

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040821**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.01

(21) Номер заявки
201991514

(22) Дата подачи заявки
2017.12.21

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮТСЯ С ИЛ-15, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/437,143

(32) 2016.12.21

(33) US

(43) 2019.12.30

(86) PCT/US2017/067917

(87) WO 2018/119246 2018.06.28

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

(72) Изобретатель:
**Лейн Дэвид Хосе Саймон, Поллард
Мэтью, Дойль Энтони Джерард,
Пултон, Линн Дороти, Кларк Адам
Уильям (AU)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A2-03017935

BERNARD J et al.: Identification of an Interleukin-15 Receptor-binding Site on Human Interleukin-15. Journal of Biological Chemistry. 4 June 2004, Epub 23 March 2004, Vol 279, No. 23; pages 24313-24322; page 24319, 2nd column, 3rd paragraph; DOI: 10.1074/jbc.M312458200

THAYSEN-ANDERSEN M. et al: Recombinant human heterodimeric IL-15 complex displays extensive and reproducible N- and O-linked glycosylation. Glycoconjugate Journal. June 2016, Epub 12 November 2015, Vol. 33, No. 3; pages 417-433; page 14, 2nd column, 3rd paragraph; DOI: 10.1007/s10719-015-9627-1

US-A1-20140182003

US-A1-20130330335

WO-A1-2016156440

US-A1-20090053243

US-A1-20040073011

US-A1-20080187531

US-A1-20130115166

US 20160145354

US 20130078251

US 20140248238

US-A1-20140370019

WO-A1-2009047356

VICARI AP et al.: Discovery and characterization of a novel humanized anti- IL-15 antibody and its relevance for the treatment of refractory celiac disease and eosinophilic esophagitis. Monoclonal Antibodies. August/September 2017, Epub 5 June 2017, Vol. 9, No. 6; pages 927-944; DOI: 10.1080/19420862.2017.1332553 1-3, 56

(57) Предложены рекомбинантные антитела, которые специфически связываются с ИЛ-15, а также с комплексом ИЛ-15 и рецептора-альфа ИЛ-15. Указанные антитела ингибируют пролиферацию иммунных клеток и могут применяться для лечения любого аутоиммунного или воспалительного заболевания или состояния, при котором нарушается регуляция ИЛ-15, включая целиакию.

B1

040821

040821 B1

Ссылка на список последовательностей

Эта заявка включает в себя список последовательностей, озаглавленный 2873.273PC01_SequenceListing_ST25.text, сгенерированный 18 декабря 2017 г., размером 215523 байта. Указанный список последовательностей включен в качестве ссылки.

Область техники

Описание в целом относится к области получения рекомбинантных антител. Более конкретно, описание относится к рекомбинантным антителам, которые специфически связываются с ИЛ-15 человека, независимо от того, находится ли он вне комплекса или в комплексе с рецептором-альфа ИЛ-15.

Уровень техники

Различные ссылки, включая патенты, опубликованные патентные заявки, технические статьи, порядковые номера доступа и другие ссылки, цитируются в данном описании. Каждая такая ссылка включена в данный документ в качестве ссылки во всей полноте для всех целей.

Цитокин интерлейкин 15 (ИЛ-15) является членом суперсемейства ИЛ-2, которое секретируется большим количеством типов клеток и тканей, включая моноциты, макрофаги, дендритные клетки (ДК), кератиноциты, фибробласты и нервные клетки. ИЛ-15 связывается и передает сигналы через комплекс, состоящий из бета-цепи рецептора ИЛ-2 (CD122) и общей гамма-цепи (гамма-С, CD132). *In vitro* ИЛ-15 разделяет несколько биологических активностей с ИЛ-2. *In vivo* специфичность в отношении ИЛ-15 по сравнению с ИЛ-2 обеспечивается уникальным индивидуальным рецептором α -цепи (ИЛ-15Р α), который завершает комплекс ИЛ-15Р α /ИЛ-2Р $\beta\gamma$ гетеротримерных рецепторов с высокой аффинностью.

ИЛ-15 был выделен из синовиальной ткани у пациентов с ревматоидным артритом и, как сообщается, он индуцирует воспалительные цитокины и хемокины, такие как фактор некроза опухоли- α , ИЛ-10 (Waldman TA (2004) *Arthritis Res. Ther.* 6:174-177). Блокада активности ИЛ-15 на мышинной модели ксенотрансплантата псориаза человека привела к нормализации псориаза (Villadsen LS et al. (2003) *J. Clin. Invest.* 112:1571-80). Сообщалось о повышенных уровнях комплекса ИЛ-15 у пациентов с Т-клеточным лейкозом из больших гранулярных лимфоцитов, $\gamma\Delta/\Delta$ Т-клеточной лимфомой (Chen J et al. (2012) *Blood.* 119:137-143).

Используя мышей с дефицитом ИЛ-15, исследователи также показали, что ингибирование сигнального пути ИЛ-15 может обеспечить профилактическое или терапевтическое преимущество при некоторых иммуноопосредованных состояниях, таких как экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ; модель рассеянного склероза), колит, воспалительные заболевания кишечника, псориаз и артрит.

