA AATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAGCAGCCTGACATCT GATGACTCTGCGGTCTATTTCTG TGCAAGATGGAGGGGGGATGGT TACTACGCGTACTTCGATGTCTG GGGCGCAGGGACCACGGTCACC GTCTCCTCAGCCAAAACAACAG CCCCATCGGTCTATCCACTGGCC CCTGTGTGTGGAGATACAACTG GCTCCTCGGTGACTCTAGGATG CCTGGTCAAGGGTTATTCCCTG AGCCAGTGACCTTGACCTGGAA CTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTG TGCACACCTTCCCAGCTGTCTG CAGTCTGACCTCTACACCCTCAG CAGCTCAGTGACTGTAACCTCG AGCACCTGGCCCAGCCAGTCCA TCACCTGCAATGTGGCCCACCC GGCAAGCAGCACCAAGGTGGAC AAGAAAATTGAGCCCAGAGGGC CCACAATCAAGCCCTGTCTCC ATGCAAATGCCAGCACCTAAC CTCTTGGGTGGACCATCCGTCTT CATCTTCCCTCAAAGATCAAG

		GATGTACTCATGATCTCCCTGAG CCCCATAGTCACATGTGTGGTG GTGGATGTGAGCGAGGATGACC CAGATGTCCAGATCAGCTGGTT TGTGAACAACGTGGAAGTACAC ACAGCTCAGACACAAAACCCATA GAGAGGATTACAACAGTACTCT CCGGGTGGTCAGTGCCCTCCC ATCCAGCACCAGGACTGGATGA GTGGCAAGGAGTTCAAATGCAA GGTCAACAACAAAGACCTCCCA GCGCCATCGAGAGAACCATCT CAAAACCCAAAGGGTCAGTAAG AGCTCCACAGGTATATGTCTTGC CTCCACCAGAAGAAGAGATGAC TAAGAAACAGGTCACTCTGACC TGCATGGTCACAGACTTCATGC CTGAAGACATTTACGTGGAGTG GACCAACAACGGGAAAAACAGA GCTAAACTACAAGAACACTGAA CCAGTCCTGGACTCTGATGGTTC TTACTTCATGTACAGCAAGCTG AGAGTGGAAAAGAAGAACTGG GTGGAAAAGAAATAGCTACTCCT GTTCAAGTGGTCCACGAGGGTCT GCACAATCACCACACGACTAAG AGCTTCTCCCGACTCCGGGTA AA
SEQ ID NO: 117	Легкая цепь	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCK ASQSVDYDGD SYMNWYQQKPG QPPKLLIYAASNLESGIPARFSGS SGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQ QSNEDPYTFGGGTKLEIKRADAA PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDGSERQNGVL NSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTK DEYERHNSYTCEATHKSTSPIVK SFRNEC
SEQ ID NO: 118	ДНК легкой цепи	GACATTGTGCTGACCCAATCTCC AGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAG GGCAGAGGGCCACCATCTCCTG CAAGGCCAGCCAAAGTGTGAT TATGATGGTGATAGTTATGA ACTGGTACCAACAGAAACCAGG ACAGCCACCCAAACTCCTCATC TATGCTGCATCCAATCTAGAATC

		TGGGATCCCAGCCAGGTTTAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACT TCACCCTCAACATCCATCCTGTG GAGGAGGAGGATGCTGCAACCT ATTACTGTCAGCAAAGTAATGA GGATCCGTACACGTTTCGGAGGG GGGACCAAGCTGGAAATAAAAC GGGCTGATGCTGCACCAACTGT ATCCATCTTCCCACCATCCAGTG AGCAGTTAACATCTGGAGGTGC CTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACA ACTTCTACCCCAAAGACATCAA TGTC AAGTGG AAGATTGATGGC AGTGAACGACAAAATGGCGTCC TGAACAGTTGGACTGATCAGGA CAGCAAAGACAGCACCTACAGC ATGAGCAGCACCCCTCACGTTGA CCAAGGACGAGTATGAACGACA TAACAGCTATACCTGTGAGGCC ACTCACAAGACATCAACTTCAC CCATTGTCAAGAGCTTCAACAG GAATGAGTGT
SEQ ID NO: 119	Консенсусная последовательность HCDR1	X1YLIE
	Вариабельные аминокислоты HCDR1	X1=N или S
SEQ ID NO: 120	Консенсусная последовательность HCDR2	VINPGSGGTNYX1X2X3X4KG
	Вариабельные аминокислоты HCDR2	X1=N или A; X2=E или D; X3=K или S; X4=F или V
SEQ ID NO: 121	Консенсусная последовательность HCDR3	WRGX1X2YYAYFDV
	Вариабельные аминокислоты HCDR3	X1=E, D, A, G или T; X2=G, A, T или S
SEQ ID NO: 122	Консенсусная последовательность LCDR1	X1ASQSVX2YX3X4DSYMN
	Вариабельные аминокислоты LCDR1	X1=R или K; X2=S или D; X3=D, Q, A, G или T; X4=G, T или S

SEQ ID NO: 123	Консенсусная последовательность LCDR2	AASNLXIS
	Вариабельные аминокислоты LCDR2	X1=E или A
>104343		
SEQ ID NO: 124 = SEQ ID NO: 27 + SEQ ID NO: 107	Легкая цепь	DIVLTQSPVLSPLPVTLGQPASISCKA SQSVDYDGDSYMNWYQQRPGQS PRLLIYAASNLESGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQ SNEDPYTFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 125 = SEQ ID NO: 28 + SEQ ID NO: 108	ДНК, кодирующая легкую цепь	GACATCGTGCTGACACAGAGCC CTCTGTCCCTGCCCGTGACCCTG GGCCAGCCTGCCTCCATCTCCTG CAAGGCCTCCAGTCCGTGGAC TACGACGGCGACTCCTACATGA ACTGGTATCAGCAGCGGCCTGG CCAGTCCCCTCGGCTGCTGATCT ACGCCGCTCCAACCTGGAATC CGGCGTGCCCGACAGATTCTCC GGCTCCGGCTCTGGCACCAGCT TCACCCTGAAGATCTCCCGGGT GGAAGCCGAGGACGTGGGCGTG TACTACTGCCAGCAGTCCAACG AGGACCCCTACACCTTCGGCGG AGGCACCAAAGTGAAATCAAG CGTACGGTGGCCGCTCCAGCG TGTTTCATCTTCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCG CCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAA CAACTTCTACCCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA ACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCCCTGACCCT GAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCCTGCGAGG TGACCCACCAGGGCCTGTCCAG CCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC

SEQ ID NO: 126 = SEQ ID NO: 7 + SEQ ID NO: 103	Тяжелая цепь	AGGGGCGAGTGC QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWRGDGYAYFDVWGQ GTTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 127 = SEQ ID NO: 8 + SEQ ID NO: 104	ДНК, кодирующая тяжелую цепь	CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GCGCTGAAGTGAAGAAACCCGG CTCTCCGTGAAAGTGTCTGCA AGGCCTCCGGCTACGCCTCAC CAACTACCTGATCGAGTGGGTC CGACAGGCCCCAGGCCAGGGCC TGGAGTGGATGGGCGTGATCAA CCCTGGCTCCGGCGGCACCAAC TACAACGAGAAGTTCAAGGGCA GAGTGACCATCACCGCCGACAA GTCCACCTCCACCGCCTACATG GAACTGTCCTCCCTGCGGAGCG AGGACACCGCCGTGTACTIONG TGCCCGGTGGCGGGGAGATGGC TACTACGCCTACTTCGACGTGTG GGGCCAGGGCACCACCGTGACC GTGTCTCTGCTAGCACCAAGG GCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCCTCCAGCAAGTCCACCTCTG GCGGCACCGCCGCTCTGGGCTG CCTGGTGAAGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACCGTGTCTGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCCGG CGTGCACACCTTCCAGCCGTGC TGCAGTCTCCGGCCTGACTCC

		CTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCC CTCTAGCTCTCTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCTCCAACACCAAGGT GGACAAGCGGGTGGAACCCAAG TCCTGCGACAAGACCCACACCT GTCCCCCTGCCCTGCCCTGAA CTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTT CCTGTTCCCCCAAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCTCCCGGA CCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGACGTGTCCACGAGGAC CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCCAGA GAGGAACAGTACGCCTCCACCT ACCGGGTGGTGTCTGTGCTGAC CGTGTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAAGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAGGCCCTGCC TGCCCCATCGAAAAGACCATC TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCC GCGAGCCACAGGTGTACACT GCCCCCAGCCGGGAAGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA CCTGTCTGGTCAAAGGCTTCTAC CCCTCCGATATCGCCGTGGAGT GGGAGTCCAACGGACAGCCCGA GAACAACACTACAAGACCACCC CCTGTGCTGGACTCCGACGGCT CATTCTCCTGTA TCCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCCGGTGGC AGCAGGGCAACGTGTTCTCCTG CTCCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAA G
>104348		
SEQ ID NO: 128 = SEQ ID NO: 25 + SEQ ID NO: 107	Легкая цель	AIRLTQSPSSFSASTGDRVITITCKA SQSVDYDGDSYMNWYQQKPGK APKLLIYAASNLESGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQ SNEDPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSSLTSLKA

		DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
SEQ ID NO: 129 = SEQ ID NO: 26 + SEQ ID NO: 108	ДНК, кодирующая легкую цепь	GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCTCCAGTTCTCCGCCTCCACC GGCGACAGAGTGACCATCACAT GCAAGGCCTCCAGTCCGTGGA CTACGACGGCGACTCCTACATG AACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGAT CTACGCCGCCTCCAACCTGGAA TCCGGCGTGCCCTCCCGTTCTC CGGCTCTGGCTCTGGCACCGAC TTCACCCTGACCATCTCCAGCCT GCAGTCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTCCAACG AGGACCCCTACACCTTCGGCGG AGGCACCAAAGTGAAATCAAG CGTACGGTGGCCGCTCCAGCG TGTTTCATCTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCG CCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAA CAACTTCTACCCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA ACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGAGCGTCACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCCCTGACCCT GAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCCTGCGAGG TGACCCACCAGGGCCTGTCCAG CCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
SEQ ID NO: 130 = SEQ ID NO: 17 + SEQ ID NO: 103	Тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARWRGDGYAYFDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

		YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNN YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 131 = SEQ ID NO: 18 + SEQ ID NO: 104	ДНК, кодирующая тяжелую цепь	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTG GCGCTGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGTCCCTGAAGATCTCCTGC AAGGGCTCCGGCTACGCCTCA CCAACCTACCTGATCGAGTGGGT CCGACAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAGTGGATGGGCGTGATCA ACCCCGCTCCGGCGGCACCAA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTCACAATCTCCGCCGACA AGTCCATCTCCACCGCTACCTG CAGTGGTCCTCCCTGAAGGCCT CCGACACCGCCATGTACTIONG CGCCAGATGGCGGGGAGATGGC TACTACGCCTACTTCGACGTGTG GGGCCAGGGCACCACCGTGACC GTGTCCTCTGCTAGCACCAAGG GCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCCTCCAGCAAGTCCACCTCTG GCGGCACCGCCGCTCTGGGCTG CCTGGTGAAGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACCGTGTCTGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCCGG CGTGCACACCTTTCCAGCCGTGC TGCAGTCTCCGGCCTGACTCC CTGTCTCCGTGGTGACCGTGCC CTTAGCTCTCTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCTCCAACACCAAGGT GGACAAGCGGGTGGAACCCAAG TCCTGCGACAAGACCCACACCT GTCCCCCTGCCCTGCCCTGAA CTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTT CCTGTTCCCCCAAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCTCCCGGA CCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGACGTGTCCCACGAGGAC CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCCAGA

		GAGGAACAGTACGCCTCCACCT ACCGGGTGGTGTCTGTGCTGAC CGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAAGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAGGCCCTGCC TGCCCCATCGAAAAGACCATC TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCC GCGAGCCACAGGTGTACACACT GCCCCCAGCCGGGAAGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA CCTGTCTGGTCAAAGGCTTCTAC CCCTCCGATATCGCCGTGGAGT GGGAGTCCAACGGACAGCCCCGA GAACAACACTACAAGACCACCCCC CCTGTGCTGGACTCCGACGGCT CATTCTTCCTGTACTCCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCCGGTGGC AGCAGGGCAACGTGTTCTCCTG CTCCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAA G
SEQ ID NO: 132	Секция эпитопов	GINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNL AQSKNF
>VH- F100dY/N58Y/ T30S		
SEQ ID NO: 133 (комбинирован ная)	HCDR1	GYAFSNYLIE
SEQ ID NO: 134 (комбинирован ная)	HCDR2	VINPGSGGTYNEKFKG
SEQ ID NO: 135 (комбинирован ная)	HCDR3	WRGEGYYAYYDV
SEQ ID NO: 136 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 137 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTYNEKFKG
SEQ ID NO: 138 (Kabat)	HCDR3	WRGEGYYAYYDV
SEQ ID NO: 139 (Chothia)	HCDR1	GYAFSNI
SEQ ID NO: 140 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 141 (Chothia)	HCDR3	WRGEGYYAYYDV
SEQ ID NO: 142 (IMGT)	HCDR1	GYAFSNYL
SEQ ID NO: 143 (IMGT)	HCDR2	INPGSGGT
SEQ ID NO: 144 (IMGT)	HCDR3	ARWRGEGYYAYYDV

SEQ ID NO: 145	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFSNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTYYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARWRGEGYYAYYDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 146	ДНКУН	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTTCA GCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGCGGCACCTA CTACAACGAGAAGTTC AAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTACGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACAGTG ACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 147	Тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFSNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTYYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARWRGEGYYAYYDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL

		MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSFGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 148	ДНК тяжелой цепи	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTCA GCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCTA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTACGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACAGTG ACCGTCAGCTCAGCTAGCACCA AGGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCT GGCCCCAGCAGCAAGAGCACC AGCGGCGGCACAGCCGCCCTGG GCTGCCTGGTGAAGGACTACTT CCCCGAGCCCGTGACCGTGCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCT CCGGCGTGACACCTTCCTCCGC CGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTG TACAGCCTGTCCAGCGTGGTGA CAGTGCCAGCAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCTGCCAG CCCCAGAGCTGCTGGGCGGACC CTCCGTGTTCCTGTTCCTCCCA AGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCGAGGTGACC TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC

		ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCCAGAGAGGAGCAGTACGC CAGCACCTACAGGGTGGTGTCC GTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAATA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCATCGAAA AGACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTG TACACCCTGCCCCCTCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCAGAACAACTACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACA GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTCAAGCTGCAGCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTC CCCCGGAAG
>VH- F100dY/N58Y		
SEQ ID NO: 149 (комбинирован ная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 150 (комбинирован ная)	HCDR2	VINPGSGGTYYNEKFKG
SEQ ID NO: 151 (комбинирован ная)	HCDR3	WRGEGYYAAYDV
SEQ ID NO: 152 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 153 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTYYNEKFKG
SEQ ID NO: 154 (Kabat)	HCDR3	WRGEGYYAAYDV
SEQ ID NO:	HCDR1	GYAFTNY

155 (Chothia)		
SEQ ID NO: 156 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 157 (Chothia)	HCDR3	WRGEGYYAYYDV
SEQ ID NO: 158 (IMGT)	HCDR1	GYAFTNYL
SEQ ID NO: 159 (IMGT)	HCDR2	INPGSGGT
SEQ ID NO: 160 (IMGT)	HCDR3	ARWRGEGYYAYYDV
SEQ ID NO: 161	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTYYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYFCARWRGEGYYAYYDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 162	ДНК VH	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCTA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTACGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACAGTG ACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 163	Тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTYYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYFCARWRGEGYYAYYDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCKDTHC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK

		FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSQSVMEALHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 164	ДНК тяжелой цепи	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCTA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTACGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACAGTG ACCGTCAGCTCAGCTAGCACCA AGGGCCCCAGCGTGTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACC AGCGGCGGCACAGCCGCCCTGG GCTGCCTGGTGAAGGACTACTT CCCCGAGCCCGTGACCGTGCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCT CCGGCGTGACACCTTCCCCGC CGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTG TACAGCCTGTCCAGCGTGGTGA CAGTGCCAGCAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCTGCCAG CCCCAGAGCTGCTGGGCGGACC CTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCA AGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCGAGGTGACC TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTT

		CAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCCAGAGAGGAGCAGTACGC CAGCACCTACAGGGTGGTGTCC GTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAATA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCATCGAAA AGACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTG TACACCCTGCCCCCTCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCCGAGAACAATACTACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACA GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTCACTGCAGCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTC CCCCGGCAAG
>VH- F100dY/T30S		
SEQ ID NO: 165 (комбинирован ная)	HCDR1	GYAFSNYLIE
SEQ ID NO: 166 (комбинирован ная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 167 (комбинирован ная)	HCDR3	WRGEGYYAAYDV
SEQ ID NO: 168 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 169 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 170 (Kabat)	HCDR3	WRGEGYYAAYDV
SEQ ID NO: 171 (Chothia)	HCDR1	GYAFSNY

SEQ ID NO: 172 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 173 (Chothia)	HCDR3	WRGEGYYAYYDV
SEQ ID NO: 174 (IMGT)	HCDR1	GYAFSNYL
SEQ ID NO: 175 (IMGT)	HCDR2	INPGSGGT
SEQ ID NO: 176 (IMGT)	HCDR3	ARWRGEGYYAYYDV
SEQ ID NO: 177	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFSNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARWRGEGYYAYYDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 178	ДНК VH	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTTCA GCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCCGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCAA TTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTACGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACAGTG ACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 179	Тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFSNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARWRGEGYYAYYDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

		ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO: 180	ДНК тяжелой цепи	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTTCA GCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCAA TTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTACGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACAGTG ACCGTCAGCTCAGCTAGCACCA AGGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACC AGCGGCGGCACAGCCGCCCTGG GCTGCCTGGTGAAGGACTACTT CCCCGAGCCCGTGACCGTGTCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCT CCGGCGTGCACACCTTCCCCGC CGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTG TACAGCCTGTCCAGCGTGGTGA CAGTGCCAGCAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCTGCCAG CCCCAGAGCTGCTGGGCGGACC CTCCGTGTTCCTGTTCCTCCCA AGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCGAGGTGACC TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTG

		GAGGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCCAGAGAGGAGCAGTACGC CAGCACCTACAGGGTGGTGTCC GTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAATA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCATCGAAA AGACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTG TACACCCTGCCCCCTCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCAGACAACAATAACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACA GCGACGGCAGCTTCTTCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTGAGCTGCAGCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTC CCCCGGCAAG
>VH-F100dY		
SEQ ID NO: 181 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 182 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 183 (комбинированная)	HCDR3	WRGEGYYAAYDV
SEQ ID NO: 184 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 185 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 186 (Kabat)	HCDR3	WRGEGYYAAYDV
SEQ ID NO: 187 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 188 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG

SEQ ID NO: 189 (Chothia)	HCDR3	WRGEGYYAYYDV
SEQ ID NO: 190 (IMGT)	HCDR1	GYAFTNYL
SEQ ID NO: 191 (IMGT)	HCDR2	INPGSGGT
SEQ ID NO: 192 (IMGT)	HCDR3	ARWRGEGYYAYYDV
SEQ ID NO: 193	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARWRGEGYYAYYDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 194	ДНК VH	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCAA TTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTACGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACAGTG ACCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 195	Тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARWRGEGYYAYYDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ

		PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSQVMHEALHNH YTQKLSLSPGK
SEQ ID NO: 196	ДНК тяжелой цепи	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTTCA CCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGGAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCAA TTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTACGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACAGTG ACCGTCAGCTCAGCTAGCACCA AGGGCCCCAGCGTGTTCCTT GGCCCCAGCAGCAAGAGCACC AGCGGCGGCACAGCCGCCCTGG GCTGCCTGGTGAAGGACTACTT CCCCGAGCCCGTGACCGTGCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCT CCGGCGTGACACCTTCCCCGC CGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTG TACAGCCTGTCCAGCGTGGTGA CAGTGCCAGCAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCTGCCAG CCCCAGAGCTGCTGGGCGGACC CTCCGTGTTCCTGTTCCTCCCA AGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCCGAGGTGACC TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCCAGAGAGGAGCAGTACGC

		CAGCACCTACAGGGTGGTGTCC GTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAATA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCATCGAAA AGACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTG TACACCCTGCCCCCTCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCCGAGAACAATAACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACA GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTGAGCTGCAGCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTC CCCCGGCAAG
>VH- N58Y/T30S		
SEQ ID NO: 197 (комбинированная)	HCDR1	GYAFSNYLIE
SEQ ID NO: 198 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTYYNEKFKG
SEQ ID NO: 199 (комбинированная)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 200 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 201 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTYYNEKFKG
SEQ ID NO: 202 (Kabat)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 203 (Chothia)	HCDR1	GYAFSNY
SEQ ID NO: 204 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO:	HCDR3	WRGEGYYAYFDV

205 (Chothia)		
SEQ ID NO: 206 (IMGT)	HCDR1	GYAFSNYL
SEQ ID NO: 207 (IMGT)	HCDR2	INPGSGGT
SEQ ID NO: 208 (IMGT)	HCDR3	ARWRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 209	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFSNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTYYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARWRGEGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 210	ДНК VH	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTCA GCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCTA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTTCGACGTG TGGGGCCAGGGCACACAGTGA CCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 211	Тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFSNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTYYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARWRGEGYYAYFDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT

		CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSVSMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 212	ДНК тяжелой цепи	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTCA GCAACTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCTA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTION GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTTCGACGTG TGGGGCCAGGGCACCACAGTGA CCGTACAGCTCAGCTAGCACCA GGGCCCCAGCGTGTCCCCCTG GCCCCAGCAGCAAGAGCACCA GCGGCGGCACAGCCGCCCTGGG CTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCCCGAGCCCGTGACCGTGTCT GGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGCACACCTTCCCCGCC GTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGT ACAGCCTGTCCAGCGTGGTGAC AGTGCCAGCAGCAGCCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAAGCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCTGCCAG CCCCAGAGCTGCTGGGCGGACC CTCCGTGTTCTGTCCCCC AGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCCGAGGTGACC TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCCAGAGAGGAGCAGTACGC CAGCACCTACAGGGTGGTGTCC

		GTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAATA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCATCGAAA AGACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTG TACACCCTGCCCCCTCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCAGAACTACAAG ACCACCCCCAGTGTGGACA GCGACGGCAGTTCTTCCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTCAGCTGCAGCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTC CCCCGCAAG
>VH-N58Y		
SEQ ID NO: 213 (комбинированная)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 214 (комбинированная)	HCDR2	VINPGSGGTYYNEKFKG
SEQ ID NO: 215 (комбинированная)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 216 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 217 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTYYNEKFKG
SEQ ID NO: 218 (Kabat)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 219 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 220 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 221 (Chothia)	HCDR3	WRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO:	HCDR1	GYAFTNYL

222 (IMGT)		
SEQ ID NO: 223 (IMGT)	HCDR2	INPGSSGT
SEQ ID NO: 224 (IMGT)	HCDR3	ARWRGEGYYAYFDV
SEQ ID NO: 225	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTYYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARWRGEGYYAYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 226	ДНК VH	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTTCA CCAACCTACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCTA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTTCGACGTG TGGGGCCAGGGCACACAGTGA CCGTCAGCTCA
SEQ ID NO: 227	Тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTYYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARWRGEGYYAYFDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD

		KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 228	ДНК тяжелой цепи	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTCA CCTAACCTGATCGAGTGGGT GCGCCAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGCGGCACCTA CTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTTCGACGTG TGGGGCCAGGGCACCACAGTGA CCGTCAGCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTCCCCCTG GCCCCAGCAGCAAGAGCACCA GCGGCGGCACAGCCGCCCTGGG CTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCCGAGCCCGTGACCGTGTCT GGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGCACACCTTCCCCGCC GTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGT ACAGCCTGTCCAGCGTGGTGAC AGTGCCAGCAGCAGCCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAAGCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCTGCCAG CCCCAGAGCTGCTGGGCGGACC CTCCGTGTCTGTCCCCCCTCA AGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCCGAGGTGACC TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCCAGAGAGGAGCAGTACGC CAGCACCTACAGGGTGGTGTCC GTGCTGACCGTGTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAATA

		CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCATCGAAA AGACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTG TACACCCTGCCCCCTCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCAGAACAACTACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACA GCGACGGCAGCTTCTTCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTGAGCTGCAGCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTC CCCCGGCAAG
>104348_VH5D 98E_VK1D28Q тяжелой цепи		
SEQ ID NO: 229	Тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYAFTNYLIEWVRQMPGKGLE WMGVINPGSGGTNYNEKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYICARWRGEGYYAYFDVWQ GTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 230	ДНК тяжелой цепи	GAGGTGCAATTGGTGCAGAGCG GAGCCGAAGTGAAGAAGCCCGG CGAGAGCCTGAAGATCAGCTGC AAGGGCAGCGGCTACGCCTTCA CCAACCTACCTGATCGAGTGGGT

		GCGCCAGATGCCCGGCAAGGGC CTGGAATGGATGGGCGTGATCA ATCCTGGCAGCGGGCGCACCAA TTACAACGAGAAGTTCAAGGGC CAAGTGACCATCAGCGCCGACA AGAGCATCAGCACCGCTACCT CCAGTGGTCCAGCCTGAAGGCC AGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCAGGTGGCGGGGAGAGG GCTACTACGCCTACTTCGACGTG TGGGGCCAGGGCACCACAGTGA CCGTACAGCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTCCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCA GCGGCGGCACAGCCGCCCTGGG CTGCCTGGTGAAGGACTACTTC CCCAGCCCCTGACCGTGTCTCT GGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGACACCTTCCCCGCC GTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGT ACAGCCTGTCCAGCGTGGTGAC AGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCTGCCAG CCCCAGAGCTGCTGGGCGGACC CTCCGTGTTCTGTTCCCCC AGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCCGAGGTGACC TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCCAGAGAGGAGCAGTACGC CAGCACCTACAGGGTGGTGTCC GTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAATA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCATCGAAA AGACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTG TACACCCTGCCCCCTCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG
--	--	--

		GGCTTCTACCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACAAG ACCACCCCGAGTGTGGACA GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTGAGCTGCAGCGTATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTC CCCCGGCAAG
>VK-A50S		
SEQ ID NO: 231 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVDYQGDSYMN
SEQ ID NO: 232 (комбинированная)	LCDR2	SASNLES
SEQ ID NO: 233 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEPDT
SEQ ID NO: 234 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYQGDSYMN
SEQ ID NO: 235 (Kabat)	LCDR2	SASNLES
SEQ ID NO: 236 (Kabat)	LCDR3	QQSNEPDT
SEQ ID NO: 237 (Chothia)	LCDR1	SQSVDYQGDY
SEQ ID NO: 238 (Chothia)	LCDR2	SAS
SEQ ID NO: 239 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 240 (IMGT)	LCDR1	QSVDYQGDY
SEQ ID NO: 241 (IMGT)	LCDR2	SAS
SEQ ID NO: 242 (IMGT)	LCDR3	QQSNEPDT
SEQ ID NO: 243	VL	AIRLTQSPSSFSASTGDRVTITCKA SQSVDYQGDYMNWYQQKPGK APKLLIYSASNLESGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQS

SEQ ID NO: 244	ДНК VL	NEDPYTFGGGTKVEIK GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCAGCAGCTTTAGCGCCAGCAC CGGCGACAGAGTGACCATCACA TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACCAGGGCGACAGCTACAT GAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGA TCTACTCCGCCAGCAATCTGGA AAGCGGCGTGCCAGCAGATTC AGCGGCTCTGGCAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACAATCAGCAG CCTCCAGTCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTTGG CGGAGGCACCAAGGTGGAAATC AAG
SEQ ID NO: 245	Легкая цепь	AIRLTQSPSSFSASTGDRVITITCKA SQSVDYQGDSYMNWYQQKPGK APKLLIYSASNLESGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQSEDFATYYCQQS NEDPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTK SFNRGEC
SEQ ID NO: 246	ДНК легкой цепи	GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCAGCAGCTTTAGCGCCAGCAC CGGCGACAGAGTGACCATCACA TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACCAGGGCGACAGCTACAT GAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGA TCTACTCCGCCAGCAATCTGGA AAGCGGCGTGCCAGCAGATTC AGCGGCTCTGGCAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACAATCAGCAG CCTCCAGTCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTTGG CGGAGGCACCAAGGTGGAAATC AAGCGTACGGTGGCCGCTCCCA GCGTGTTTCATCTCCCCCCCAGC GACGAGCAGCTGAAGAGCGGCA CCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT

		GAACAATTCTACCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGGAAGGTGG ACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGAC CCTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCATAAGGTGTACGCCTGCG AGGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
>VK-A50T		
SEQ ID NO: 247 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVDYQGDSYMN
SEQ ID NO: 248 (комбинированная)	LCDR2	TASNLES
SEQ ID NO: 249 (комбинированная)	LCDR3	QQSNEPYPY
SEQ ID NO: 250 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYQGDSYMN
SEQ ID NO: 251 (Kabat)	LCDR2	TASNLES
SEQ ID NO: 252 (Kabat)	LCDR3	QQSNEPYPY
SEQ ID NO: 253 (Chothia)	LCDR1	SQSVDYQGDSY
SEQ ID NO: 254 (Chothia)	LCDR2	TAS
SEQ ID NO: 255 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 256 (IMGT)	LCDR1	QSVDYQGDSY
SEQ ID NO: 257 (IMGT)	LCDR2	TAS
SEQ ID NO: 258 (IMGT)	LCDR3	QQSNEPYPY
SEQ ID NO: 259	VL	AIRLTQSPSSFSASTGDRVTITCKA SQSVDYQGDSYMNWYQQKPGK APKLLIYTASNLESGVPSRFGSG SGTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQ

SEQ ID NO: 260	ДНК VL	SNEDPYTFGGGTKVEIK GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCAGCAGCTTTAGCGCCAGCAC CGGCGACAGAGTGACCATCACA TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACCAGGGCGACAGCTACAT GAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGA TCTACACCGCCAGCAATCTGGA AAGCGGCGTGCCAGCAGATTC AGCGGCTCTGGCAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACAATCAGCAG CCTCCAGTCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTTGG CGGAGGCACCAAGGTGGAATC AAG
SEQ ID NO: 261	Легкая цепь	AIRLTQSPSSFSASTGDRVITITCKA SQSVQDYQGDSYMNWYQQKPGK APKLLIYTASNLESGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQ SNEDPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTK SFNRGEC
SEQ ID NO: 262	ДНК легкой цепи	GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCAGCAGCTTTAGCGCCAGCAC CGGCGACAGAGTGACCATCACA TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACCAGGGCGACAGCTACAT GAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGA TCTACACCGCCAGCAATCTGGA AAGCGGCGTGCCAGCAGATTC AGCGGCTCTGGCAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACAATCAGCAG CCTCCAGTCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTTGG CGGAGGCACCAAGGTGGAATC AAGCGTACGGTGGCCGCTCCCA GCGTGTTTCATCTCCCCCAGC GACGAGCAGCTGAAGAGCGGCA CCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT

		GAACAATTCTACCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGAAGGTGG ACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGAC CCTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCATAAGGTGTACGCCTGCG AGGTGACCCACCAAGGCTGTC CAGCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
>VK- M33L/A50S		
SEQ ID NO: 263 (комбинирован ная)	LCDR1	KASQSVDYQGDSYLN
SEQ ID NO: 264 (комбинирован ная)	LCDR2	SASNLES
SEQ ID NO: 265 (комбинирован ная)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 266 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYQGDSYLN
SEQ ID NO: 267 (Kabat)	LCDR2	SASNLES
SEQ ID NO: 268 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 269 (Chothia)	LCDR1	SQSVDYQGDSY
SEQ ID NO: 270 (Chothia)	LCDR2	SAS
SEQ ID NO: 271 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 272 (IMGT)	LCDR1	QSVDYQGDSY
SEQ ID NO: 273 (IMGT)	LCDR2	SAS
SEQ ID NO: 274 (IMGT)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 275	VL	AIRLTQSPSSFSASTGDRVTITCKA SQSVDYQGDSYLNWYQQKPGKA PKLLIYSASNLESGVPSRFSGSGSG

		TDFTLTISSLQSEDFATYYCQSN EDPYTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 276	ДНК VL	GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCAGCAGCTTTAGCGCCAGCAC CGGCGACAGAGTGACCATCACA TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACCAGGGCGACAGCTACCT GAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGA TCTACTCCGCCAGCAATCTGGA AAGCGGCGTGCCAGCAGATTC AGCGGCTCTGGCAGCGGCACCG ACTTACCCTGACAATCAGCAG CCTCCAGTCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTTGG CGGAGGCACCAAGGTGGAATC AAG
SEQ ID NO: 277	Легкая цепь	AIRLTQSPSSFSASTGDRVTITCKA SQSVDYQGDSYLNWYQKPGKA PKLLIYSASNLESGVPSRFSGSGG TDFTLTISSLQSEDFATYYCQSN EDPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY BREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
SEQ ID NO: 278	ДНК легкой цепи	GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCAGCAGCTTTAGCGCCAGCAC CGGCGACAGAGTGACCATCACA TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACCAGGGCGACAGCTACCT GAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGA TCTACTCCGCCAGCAATCTGGA AAGCGGCGTGCCAGCAGATTC AGCGGCTCTGGCAGCGGCACCG ACTTACCCTGACAATCAGCAG CCTCCAGTCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTTGG CGGAGGCACCAAGGTGGAATC AAGCGTACGGTGGCCGCTCCCA GCGTGTTTCATCTCCCCCAGC GACGAGCAGCTGAAGAGCGGCA

		CCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAACCTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG ACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGAC CCTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCATAAAGGTGTACGCCTGCG AGGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
>VK-M33L		
SEQ ID NO: 279 (комбинированная)	LCDR1	KASQSVDYQGDSYLN
SEQ ID NO: 280 (комбинированная)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 281 (комбинированная)	LCDR3	QSNEDPYT
SEQ ID NO: 282 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYQGDSYLN
SEQ ID NO: 283 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 284 (Kabat)	LCDR3	QSNEDPYT
SEQ ID NO: 285 (Chothia)	LCDR1	SQSVDYQGDSY
SEQ ID NO: 386 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 387 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 388 (IMGT)	LCDR1	QSVDYQGDSY
SEQ ID NO: 389 (IMGT)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 390 (IMGT)	LCDR3	QSNEDPYT
SEQ ID NO: 391	VL	AIRLTQSPSSFSASTGDRVTITCKA SQSVDYQGDSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGS

		GTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQS NEDPYTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 392	ДНК VL	GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCAGCAGCTTTAGCGCCAGCAC CGGCGACAGAGTGACCATCACA TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACAGGGCGACAGCTACCT GAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCAAGCTGCTGA TCTACGCCGCCAGCAATCTGGA AAGCGGCGTGCCAGCAGATTC AGCGGCTCTGGCAGCGGCACCG ACTTACCCTGACAATCAGCAG CCTCCAGTCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTTGG CGGAGGCACCAAGGTGGAATC AAG
SEQ ID NO: 393	Легкая цепь	AIRLTQSPSSFSASTGDRVTITCKA SQSVDYQGDSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQS NEDPYTFGGGKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
SEQ ID NO: 394	ДНК легкой цепи	GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCAGCAGCTTTAGCGCCAGCAC CGGCGACAGAGTGACCATCACA TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACAGGGCGACAGCTACCT GAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCAAGCTGCTGA TCTACGCCGCCAGCAATCTGGA AAGCGGCGTGCCAGCAGATTC AGCGGCTCTGGCAGCGGCACCG ACTTACCCTGACAATCAGCAG CCTCCAGTCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTTGG CGGAGGCACCAAGGTGGAATC AAGCGTACGGTGGCCGCTCCCA GCGTGTTTCATCTCCCCCAGC GACGAGCAGCTGAAGAGCGGCA

		CCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAACCTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG ACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGAC CCTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCATAAAGGTGTACGCCTGCG AGGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
>104348_VH5D 98E_VK1D28Q легкой цепи		
SEQ ID NO: 395 = SEQ ID NO: 70 + SEQ ID NO: 107	Легкая цепь	AIRLTQSPSSFSASTGDRVITICKA SQSVDYQGDSYMNWYQQKPGK APKLLIYAASNLESGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQ SNEDPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
SEQ ID NO: 396	ДНК легкой цепи	GCCATCAGACTGACCCAGAGCC CCAGCAGCTTTAGCGCCAGCAC CGGCGACAGAGTGACCATCACA TGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACCAGGGCGACAGCTACAT GAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGA TCTACGCCCGCCAGCAATCTGGA AAGCGGCGTGCCAGCAGATTC AGCGGCTCTGGCAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACAATCAGCAG CCTCCAGTCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGCCAGCAGAGCA ACGAGGACCCCTACACCTTGG CGGAGGCACCAAGGTGGAATC AAGCGTACGGTGGCCGCTCCCA GCGTGTTTCATCTTCCCCCAGC GACGAGCAGCTGAAGAGCGGCA CCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAACCTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG

			ACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCCCTGAC CCTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCATAAGGTGTACGCCTGCG AGGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
>Линкеры			
SEQ ID NO:	(G4S)3		GGGGSGGGGSGGGGS
397			
SEQ ID NO:	(G4S)4		GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
398			
SEQ ID NO:	(G4S)5		GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
399			GGGGS
SEQ ID NO:	(G4S)6		GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
400			GGGGS
SEQ ID NO:	(G4S)7		GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
401			GGGGS
SEQ ID NO:	(G4S)8		GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
402			GGGGS
SEQ ID NO:	(G4S)9		GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
403			GGGGS
SEQ ID NO:	(G3S)4		GGGSGGGSGGGSGGGGS
404			
SEQ ID NO:	(G3S)5		GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
405			
SEQ ID NO:	(G3S)6		GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
406			GS
SEQ ID NO:	(G3S)7		GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
407			GS
SEQ ID NO:	(G3S)8		GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
408			GS
SEQ ID NO:	(G3S)9		GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
409			GS
SEQ ID NO:	(G3S)10		GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
410			GS
SEQ ID NO:	(G3S)11		GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
411			GS
SEQ ID NO:	G4		GGGG
412			
>Слияния			
SEQ ID NO:	IL-2-(G4S) ₃ -	L	ATGTACAGGATGCAACTCCTGT
413 (ДНК без	(NARA1)		CTTGCATTGCACTAAGTCTTGCA

сигнального пептида)		CTTGTCACAAACAGTGCACCTA CTTCAAGTTCTACAAAGAAAAC ACAGCTACAACCTGGAGCATTTA CTTCTGGATTACAGATGATTTT GAATGGAATTAATAATTACAAG AATCCCAAACCTACCAGGATGC TCACATTTAAGTTTTACATGCC AGAAGGCCACAGAAGTAAAAC ATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGA ACTCAAACCTCTGGAGGAAGTG CTAAATTTAGCTCAAAGCAAAA ACTTTCACCTAAGACCCAGGGA CTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAAGTAAAGGGAT CTGAAACAACATTCATGTGTGA ATATGCTGATGAGACAGCAACC ATTGTAGAATTTCTGAACAGAT GGATTACCTTTGTCAAAGCATC ATCTCAACACTGACTGGCGGGG GAGGTTCTGGCGGTGGGGGATC GGGCGGTGGAGGGAGCGACATT GTGCTGACCCAATCTCCAGCTTC TTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGA GGGCCACCATCTCCTGCAAGGC CAGCCAAAGTGTTGATTATGAT GGTGATAGTTATATGAACTGGT ACCAACAGAAACCAGGACAGCC ACCCAAACTCCTCATCTATGCTG CATCCAATCTAGAATCTGGGAT CCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGT GGGTCTGGGACAGACTTCACCC TCAACATCCATCCTGTGGAGGA GGAGGATGCTGCAACCTATTAC TGTCAGCAAAGTAATGAGGATC CGTACACGTTCCGAGGGGGGAC CAAGCTGGAAATAAAAACGGGCT GATGCTGCACCAACTGTATCCA TCTTCCCACCATCCAGTGAGCA GTTAACATCTGGAGGTGCCTCA GTCGTGTGCTTCTGAACAACCT CTACCCCAAAGACATCAATGTC AAGTGGAAGATTGATGGCAGTG AACGACAAAATGGCGTCCTGAA CAGTTGGACTGATCAGGACAGC AAAGACAGCACCTACAGCATGA GCAGCACCTCACGTTGACCAA
----------------------	--	---

			GGACGAGTATGAA
SEQ ID NO: 414 (ДНК без сигнального пептида)	IL-2-(G4S) ₄ - (NARA1)	L	ATGTACAGGATGCAACTCCTGT CTTGCATTGCACTAAGTCTTGCA CTTGTACAAAACAGTGCACCTA CTTCAAGTTCTACAAAAGAAAAC ACAGCTACAACCTGGAGCATTTA CTTCTGGATTACAGATGATTTT GAATGGAATTAATAATTACAAG AATCCCAAACCTACCAGGATGC TCACATTTAAGTTTTACATGCC AAGAAGGCCACAGAAGTGAAC ATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGA ACTCAAACCTCTGGAGGAAGTG CTAAATTTAGCTCAAAGCAAAA ACTTTCACCTAAGACCCAGGGA CTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAACATAAGGGAT CTGAAACAACATTCATGTGTGA ATATGCTGATGAGACAGCAACC ATTGTAGAATTTCTGAACAGAT GGATTACCTTTTGTCAAAGCATC ATCTCAACACTGACTGGCGGTG GGGGATCAGGGGGCGGAGGTTC TGGAGGTGGCGGGTCGGGGGA GGTGGGAGCGACATTGTGCTGA CCCAATCTCCAGCTCTTTGGCT GTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCA CCATCTCCTGCAAGGCCAGCCA AAGTGTGATTATGATGGTGAT AGTTATATGAACTGGTACCAAC AGAAACCAGGACAGCCACCCAA ACTCCTCATCTATGCTGCATCCA ATCTAGAATCTGGGATCCAGC CAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACCCTCAACA TCCATCCTGTGGAGGAGGAGGA TGCTGCAACCTATTACTGTCAGC AAAGTAATGAGGATCCGTACAC GTTCCGAGGGGGGACCAAGCTG GAAATAAAACGGGCTGATGCTG CACCAACTGTATCCATCTTCCCA CCATCCAGTGAGCAGTTAACAT CTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTG CTTCTTGAACAACCTTCTACCCCA AAGACATCAATGTCAAGTGGAA GATTGATGGCAGTGAACGACAA

			AATGGCGTCCTGAACAGTTGGA CTGATCAGGACAGCAAAGACAG CACCTACAGCATGAGCAGCACC CTCACGTTGACCAAGGACGAGT ATGAACGACATAACAGCTATAC CTGTGAGGCCACTCACAAGACA TCAACTTCACCCATTGTCAAGA GCTTCAACAGGAATGAGTGT
SEQ ID NO: 415 (ДНК без сигнального пептида)	IL-2-(G4S) ₅ - (NARA1)	L	ATGTACAGGATGCAACTCCTGT CTTGCATTGCACTAAGTCTTGCA CTTGTCAAAACAGTGCACCTA CTTCAAGTTCTACAAAAGAAAAC ACAGCTACAACCTGGAGCATTTA CTTCTGGATTACAGATGATTTT GAATGGAATTAATAATTACAAG AATCCCAAACCTACCAGGATGC TCACATTTAAGTTTACATGCC AAGAAGGCCACAGAACTGAAAC ATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGA ACTCAAACCTCTGGAGGAAGTG CTAAATTTAGCTCAAAGCAAAA ACTTTCACTTAAGACCCAGGGA CTTAATCAGCAATATCAACGTA ATAGTTCTGGAACTAAAGGGAT CTGAAACAACATTCATGTGTGA ATATGCTGATGAGACAGCAACC ATTGTAGAATTTCTGAACAGAT GGATTACCTTTTGTCAAAGCATC ATCTCAACACTGACTGGCGGTG GGGGATCAGGGGGCGGAGGTTT TGGAGGTGGCGGGTCTGGGGGGA GGTGGGAGCGGTGGCGGGGGAT CAGACATTGTGCTGACCCAATC TCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTC TAGGGCAGAGGGCCACCATCTC CTGCAAGGCCAGCCAAAGTGT GATTATGATGGTGATAGTTATAT GAACTGGTACCAACAGAAACCA GGACAGCCACCCAAACTCCTCA TCTATGCTGCATCCAATCTAGAA TCTGGGATCCCAGCCAGGTTTA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA CTTACCCTCAACATCCATCCTG TGGAGGAGGAGGATGCTGCAAC CTATTACTGTCAGCAAAGTAAT GAGGATCCGTACACGTTCTGGAG