В мышинной модели сверхэкспрессия ИЛ-15 в клетках кишечного эпителия запускает желудочно-подобную энтеропатию. У людей повышенная экспрессия ИЛ-15 является признаком целиакии. ИЛ-15 сверхэкспрессируется как в собственном слое слизистой оболочки, так и в кишечном эпителии пациентов с активной нелеченной целиакией по сравнению со здоровыми контрольными пациентами и пациентами с глютеновой диетой, получавших лечение целиакии, а уровни ИЛ-15 в кишечнике коррелируют со степенью повреждения слизистой оболочки (Abadie V и др. (2014) *Immunol. Rev.* 260:221-234).

DISC0280 является сильным анти-ИЛ-15-антителом с противоположными механизмами действия *in vitro* и *in vivo*. (Finch DK et al. (2011) *Br. J. Pharmacol.* 162:480-490). К сожалению, было обнаружено, что DISC0280 связывается с сайтом связывания рецептора α ИЛ-15 на ИЛ-15, что обеспечивает презентацию ИЛ-15 с помощью DISC0280 *in vivo*, подобно транс-презентации растворимого рецептора α ИЛ-15. Таким образом, DISC0280 действует как агонист ИЛ-15 *in vivo*.

Было описано, что два анти-ИЛ-15 антитела способны нейтрализовать активность ИЛ-15 без конкуренции со связыванием ИЛ-15 с ИЛ-15Р α . Полностью человеческое моноклональное анти-ИЛ-15-антитело, AMG 714 (Amgen), показало улучшение активности болезни в исследовании по повышению дозы I-II фазы у пациентов с активным ревматоидным артритом (Baslund B et al. (2005) *Arthritis Rheum.* 52:2686-2692). Также было описано, что гуманизированное антитело, названное huB-E29, блокирует активность ИЛ-15 *in vitro* и *in vivo* на мышинной модели без конкуренции со связыванием ИЛ-15 с ИЛ-15Р α (WO 16/001275).

Клинические испытания, посвященные изучению новых методов лечения целиакии, имеют в качестве измеряемых параметров: а) ослабление вызванного глютеном повреждения слизистой оболочки тонкого кишечника, измеряемого соотношением V/C. V/C - это морфометрическое измерение длины ворсинок тонкого кишечника относительно глубины крипт, взятых из образца кишечной биопсии. (b) Ослабление индуцированного глютеном воспаления слизистой оболочки тонкого кишечника, измеряемое путем подсчета интраэпителиальных лимфоцитов (IEL) в гистологических срезах, (c) ослабление индуцированных глютеном сывороточных антител, таких как антиглиадиновые антитела и аутоантитела против трансаминазы. В данное время не показано, что какое-либо терапевтическое средство является эффективным в лечении целиакии, измеряемым вышеупомянутыми измеряемыми параметрами. В этом описании представлены антитела, которые ослабляют индуцированное глютеном повреждение слизистой оболочки тонкого кишечника (улучшенное отношение V/C), ослабляют индуцированное глютеном воспаление слизистой оболочки тонкого кишечника (пониженное количество IEL) и ослабляют индуцированные глютеном сывороточные антитела (уменьшенные анти-глиадиновые антитела), как изме-

рено в модели макаки-резуса при целиакии. Антитела данного описания обеспечивают новое лечение для пациентов с целиакией и другими воспалительными заболеваниями, в которые вовлечен ИЛ-15.

Краткое описание сущности изобретения

В первом аспекте описание относится к антителам, содержащим варибельную тяжелую цепь и варибельную легкую цепь, причем эти антитела специфически связываются с эпитопом, содержащим остаток Gln 108 ИЛ-15 человека (например, где ИЛ-15 образует комплекс с ИЛ-15Р α). В некоторых вариантах осуществления изобретения ИЛ-15 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 511. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп может дополнительно содержать остатки Ser 7 и Asn 112 ИЛ-15 человека (например, где ИЛ-15 образует комплекс с ИЛ-15Р α). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело предпочтительно имеет сродство к эпитопу, содержащему KD, менее чем около $1,8 \times 10^{-9}$ М, как определено поверхностным плазмонным резонансом. В некоторых вариантах осуществления изобретения KD может составлять менее чем около $1,0 \times 10^{-9}$ М. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело предпочтительно имеет сродство к эпитопу, содержащему KD менее чем около 2×10^{-10} М, как определено поверхностным плазмонным резонансом. В некоторых вариантах осуществления изобретения KD может составлять от около $1,6 \times 10^{-10}$ М до около $1,8 \times 10^{-10}$ М, как определено поверхностным плазмонным резонансом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела могут ингибировать пролиферацию клеток натуральных киллеров (НК), например клеток НК-92, при IC₅₀ менее чем около 900 пМ в анализе пролиферации НК-клеток, включая от около 0,1 до около 900 пМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела могут ингибировать пролиферацию НК-клеток при IC₅₀ от около 1 до около 60 пМ в анализе пролиферации НК-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела могут ингибировать пролиферацию НК-клеток при IC₅₀ от около 5 до около 35 пМ в анализе пролиферации НК-клеток. Антитела могут ингибировать пролиферацию НК-клеток при IC₅₀ от около 5 до около 25 пМ в анализе пролиферации НК-клеток. Антитела могут быть способны нейтрализовать ИЛ-15. Антитела могут быть способны уменьшать циркулирующие НК-клетки.