			GGGGACCAAGCTGGAAATAAA ACGGGCTGATGCTGCACCAACT GTATCCATCTCCCACCATCCAG TGAGCAGTTAACATCTGGAGGT GCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAA CAACTTCTACCCCAAAGACATC AATGTCAAGTGGAAAGATTGATG GCAGTGAACGACAAAATGGCGT CCTGAACAGTTGGACTGATCAG GACAGCAAAGACAGCACCTACA GCATGAGCAGCACCTCACGTT GACCAAGGACGAGTATGAACGA CATAACAGCTATACCTGTGAGG CCACTACAAGACATCAACTC ACCATTTGTCAAGAGCTTCAAC AGGAATGAGTGT
SEQ ID NO: 416	IL-2-(G4S) ₃ - (NARA1)	L	A P T S S S T K K T Q L Q L E H L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F C Q S I I S T L T G G G G S G G G G S G G G G S D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y M N W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y A A S N L E S G I P A R F S G S G S G T D F T L N I H P V E E E D A A T Y Y C Q Q S N E D P Y T F G G G T K L E I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D Q D S K D S T Y S M S T L T L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S F N R N E C
SEQ ID NO: 417	IL-2-(G4S) ₄ - (NARA1)	L	A P T S S S T K K T Q L Q L E H L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F C Q S I I S T L T G G G G S

		GGGGSGGGSGGGSDI VLTQSPASLA VSLGQRA TISCKASQSV DYGDSY MNWYQQKPGQPPKLLI YAASNLESGIPARFSGS GSGTDFTLNIHPVEEED AATYYCQQSNEDPYTFG GGTKLEIKRADAAPT V S IFPPSSEQLTSGGASVVC FLNNFYPKDINVKWKID GSE RQNGVLNSWTDQD SKDSTYSMSSTLTLTKD EYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC
SEQ ID NO: 418	IL-2-(G4S) ₅ - L (NARA1)	APTSSSTKKTQLQLEHL LLDLQMILNGINNYKNP KLTRMLTFKIFYMPK KAT ELKHLQCLEEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNR WITFCQSIISTLTGGGGS GGGGSGGGSGGGSGG GGGSDIVLTQSPASLAV SLGQRATISCKASQSV D YDGDSYMNWYQQKPGQ PPKLLIYAASNLESGIPA RFSGSGSGTDFTLNIHPV EEEDAATYYCQQSNEDP YTFGGGTKLEIKRADA A PTVSIFFPPSSEQLTSGGA SVVCF LNNFYPKDINVK WKIDGSE RQNGVLNSW TDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEAT HKTSTSPIVKSFNRNEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связывают IL-2 человека в соответствии с SEQ ID NO: 109, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат переменную область легкой цепи, которая содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и переменную область тяжелой цепи, которая содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и при этом LCDR1 предусматривает SEQ ID NO: 122; при этом LCDR2 предусматривает SEQ ID NO: 123; при этом LCDR3 предусматривает SEQ ID NO: 21; при этом HCDR1 предусматривает SEQ ID NO: 119; при этом HCDR2 предусматривает SEQ ID NO: 120; и при этом HCDR3 предусматривает SEQ ID NO: 121.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат

переменную область легкой цепи, которая содержит

LCDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 90;

LCDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 32;

LCDR3, изложенную в SEQ ID NO: 21, и

переменную область тяжелой цепи, которая содержит

HCDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 13;

HCDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 12; и

HCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 45.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1 или 2, где

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 4, 2 и 3 соответственно; или

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 31, 32 и 21 соответственно и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 4, 2 и 3 соответственно; или

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 19, 20 и 21 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 13, 12 и 3; или

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 31, 32 и 21 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 13, 12 и 3; или

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 69, 20 и 21 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3

представляют собой SEQ ID NO: 4, 2 и 3 соответственно; или

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой 4, 2 и 36 соответственно; и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 69, 20 и 21 соответственно и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой 4, 2 и 36 соответственно.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, где переменная область тяжелой цепи (VH) и переменная область легкой цепи (VL) характеризуются по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотными последовательностями

VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 7; или
 VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 7; или
 VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 7; или
 VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 15; или
 VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 15; или
 VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 15; или
 VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 17; или
 VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 17; или
 VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 17; или
 VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 7; или
 VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 37; или
 VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 37; или
 VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 7; или
 VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 37; или
 VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 37; или
 VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 17; или
 VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 49; или
 VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 49; или
 VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 17; или
 VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 49; или
 VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 49.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.4, где переменная область тяжелой цепи (VH) и переменная область легкой цепи (VL) имеют аминокислотные последовательности

VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 7; или
 VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 7; или
 VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 7; или
 VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 15; или
 VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 15; или
 VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 15; или
 VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 17; или
 VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 17; или
 VL, SEQ ID NO: 34; VH, SEQ ID NO: 17; или
 VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 7; или
 VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 37; или
 VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 37; или
 VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 7; или
 VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 37; или
 VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 37; или
 VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 17; или
 VL, SEQ ID NO: 25; VH, SEQ ID NO: 49; или
 VL, SEQ ID NO: 70; VH, SEQ ID NO: 49; или
 VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 17; или
 VL, SEQ ID NO: 27; VH, SEQ ID NO: 49; или
 VL, SEQ ID NO: 79; VH, SEQ ID NO: 49.

6. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, содержащее Fc-домен, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 105.

7. Выделенное антитело по п.6, содержащее Fc-домен в соответствии с SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103 или SEQ ID NO: 105.

8. Выделенное антитело по п.7, содержащее легкую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 124 и тяжелую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 126 или легкую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 128 и тяжелую цепь в соответствии с SEQ ID NO: 130.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из предыдущих пунктов, которые связываются с эпитопом интерлейкина-2 человека (hIL-2), который содержит аминокислоты

K52, P54, K55, T57, R58, T61, F62, K63, Q94 и K96.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.9, где антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с аминокислотами K52, P54, K55, T57, R58, T61, F62, K63, Q94 и K96.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.10, где эпитоп дополнительно содержит какую-либо одну или более из аминокислот N50, N53, N91, L92, A93 и N97.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.11, где антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с аминокислотами N50, K52, N53, P54, K55, T57, R58, T61, F62, K63, N91, L92, A93, Q94, K96 и N97.

13. Композиция для лечения различных нарушений, включающих раковые заболевания и/или хронический вирусный гепатит, содержащая антитело по любому из предыдущих пунктов и IL-2 человека и фармацевтически приемлемый носитель, где рак выбран из группы, состоящей из метастатической злокачественной меланомы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, гормональной рефрактерной аденокарциномы предстательной железы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, нейробластомы, рака печени, гепатокарциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака тонкого кишечника, рака пищевода, саркомы, аденокарциномы, рака эндокринной системы, воспалительной миофибробластической опухоли, миеломы, лейкемии или лимфомы, включая В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз; одного или более хронических лейкозов, включая хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз.

14. Композиция по п.13, где IL-2 человека выбран из группы, состоящей из IL-2 человека в соответствии с SEQ ID NO: 109 или альдеслейкина в соответствии с SEQ ID NO: 110.

15. Слитый белок, связывающий CD122, содержащий антитело по любому из пп.1-12 и IL-2 человека.

16. Слитый белок по п.15, где антитело и IL-2 человека соединены линкерной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 397, SEQ ID NO: 398, SEQ ID NO: 399, SEQ ID NO: 400, SEQ ID NO: 401, SEQ ID NO: 402, SEQ ID NO: 403, SEQ ID NO: 404, SEQ ID NO: 405, SEQ ID NO: 406, SEQ ID NO: 407, SEQ ID NO: 408, SEQ ID NO: 409, SEQ ID NO: 410 и SEQ ID NO: 411.

17. Слитый белок по п.16, где линкерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 405 или SEQ ID NO: 407.

18. Слитый белок по п.15, где LCDR1 антитела содержит остаток Y27 и остаток D30 в соответствии с определением согласно Kabat, при этом остаток Y27 соединен с остатком N97 IL-2 человека посредством GG-линкера и при этом остаток D30 соединен с остатком K96 IL-2 человека посредством линкера в соответствии с SEQ ID NO: 412.

19. Применение антитела или его антиген-связывающей части по любому из пп.1-12 в качестве лекарственного препарата для лечения различных нарушений, включающих раковые заболевания и/или хронический вирусный гепатит, где рак выбран из группы, состоящей из метастатической злокачественной меланомы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, гормональной рефрактерной аденокарциномы предстательной железы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, нейробластомы, рака печени, гепатокарциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака тонкого кишечника, рака пищевода, саркомы, аденокарциномы, рака эндокринной системы, воспалительной миофибробластической опухоли, миеломы, лейкемии или лимфомы, включая В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз; одного или более хронических лейкозов, включая хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз.

20. Применение композиции по любому из пп.13, 14 в качестве лекарственного препарата для лечения различных нарушений, включающих раковые заболевания и/или хронический вирусный гепатит, где рак выбран из группы, состоящей из метастатической злокачественной меланомы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, гормональной рефрактерной аденокарциномы предстательной железы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, нейробластомы, рака печени, гепатокарциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака тонкого кишечника, рака пищевода, саркомы, аденокарциномы, рака эндокринной системы, воспалительной миофибробластической опухоли, миеломы, лейкемии или лимфомы, включая В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз; одного или более хронических лейкозов, включая хронический миелолейкоз, хронический лимфолейкоз.

21. Применение слитого белка по любому из пп.15-18 в качестве лекарственного препарата для лечения различных нарушений, включающих раковые заболевания и/или хронический вирусный гепатит, где рак выбран из группы, состоящей из метастатической злокачественной меланомы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, гормональной рефрактерной аденокарциномы предстательной железы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, нейробластомы, рака печени, гепатокарциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака

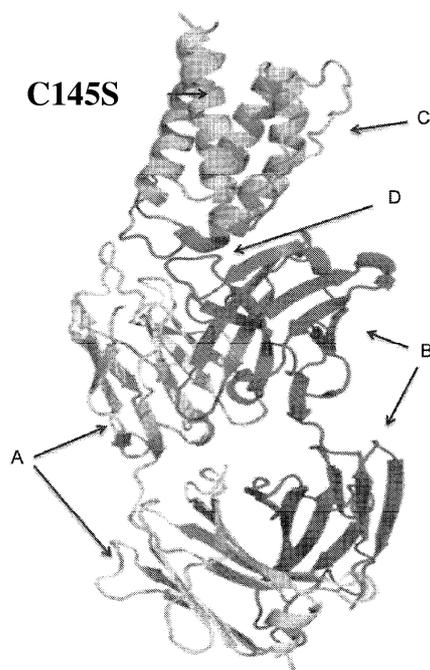
кишечника, рак пищевода, саркому, аденокарциному, рак эндокринной системы, воспалительную миофибробластическую опухоль, миелому, лейкемию или лимфому, включая В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз; один или более хронических лейкозов, включая хронический миелолейкоз и/или хронический лимфолейкоз.