В другом аспекте данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с ИЛ-15 человека и которые содержат HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. ИЛ-15 человека может быть комплексирован с рецептором альфа ИЛ-15. Антитела являются антагонистами ИЛ-15. Полинуклеотиды, кодирующие такие антитела, также предоставлены.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела (например, антитела, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17, 20, 25, 28 и 29 соответственно) могут содержать HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела (например, антитела, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 или 18, 20, 25, 28 и 29 соответственно) могут содержать LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела могут содержать варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 454, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и/или могут содержать легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела (например, антитела, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 или 18, 20, 25, 28 и 29 соответственно) могут содержать FR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13. Полинуклеотиды, кодирующие такие антитела, также предоставлены.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела (например, антитела, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 или 18, 20, 25, 28 и 29 соответственно) могут содержать LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела (например, антитела, содержащие HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17 или 18, 20, 25 или 26, 28 и 29 или 31 соответственно) могут содержать варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 455, и/или могут содержать легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 456. Полинуклеотиды, кодирующие такие антитела, также предоставлены.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела (например, антитела, содержащие

Любое из антител, которые связываются с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, может содержать константный домен IgG. В некоторых вариантах осуществления изобретения константный домен IgG может содержать константный домен IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения константный домен IgG1 может содержать SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления изобретения константный домен IgG может содержать константный домен IgG2. В некоторых вариантах осуществления изобретения константный домен IgG2 может содержать SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления изобретения константный домен IgG может содержать константный домен IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения константный домен IgG4 может содержать SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 51.

Любое из антител, которые связываются с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, может быть составлено в виде композиции с носителем или наполнителем. Носитель может содержать фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ лечения целиакии включает введение антитела, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), нуждающемуся в этом субъекту. Введение антитела к ИЛ-15 может восстановить слизистую оболочку тонкого кишечника у субъекта. Введение антитела к ИЛ-15 может увеличить отношение средней высоты ворсинки к глубине крипты (V/C) у субъекта. Введение антитела к ИЛ-15 может увеличить высоту ворсинок тонкого кишечника у субъекта. Введение антитела к ИЛ-15 может уменьшить количество анти-глиадиновых антител у субъекта. Введение антитела к ИЛ-15 может восстановить вызванное глютенем повреждение слизистой оболочки тонкого кишечника у субъекта.

Любое из антител, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, может быть введено как часть схемы лечения субъекту, нуждающемуся в этом. Таким образом, в другом аспекте изобретение описывает способы лечения субъекта, нуждающегося в этом, антителом к ИЛ-15. Субъект предпочтительно является человеком. Антитела можно вводить как часть схемы лечения для лечения любого аутоиммунного или воспалительного заболевания или состояния, при котором нарушается регуляция ИЛ-15, в частности, когда активируется ИЛ-15.

В некоторых подробных вариантах осуществления изобретения способ может быть предназначен для лечения целиакии и включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ восстановления слизистой оболочки тонкого кишечника у субъекта, имеющего чувствительность к глютену, аллергию на глютен, или целиакию, включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ увеличения отношения средней высоты ворсинки к глубине крипты (V/C) у субъекта, имеющего чувствительность к глютену, аллергию на глютен, или целиакию, включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ уменьшения антиглиадиновых антител у субъекта, нуждающегося в этом, включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ восстановления, индуцированного глютенем повреждения слизистой оболочки кишечника, включает введение субъекту любого антитела, как описано или приве-

дено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект имеет чувствительность к глютену, аллергию на глютен или целиакию. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ может быть предназначен для лечения рефрактерной целиакии и включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ может быть предназначен для лечения ревматоидного артрита и включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ может быть предназначен для лечения псориаза и включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ может быть предназначен для лечения воспалительного заболевания кишечника и включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ может быть предназначен для лечения диабета типа 1 и включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ может быть предназначен для лечения очаговой алопеции и включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ может быть предназначен для лечения Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов и включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с рецептором-альфа ИЛ-15), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ может быть предназначен для лечения или ингибирования симптомов воздействия глютена, например воздействия глютена у пациента, который имеет чувствительность к глютену или аллергию, и включает введение субъекту любого антитела, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), которое может находиться в композиции, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. Один или более симптомов воздействия глютена могут включать одно или более из мышечных болей, боли в теле, боли в суставах, усталости, вздутия живота, газа, тошноты, судороги, запоров, диареи, кожной сыпи, головной боли, головной боли из-за мигрени, депрессии, беспокойства, затуманенного сознания и/или раздражительности. См. Biesiekierski JR (2015) *United European Gastroenterol. J.* 3:160-165.

Любое из антител, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, может быть использовано при изготовлении лекарственного средства. Любые такие антитела могут быть использованы для лечения любого аутоиммунного или воспалительного заболевания или состояния, при котором нарушается регуляция ИЛ-15. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела могут быть использованы для лечения целиакии или в производстве лекарственного средства для лечения целиакии. Антитела могут быть использованы для лечения рефрактерной целиакии или в производстве лекарственного средства для лечения рефрактерной целиакии. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела могут быть использованы для лечения ревматоидного артрита или в производстве лекарственного средства для лечения ревматоидного артрита. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела можно использовать для лечения псориаза или для произ-

водства лекарственного средства для лечения псориаза. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела могут быть использованы для лечения воспалительного заболевания кишечника или в производстве лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания кишечника. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела могут быть использованы для лечения диабета типа 1 или для производства лекарственного средства для лечения диабета типа 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела могут быть использованы для лечения очаговой алопеции или для производства лекарственного средства для лечения очаговой алопеции. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела можно использовать для лечения Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов или в производстве лекарственного средства для лечения Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов.

Любое из антител, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, может быть использовано в способе *in vitro* для обнаружения ИЛ-15 (необязательно, в комплексе с ИЛ-15Р α) в образце ткани, выделенном у субъекта, причем способ включает приведение в контакт антитела с образцом ткани, выделенным у субъекта, с образованием комплекса антитело-ИЛ-15 (необязательно, в дальнейшем, в комплексе с рецептором-альфа ИЛ-15), и обнаружение комплекса в образце ткани. Любое из антител, которое связывается с ИЛ-15, как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов, может быть использовано в способе *in vitro* для обнаружения комплекса ИЛ-15 с рецептором-альфа ИЛ-15 в образце ткани, выделенном у субъекта, включающем приведение в контакт антитела с образцом ткани, выделенным у субъекта, с образованием комплекса антитело-антиген антитела с ИЛ-15 и комплексом рецептора α ИЛ-15, и обнаружение комплекса антитело-антиген в образце ткани.

В другом аспекте описание дополнительно относится к трансформированным клеткам, которые экспрессируют любое из антител, которые связываются с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансформированная клетка может представлять собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка млекопитающего может представлять собой клетку яичника китайского хомяка.

В другом аспекте описание дополнительно относится к полинуклеотидам, которые кодируют любое из антител, которые связываются с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая антитела любого из предыдущих пунктов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотид, кодирующий переменный участок тяжелой цепи антитела, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 517. В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, кодирующий переменный участок легкой цепи антитела, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 518. Также предусмотрены векторы, содержащие эти полинуклеотиды. Также предусмотрены клетки, содержащие эти полинуклеотиды или векторы. Клетки, содержащие полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует переменную тяжелую цепь антитела, которое связывается с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15Р α), как описано или приведено в качестве примера в данном документе, включая клетки любого из предыдущих пунктов, и нуклеиновая кислота, которая кодирует переменную легкую цепь антитела, также предоставлена. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную тяжелую цепь, и нуклеиновая кислота, кодирующая переменную легкую цепь, могут находиться в одном и том же векторе или в разных векторах.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 продемонстрировано связывание анти-ИЛ-15-антител с комплексом ИЛ-15 человека с рецептором альфа ИЛ-15, или без образования комплекса ИЛ-15Р α . Связывание репрезентативных надосадков гибридомы с некомплексированным рекомбинантным ИЛ-15Р α человека или комплексом рекомбинантного ИЛ-15 с рецептором-альфа ИЛ-15 определяли клеточным ИФА (кИФА) и ИФА. Результаты выражены в относительных единицах флуоресценции.

На фиг. 2А и фиг. 2В продемонстрировано ингибирование в зависимости от дозы реакции ИЛ-15-опосредованной пролиферации СТЛЛ-2 анти-ИЛ-15 антителами. На фиг. 2А продемонстрировано ингибирование ИЛ-15-опосредованной пролиферации СТЛЛ-2 репрезентативными анти-ИЛ-15 антителами, разведенными в 2000, 200 и 20 пМ, а на фиг. 2В продемонстрировано ингибирование в ответ на полную дозу в течение 72 ч. Результаты выражены в относительных единицах свечения.

На фиг. 3 продемонстрировано ингибирование ИЛ-15-опосредованной пролиферации НК-92 типичными анти-ИЛ-15-антителами, AMG714 или контролем изотипа (анти-KLH C3 IgG1). Показания снимались через 72 ч и выражались в относительных единицах люминесценции. Результаты выражены как среднее значение \pm ошибка 3 повторов.

На фиг. 4-33 продемонстрированы профили BIACORE® для вариантов анти-ИЛ-15, детализирующие уровни захвата антител, измерения сродства в одной точке и изменения последовательности относительно родительского антитела, антитела 4.

На фиг. 34А, 34В и 34С продемонстрированы варианты анти-ИЛ-15 антител, детализирующие их аминокислотные замены тяжелой и легкой цепей относительно исходного антитела, антитела 4.

На фиг. 35 продемонстрированы варианты антитела 4 с улучшенным ингибированием ИЛ-15-опосредованной пролиферации НК-92 относительно родительского антитела, антитела 4 и других анти-ИЛ-15 антител. Показания были взяты через 72 ч и выражены в относительных единицах свечения.

На фиг. 36 продемонстрирована кинетика связывания вариантов антитела 4 и связывания AMG714 с ИЛ-15 в комплексе с рецептором-альфа ИЛ-15. Кинетику связывания определяли с использованием поверхностного плазмонного резонанса на системе Biacore T200 (GE Healthcare). Варианты антител 4 связывали комплекс ИЛ-15 с более высокой аффинностью, чем AMG714.