28. Способ лечения рака путем введения антитела по любому из пп.1-12, или композиции по любому из пп.13, 14, или слитого белка по любому из пп.15-18, где рак включает метастатическую злокачественную меланому, рак почки, почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному, гормональную рефрактерную аденокарциному предстательной железы, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, нейробластому, рак печени, гепатокарциному, рак желудочно-кишечного тракта, рак мочеполового тракта, рак предстательной железы, рак тонкого кишечника, рак пищевода, саркому, аденокарциному, рак эндокринной системы, воспалительную миофибробластическую опухоль, миелому, лейкемию или лимфому, включая В-клеточный острый лимфоидный лейкоз, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз, острый лимфоидный лейкоз; один или более хронических лейкозов, включая хронический миелолейкоз и/или хронический лимфолейкоз.

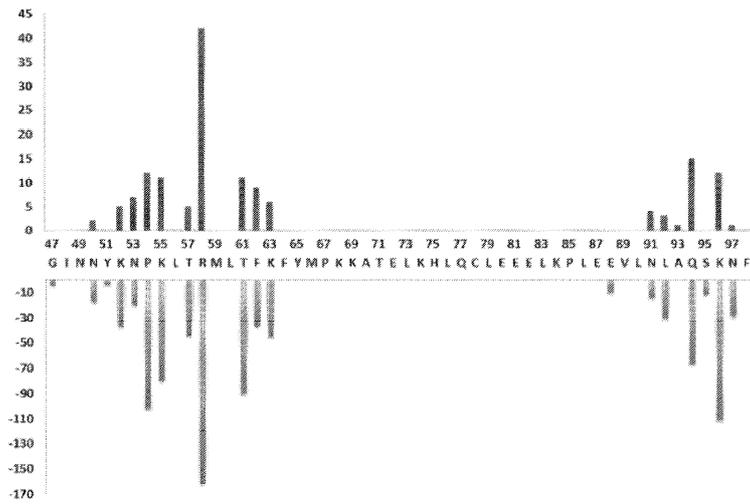
29. Вектор рекомбинантной экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, способную кодировать антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-12.

30. Вектор рекомбинантной экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, способную кодировать слитый белок по любому из пп.15-18.

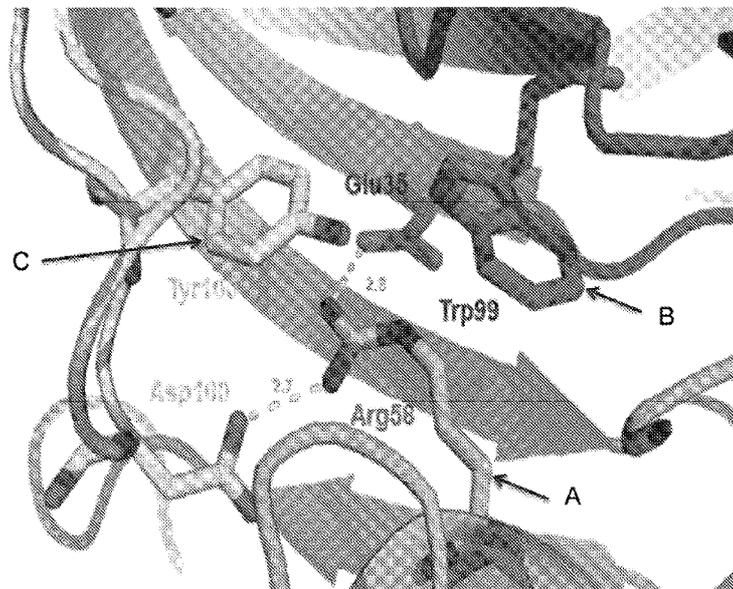
31. Клетка-хозяин млекопитающего для экспрессии антитела, которая содержит вектор по п.29 или 30.



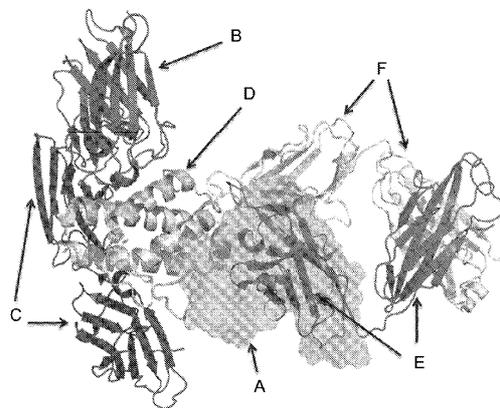
Фиг. 1



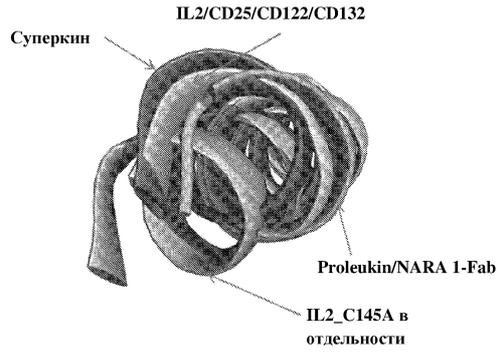
Фиг. 2



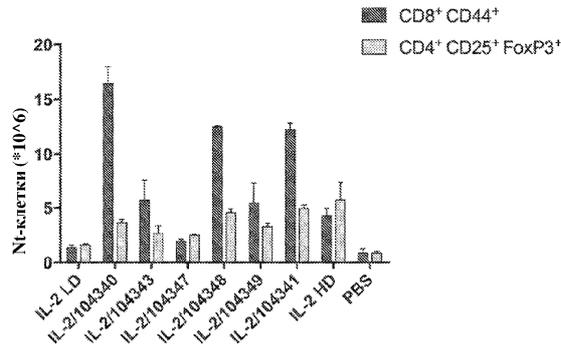
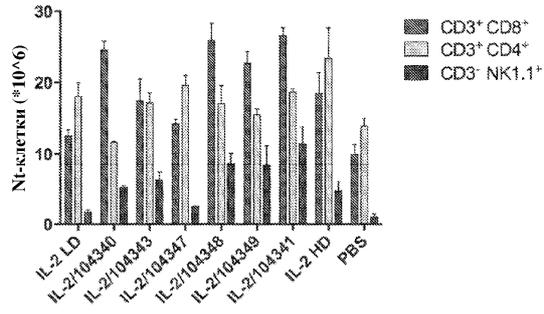
Фиг. 3