На фиг. 37 продемонстрировано сравнение анти-ИЛ-15 антител в анализе на основе клеток НК-92. Ингибирование 25 пМ пролиферации НК-92, опосредованной комплексом ИЛ-15, анти-ИЛ-15 антителами в течение 48 ч выражается в единицах относительной люминесценции. Варианты антитела 70 имеют сходную эффективность друг с другом и имеют более низкое значение IC₅₀, чем AMG-714.

На фиг. 38 продемонстрировано, что экспонированные на поверхности остатки ИЛ-15 были преобразованы в аланин с помощью сайт-направленного мутагенеза и коэкспрессированы с ИЛ-15Р α человека в F-клетках EXP1293®. Связывание анти-ИЛ-15 антител с очищенными вариантами ИЛ-15 оценивали с использованием поверхностного плазмонного резонанса на системе BICAORE® T200 (GE Healthcare). AMG714 значительно уменьшил или не связался с E98A, Q101A, H105A или Q108A, что характеризуется быстрой диссоциацией или более высокой скоростью диссоциации. Антитело 70a имело низкое связывание с Q108A, что характеризовалось сниженной скоростью ассоциации и быстрой диссоциацией.

На фиг. 39А и 39В продемонстрированы кристаллические структуры комплекса антитела 70a.FAb/ИЛ-15 и четвертичного рецепторного комплекса ИЛ-15. Фиг. 39А- изображение, представляющее вариабельный участок антитела 70a.FAb, связывающего ИЛ-15 человека, вид спереди и сбоку. Фиг. 39В - четвертичная структура функционального комплекса ИЛ-15. Изображение, представляющее ИЛ-15 человека, связанного с ИЛ-15Р α , ИЛ-2Р β и ИЛ-2Р γ (код pdb, 4GS7). Антитело 70a.FAb нарушает связывание ИЛ-15 с ИЛ-2Р β и ИЛ-2Р γ . Антитело 70a FAb связывается с ИЛ-15 дистальнее ИЛ-15Р α и способно связывать комплекс ИЛ-15/ИЛ-15Р α .

На фиг. 39С, 39D и 39Е продемонстрированы ключевые остатки связывания ИЛ-15, взаимодействующие с антителом 70a, ИЛ-2Р γ и ИЛ-2Р β . Только остатки ИЛ-15, которые связываются с соответствующими белками-партнерами посредством водородных связей, изображены и пронумерованы. (Фиг. 39С) Остатки, используемые ИЛ-15 для взаимодействия с антителом 70a Fab. (Фиг. 39D) Выбранные остатки ИЛ-15, которые опосредуют водородную связь с ИЛ-2Р γ , включая Q108, N112. (Фиг. 39Е) Остаток ИЛ-15, S7, образует водородную связь с ИЛ-2Р β .

На фиг. 39F, 39G и 39H продемонстрирована кристаллическая структура ИЛ-15 человека с антителом 70a. (Фиг. 39F) Изображение, представляющее связывание антитела FAb с ИЛ-15 человека. (Фиг. 39G) Тройной мотив тирозина, содержащий Y52/54/56 в CDRH2, является ключевой детерминантой связывания антитела с ИЛ-15 человека. (Фиг. 39H) Крупный план мотива YYY из антитела 70a, опосредующего взаимодействия с ИЛ-15 человека. Этот мотив скрывает и защищает гидрофобные остатки вокруг спирали 4 ИЛ-15, предотвращая сольватацию. Боковые цепи из ИЛ-15 и CDRH2 остатков, участвующих в этом взаимодействии, указаны белыми и черными палочками соответственно.

На фиг. 40 продемонстрировано связывание вариантов антитела 70 с ИЛ-15 человека. Внеклеточное и внутриклеточное связывание ИЛ-15 с анти-ИЛ-15 мАт оценивали на подгруппах человеческих моноцитов: классических, промежуточных и неклассических моноцитах. Изотипический контроль анти-KLN C3 IgG1 был включен в анализ (заполнено). Показаны данные представителя донора А.

На фиг. 41 продемонстрировано ингибирование активности ИЛ-15 у мышей типичным анти-ИЛ-15 антителом. Представленные результаты представляют собой перечисление циркулирующих НК-клеток в селезенке мышей, которым инъецировали контрольный носитель или комплекс ИЛ-15/ИЛ-15Р α -Fc с последующим примером анти-ИЛ-15 антител или изотипического контроля анти-KLN C3 IgG1. Результаты выражены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение для 8 животных на группу.

На фиг. 42 продемонстрировано ингибирование циркулирующих средних количеств НК-клеток у обезьян Супомолгус типичными анти-ИЛ-15 антителами. Подсчет циркулирующих средних количеств НК-клеток у обезьян Супомолгус, которым инъецировали типичные анти-ИЛ-15 антитела, протестированные в дозе 10 мг/кг или 1 мг/кг. Средние количества циркулирующих НК-клеток определяли по экспрессии маркера НК-клеток CD159a (NKG2A) и CD16. Результаты выражены в виде индивидуальных моментов времени для каждой обезьяны, причем сплошная линия указывает средние числа НК-клеток на группу (n=4).

На фиг. 43А, 43В и 43С продемонстрированы различные комбинации HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

На фиг. 44А, 44В и 44С продемонстрированы различные комбинации LCDR1, LCDR2 и LCDR2.

На фиг. 45А продемонстрирован дизайн исследования модели целиакии макака-резуса с указанием стадий, измеряемых параметров и лечения анти-ИЛ-15 антителом в двух группах.

На фиг. 45В продемонстрировано ослабление повреждения слизистой оболочки тонкого кишечника

ка, вызванного глютенем, при лечении анти-ИЛ15, измеренное по соотношению между высотой ворсинок тонкого кишечника и глубиной крипты (V/C). Использовали кишечные биопсии тонкого кишечника, взятые у двух групп макак, в моменты времени, соответствующие 6-месячной диете GD, 35-дневному лечению α ИЛ-15 у макак 1-й группы (TD35) и 61-дневному лечению у макак 2-й группы (TD61), чтобы определить отношения V/C.

На фиг. 45C продемонстрировано ослабление вызванного глютенем воспаления слизистой оболочки тонкого кишечника при лечении анти-ИЛ15, измеренное путем подсчета интраэпителиальных лимфоцитов (IEL) в гистологических срезах. Временные точки отражают 6 месяцев диеты GD, 3 месяца диеты GFD, 35 дней после лечения анти-ИЛ15 у макак группы 1 (TD35) и 61 день лечения у макак группы 2 (TD61). Пунктирные синие линии указывают на здоровые контрольные исходные показатели.

На фиг. 45D продемонстрировано ослабление индуцированных глютенем сывороточных антител (анти-глиадиновых антител) при лечении анти-ИЛ15. AGA - анти-глиадиновые антитела; TG2 является анти-трансглутаминазой 2 аутоантителами. Расстояния между временными точками соответствуют двухнедельным интервалам. Отрицательные уровни базовой линии обозначены пунктирными линиями. Начало лечения анти-ИЛ15 указано стрелкой.

Подробное описание сущности изобретения

Различные термины, относящиеся к аспектам описания, используются в описании и формуле изобретения. Такие термины должны иметь свое обычное значение в данной области техники, если не указано иное. Другие специально определенные термины должны толковаться таким образом, чтобы соответствовать определению, приведенному в данном документе.

Используемые в данном документе формы единственного числа включают множественные ссылки, если прямо не указано иное.

Термины "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо и включают любое животное. Млекопитающие являются предпочтительными, включая домашних млекопитающих (например, кошку, собаку), сельскохозяйственных млекопитающих (например, свинью, лошадь, корову), грызунов (например, мышей, кроликов, крыс, морских свинок) и приматов, не являющихся человеком. Люди очень предпочтительны.

Используемый в данном документе термин "комплекс ИЛ-15" относится к взаимодействию между ИЛ-15 и рецептором альфа ИЛ-15 (ИЛ-15R α).

"Специфичность" в контексте взаимодействий антитело-антиген не обязательно является абсолютным обозначением, но может представлять собой относительный термин, обозначающий степень селективности антитела к антигену. Специфичность антитела к антигену опосредована вариабельными участками антитела и, как правило, определяющими комплементарность участками (CDR) антитела.

Данное изобретение относится к антителам, полученным рекомбинантным путем, которые специфически связываются со свободным (некомплексированным) интерлейкином 15 человека (ИЛ-15), а также с ИЛ-15, который связывается с альфа-рецептором ИЛ-15 (ИЛ-15R α) - комплекс ИЛ-15. Антитела связываются с их антигеном с высокой аффинностью и значительно уменьшают ИЛ-15-опосредованную пролиферацию иммунных клеток. Антитела антагонизируют ИЛ-15.

В предпочтительных аспектах антитела связываются с эпитопом ИЛ-15 человека (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15R α), который включает по меньшей мере глутамин в положении 108. Эпитоп может дополнительно включать один или более из серина в положении 7 и аспарагина в положении 112 ИЛ-15 человека (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15R α).

Эпитоп для данного взаимодействия антитело/антиген может быть установлен с использованием различных экспериментальных способов картирования эпитопов. Экспериментальные способы включают мутагенез (включая аланиновое сканирование), рентгеновскую кристаллографию и различные другие способы, которые хорошо известны в данной области.

Эпитоп для взаимодействия между антигеном и антителом может включать пространственные координаты, определяющие атомные контакты, присутствующие во взаимодействии антиген-антитело. Эпитоп может характеризоваться пространственными координатами, определяющими атомные контакты между антигеном и антителом. Эпитоп может характеризоваться аминокислотными остатками, определенными по специфическому критерию, например, расстоянию между атомами (например, неводородными атомами).

В контексте рентгеновской кристаллической структуры, определяемой пространственными координатами комплекса между антителом, например, фрагментом FAb, и его антигеном, термин эпитоп включает остатки ИЛ-15, характеризующиеся наличием водно-опосредованных водородных связей между атомом пар; водородные связи гетероатомов между 2,5-3,5 ::; или водородная связь, соответствующая донорному/акцепторному атому в ароматическом кольце. Альтернативно, данный аминокислотный остаток ИЛ-15 считается частью эпитопа, если он участвует в гидрофобном взаимодействии или ван-дер-ваальсовых взаимодействиях между атомами пары.