Фиг. 4

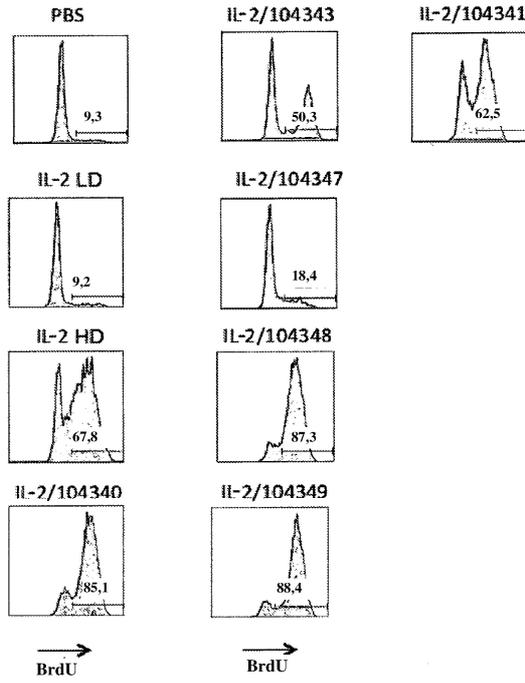


Фиг. 5



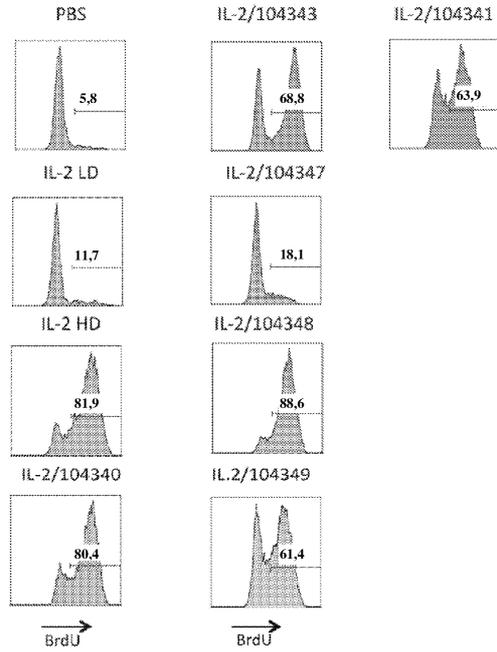
Фиг. 6

CD8⁺ CD44⁺ CD122⁺

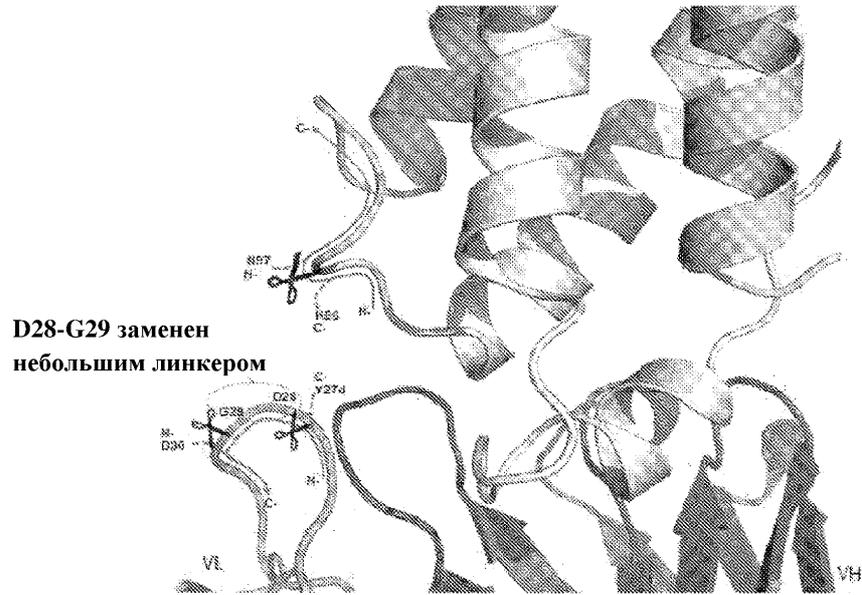


Фиг. 7

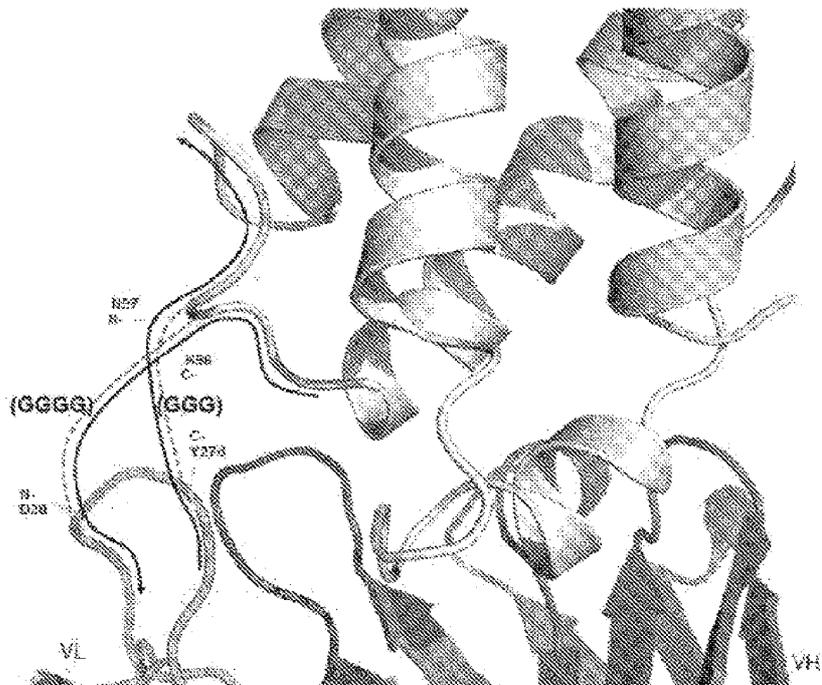
CD3⁺ NK1.1⁺



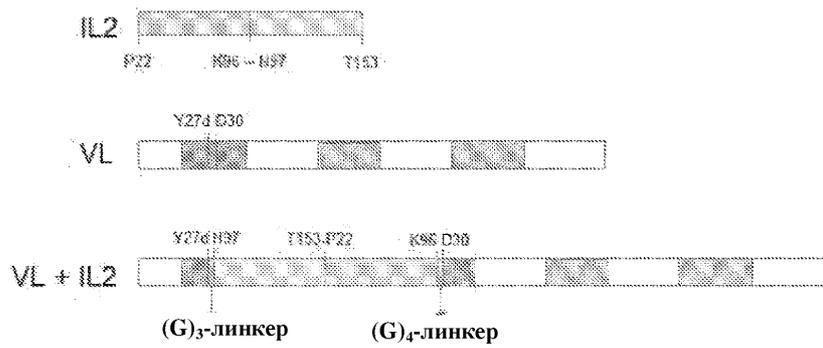
Фиг. 8



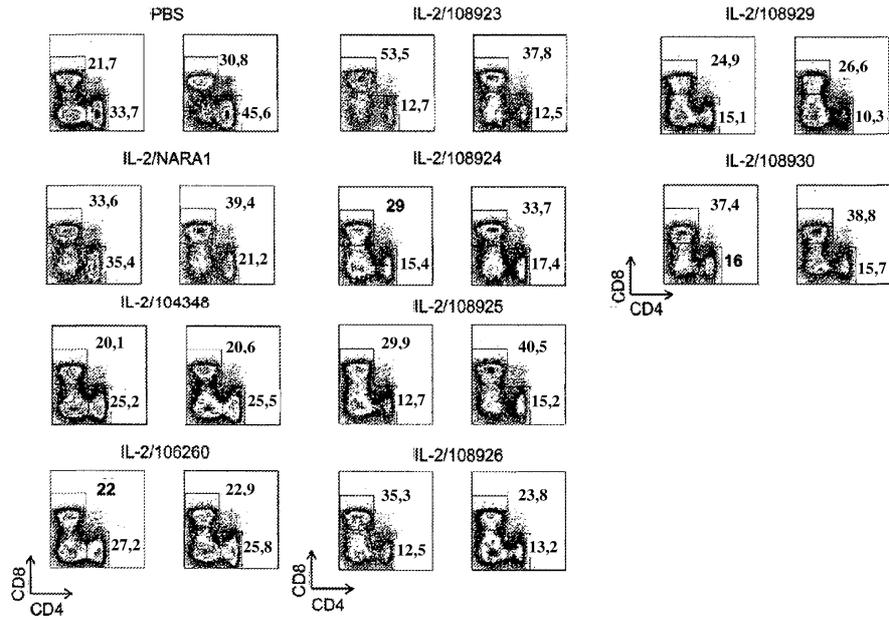
Фиг. 9



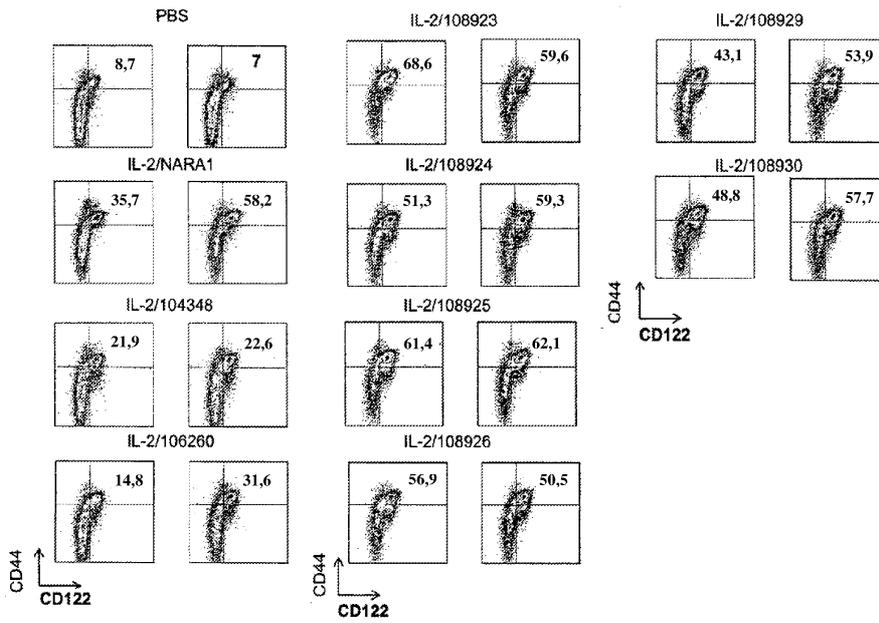
Фиг. 10



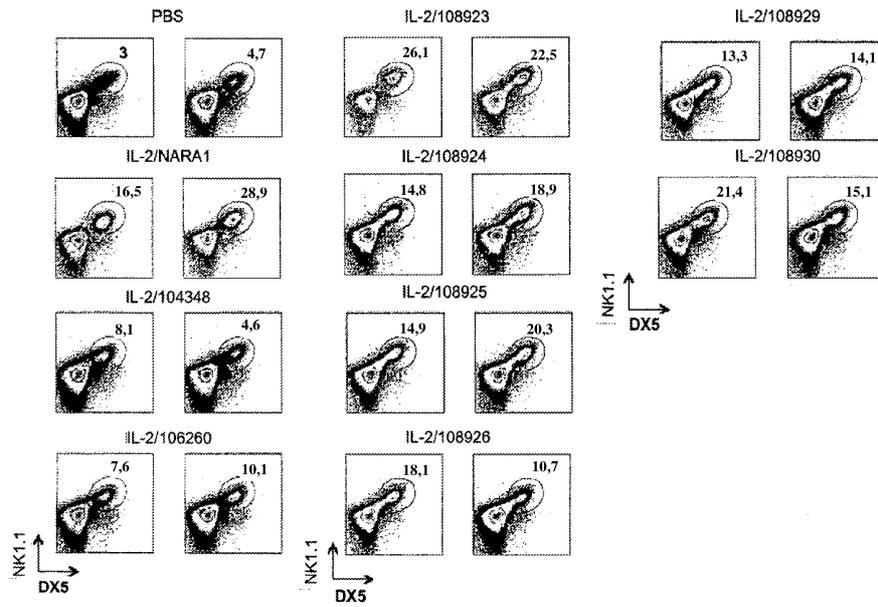
Фиг. 11



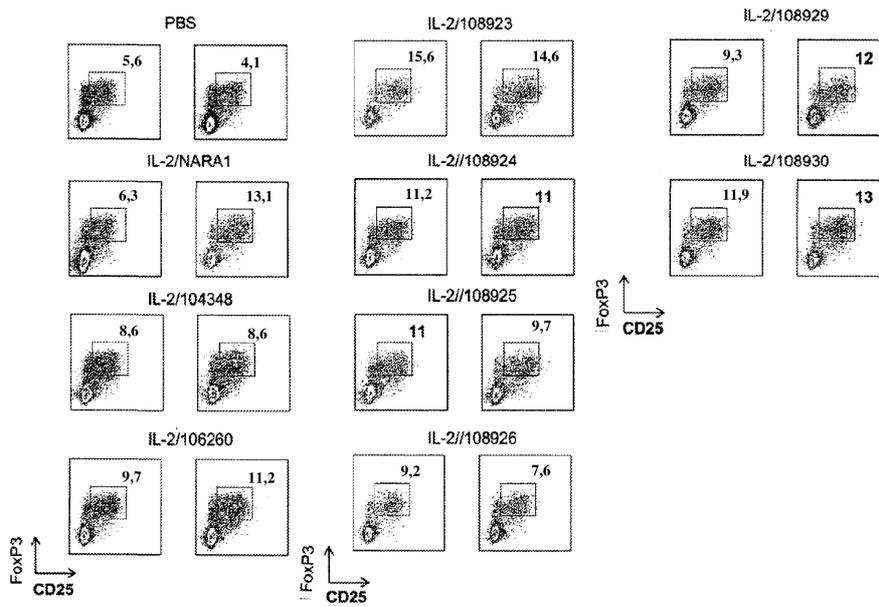
Фиг. 12



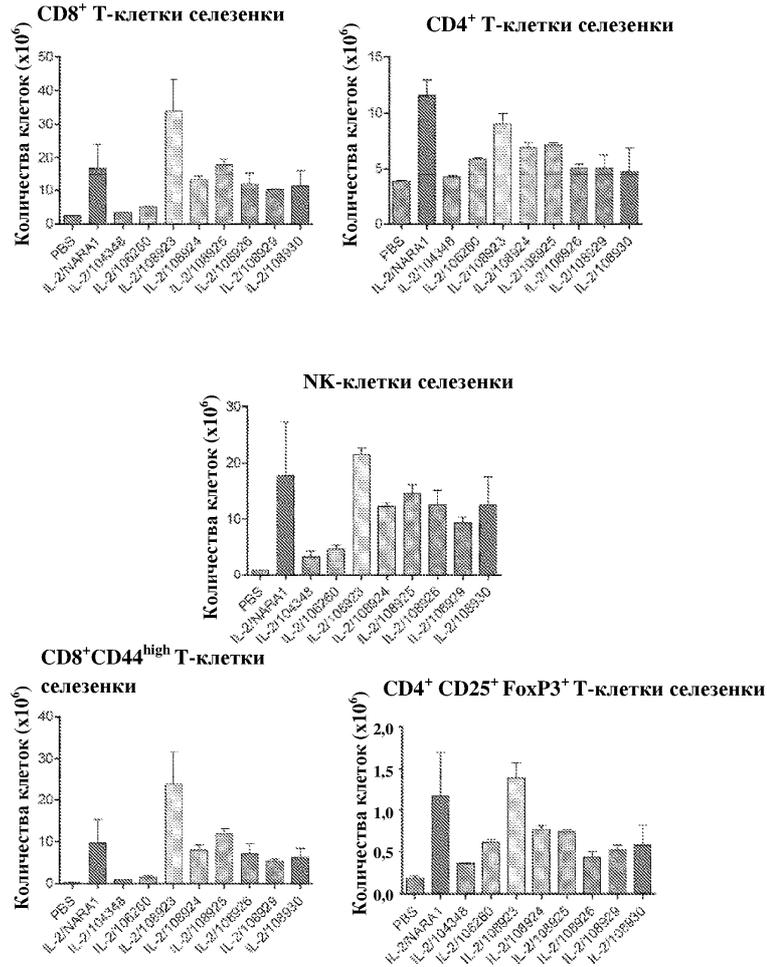
Фиг. 13



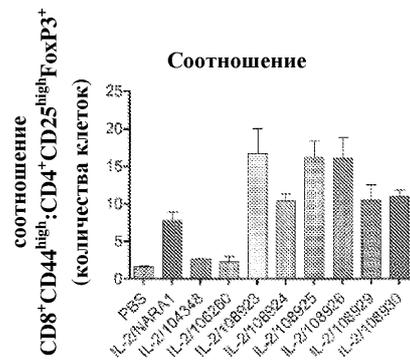
Фиг. 14



Фиг. 15