Эпитоп также может в более общем смысле включать аминокислотные остатки, замена которых другой аминокислотой изменит характеристики взаимодействия между антителом и антигеном (напри-

мер, с использованием сканирования аланином). Эксперименты по мутагенезу с аланиновым сканированием могут проводиться с использованием мутантного ИЛ-15, в котором различные остатки полипептида ИЛ-15 были заменены аланином. Оценивая связывание антитела с мутантным ИЛ-15, можно оценить важность конкретных остатков ИЛ-15 для связывания антитела. Однако, если захоронение неполярной боковой цепи происходит во время связывания антигена и антитела и приводит к упаковке боковой цепи против антигена, то мутация аланина в этом положении может не иметь большого влияния на связывание. Может случиться так, что хотя аланин мутанта приводит к уменьшению связывания антитела, это не означает, что остаток вступает в контакт, скорее, что локальная трехмерная структура ИЛ-15 может быть нарушена введением аланина. Дальнейший структурный анализ комплекса, такой как рентгеновская кристаллография, может потребоваться для оценки остатков контакта между антителом и антигеном.

Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно способны ингибировать, уменьшать или предотвращать пролиферацию иммунных клеток, таких как клетки натуральных киллеров (НК) и CD8⁺ Т-клетки. В некоторых аспектах анти-ИЛ-15 антитела ингибируют пролиферацию при IC₅₀ менее чем около 900 пМ в анализе пролиферации НК. В некоторых аспектах анти-ИЛ-15 антитела ингибируют пролиферацию при IC₅₀ более 0 пМ и менее чем около 900 пМ в анализе пролиферации НК. Анти-ИЛ-15 антитела могут ингибировать пролиферацию при IC₅₀ от около 1 до около 500 пМ в анализе пролиферации НК. Анти-ИЛ-15 антитела могут ингибировать пролиферацию при IC₅₀ от около 1 пМ до около 250 пМ в анализе пролиферации НК. Анти-ИЛ-15 антитела могут ингибировать пролиферацию при IC₅₀ от около 1 до около 200 пМ в анализе пролиферации НК. Анти-ИЛ-15 антитела могут ингибировать пролиферацию при IC₅₀ от около 1 до около 150 пМ в анализе пролиферации НК. Анти-ИЛ-15 антитела могут ингибировать пролиферацию при IC₅₀ от около 1 до около 100 пМ в анализе пролиферации НК. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно ингибируют пролиферацию при IC₅₀ от около 1 до около 60 пМ в анализе пролиферации НК. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно ингибируют пролиферацию при IC₅₀ от около 5 до около 35 пМ в анализе пролиферации НК. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно ингибируют пролиферацию при IC₅₀ от около 5 до около 30 пМ в анализе пролиферации НК.

В рамках подходящего анализа пролиферации НК клетки, такие как клетки CTLL-2, могут культивироваться и индуцироваться для пролиферации с использованием подходящей концентрации комплекса ИЛ-15 и рецептора альфа ИЛ-15. Таким образом, анализ пролиферации CTLL-2 можно использовать для определения IC₅₀ антител для ингибирования пролиферации. Любое из анти-ИЛ-15 антител, описанных или приведенных в качестве примера в данном документе, добавляют в клеточную культуру, а затем клетки инкубируют в течение подходящего периода времени, включая 48 ч, и оценивают после этого на предмет пролиферации или ингибирования пролиферации вследствие присутствия антител, в том числе путем анализа жизнеспособности клеток.

Как описано или приведено в качестве примера в данном документе, аминокислотные положения, назначенные CDR и FR, могут соответствовать последовательностям белков по Кабат, представляющих иммунологический интерес, Национальным институтам здравоохранения, Bethesda, Md., 1987 и 1991 (также называемым в данном документе системой нумерации по Кабат). Кроме того, аминокислотные положения, назначенные CDR и FR, могут соответствовать расширенной схеме нумерации по Хотиа (www.bioinfo.org.uk/mdex.html).

В соответствии с системой нумерации по Кабат, FR и CDR VH могут быть расположены следующим образом: остатки 1-30 (FR1), 31-35 (CDR1), 36-49 (FR2), 50-65 (CDR2), 66-94 (FR3), 95-102 (CDR3) и 103-113 (FR4), а FR и CDR VL расположены следующим образом: остатки 1-23 (FR1), 24-34 (CDR1), 35-49 (FR2), 50-56 (CDR2), 57-88 (FR3), 89-97 (CDR3) и 98-107 (FR4). В некоторых случаях варибельные участки могут увеличиваться в длине, и в соответствии с системой нумерации по Кабат некоторые аминокислоты могут обозначаться числом, за которым следует буква. Эта спецификация не ограничивается FR и CDR, как определено системой нумерации по Кабат, но включает все системы нумерации, включая каноническую систему нумерации или Хотиа et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-17; Chothia et al. (1989) *Nature* 342:877-83; и/или Al-Lazikani et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 273:927-48; система нумерации Honnegher et al. (2001) *J. Mol. Biol.*, 309:657-70; или система IMGT, обсуждаемая в Giudicelli et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:206-11. В предпочтительных аспектах CDR определяются в соответствии с системой нумерации по Кабат.