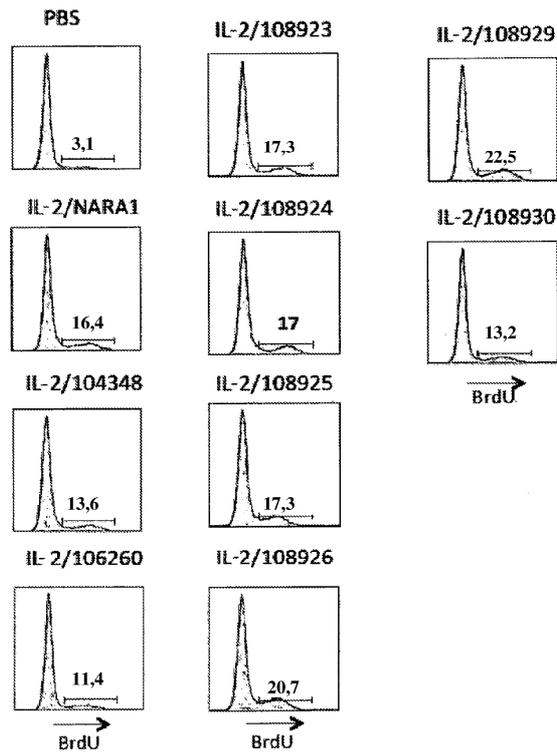


Фиг. 16



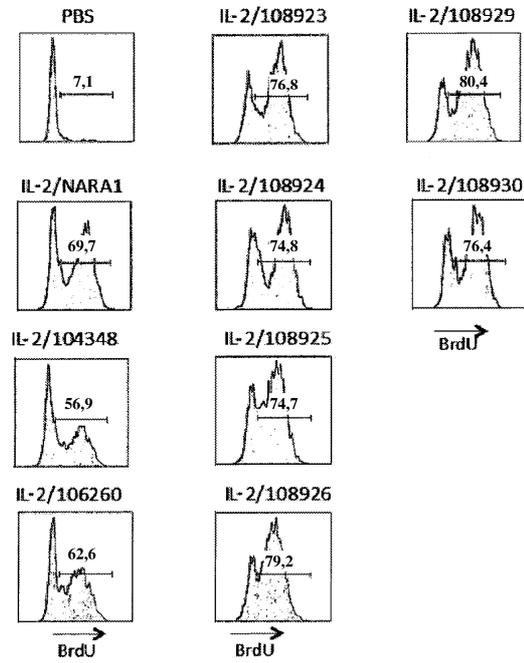
Фиг. 17

CD8⁺



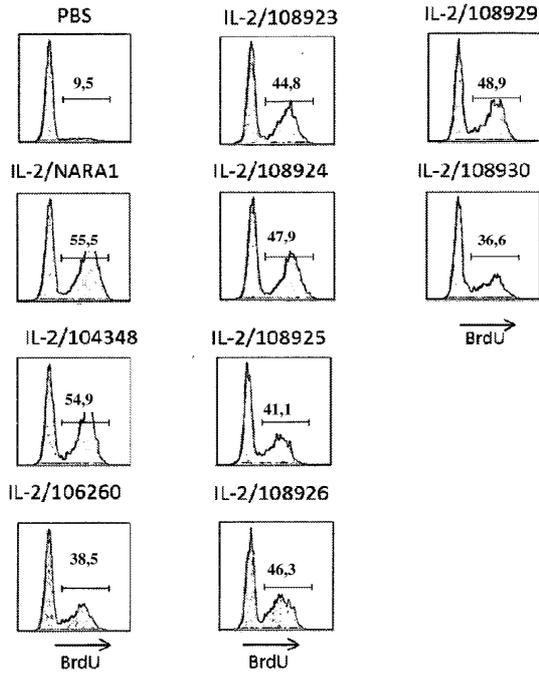
Фиг. 18

CD8⁺ CD44⁺ CD122⁺



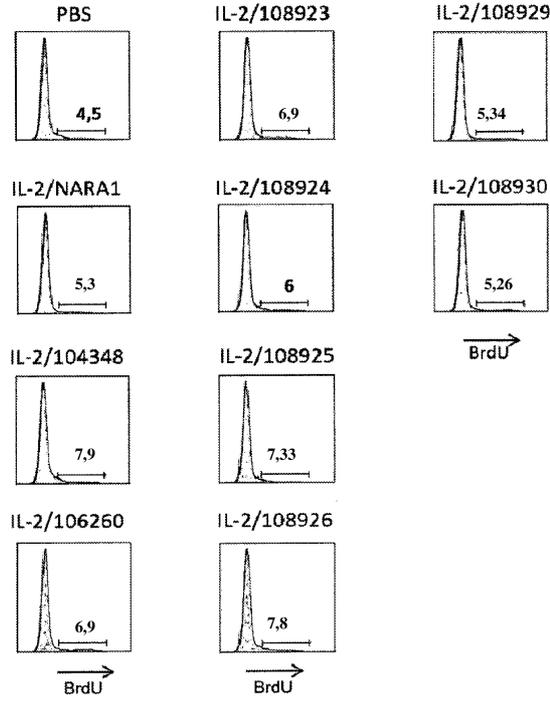
Фиг. 19

CD3⁻NK1.1⁺ DX5⁺



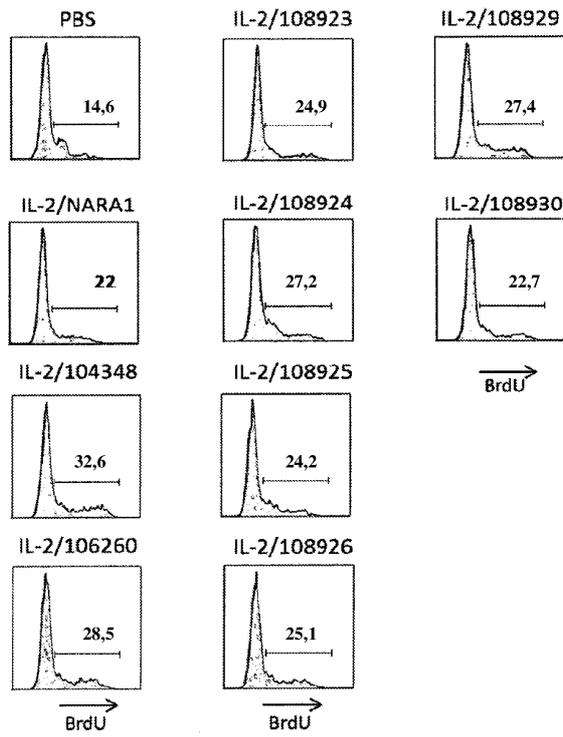
Фиг. 20

CD4⁺

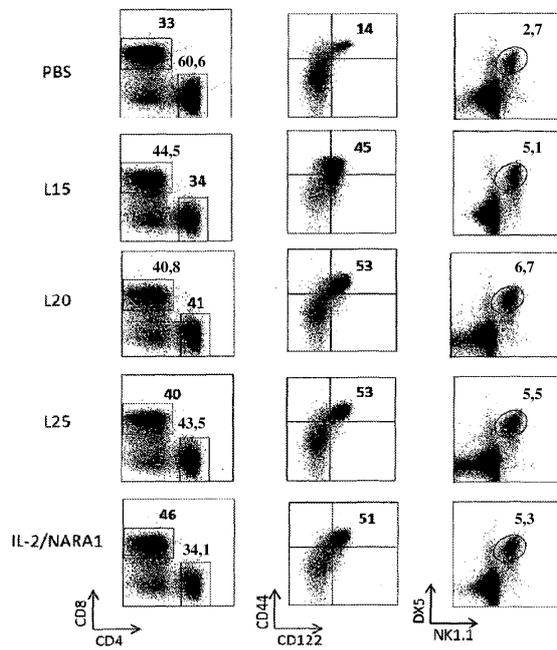


Фиг. 21

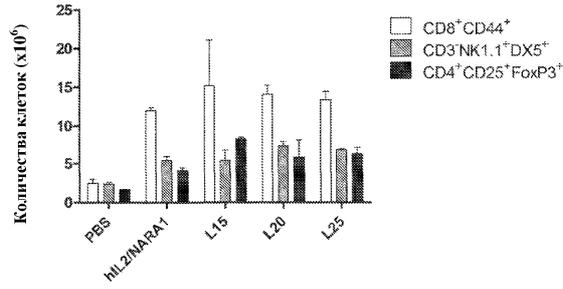
CD4⁺ CD25⁺



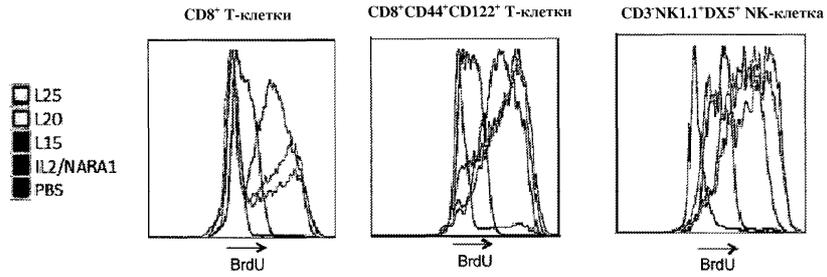
Фиг. 22



Фиг. 23

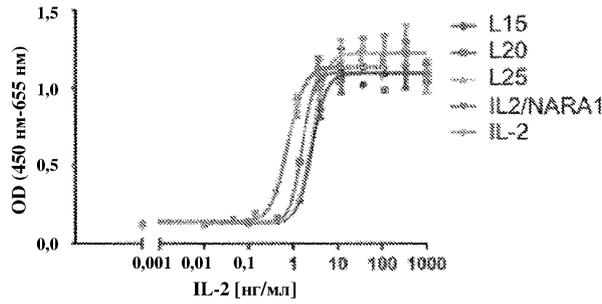


Фиг. 24



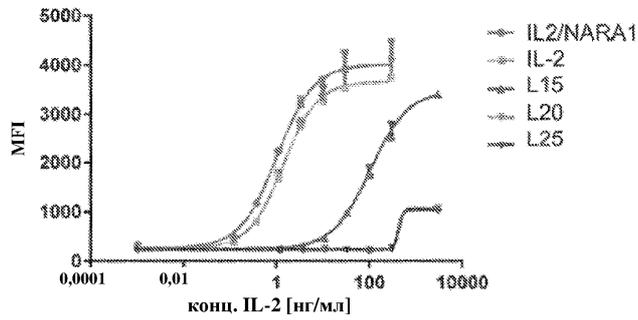
Фиг. 25

Анализ пролиферации CTLL2



Фиг. 26

Анализ pSTAT5



Фиг. 27