В некоторых конкретных аспектах для любого из субдоменов CDR2 тяжелой цепи, описанных в данном документе, в соответствии с системой нумерации по Кабат пять С-концевых аминокислот могут не участвовать непосредственно в связывании антигена, и, соответственно, следует понимать, что любая одна или более из этих пяти С-концевых аминокислот могут быть замещены другой природной аминокислотой без существенного неблагоприятного воздействия на связывание антигена. В некоторых аспектах для любого из субдоменов CDR1 легкой цепи, описанных в данном документе, в соответствии с системой нумерации по Кабат четыре N-концевых аминокислоты могут не участвовать непосредственно в связывании антигена, и, соответственно, следует понимать, что любая одна или более из этих четырех аминокислот могут быть замещены другой природной аминокислотой без существенного неблагоприятного воздействия на связывание антигена. Например, как описано Padlan et al. (1995) *FASEB J.* 9:133-139, пять С-концевых аминокислот CDR2 тяжелой цепи и/или четыре N-концевых аминокислоты CDR1 лег-

кой цепи могут не участвовать в связывании антигена. В некоторых аспектах как CDR2 тяжелой цепи, так и CDR1 легкой цепи не принимают непосредственного участия в связывании антигена.

В некоторых аспектах антитела специфически связываются с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15P α) и содержат CDR1 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR2 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых предпочтительных аспектах антитела содержат CDR2 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и в некоторых предпочтительных аспектах антитела содержат CDR2 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. Антитела могут содержать FR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14. Антитела могут дополнительно содержать варибельный участок легкой цепи или легкую цепь. Варибельный участок легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 455, SEQ ID NO: 457 или SEQ ID NO: 459. Варибельный участок легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 503, SEQ ID NO: 505, SEQ ID NO: 506, SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 509 или SEQ ID NO: 510. Легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 456, SEQ ID NO: 458 или SEQ ID NO: 460.

CDR1 варибельного участка тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 453 или SEQ ID NO: 52 по SEQ ID NO: 135. CDR2 варибельного участка тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 136 по SEQ ID NO: 226. CDR3 варибельного участка тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 227 по SEQ ID NO: 272. Подходящие комбинации доменов CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи продемонстрированы на фиг. 43A-43C. Антитела, содержащие такие домены CDR1, CDR2 или CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, или антитела, содержащие комбинации доменов CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, продемонстрированные на фиг. 43A-43C, могут дополнительно содержать варибельный участок легкой цепи или легкую цепь. Варибельный участок легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 455, SEQ ID NO: 457 или SEQ ID NO: 459. Варибельный участок легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 503, SEQ ID NO: 505, SEQ ID NO: 506, SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 509 или SEQ ID NO: 510. Легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 456, SEQ ID NO: 458 или SEQ ID NO: 460.

В некоторых аспектах антитела специфически связываются с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15P α) и содержат CDR1 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, CDR2 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых предпочтительных аспектах антитела содержат CDR1 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и в некоторых предпочтительных аспектах антитела содержат CDR1 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. В некоторых предпочтительных аспектах антитела содержат CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и в некоторых предпочтительных аспектах антитела содержат CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. Антитела могут дополнительно содержать варибельный участок тяжелой цепи. Варибельный участок тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 454.

CDR1 варибельного участка легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 273 по SEQ ID NO: 329. CDR2 варибельного участка легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 330 по SEQ ID NO: 390. CDR3 варибельного участка легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 391 по SEQ ID NO: 452. Подходящие комбинации доменов CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи продемонстрированы на фиг. 44A-44C. Антитела, содержащие такие домены CDR1, CDR2 или CDR3 варибельного участка легкой цепи, или антитела, содержащие комбинации доменов CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, продемонстрированные на фиг. 44A-44C, могут дополнительно содержать варибельный участок тяжелой цепи. Варибельный участок тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 454.

В некоторых аспектах антитела специфически связываются с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15P α) и содержат CDR1 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокис-

держаний аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, CDR1 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, CDR2 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, где Xaa5 SEQ ID NO: 29 представляет собой F (SEQ ID NO: 519). Антитела могут дополнительно содержать FR3 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

В некоторых аспектах антитела специфически связываются с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15P α) и содержат CDR2 варибельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и варибельный участок легкой цепи или легкую цепь. Варибельный участок легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 455, SEQ ID NO: 457 или SEQ ID NO: 459. Варибельный участок легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 503, SEQ ID NO: 505, SEQ ID NO: 506, SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 509 или SEQ ID NO: 510. Легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 456, SEQ ID NO: 458 или SEQ ID NO: 460.

Антитела могут специфически связываться с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15P α) и содержать или дополнительно содержать варибельный участок тяжелой цепи, содержащий субдомены, содержащие аминокислотную последовательность, показанную в следующей таблице:

	FR1	H1	FR2	H2	FR3	H3	FR4
SEQ ID NO:	10	16	11	19	14	20	15
SEQ ID NO:	10	16	11	18	14	20	15
SEQ ID NO:	10	16	11	18	13	20	15
SEQ ID NO:	10	16	11	18	13	20	15
SEQ ID NO:	10	16	11	18	13	20	15
SEQ ID NO:	10	16	11	18	13	20	15

Антитела могут специфически связываться с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15P α) и содержать или дополнительно содержать варибельный участок легкой цепи, содержащий субдомены, содержащие аминокислотную последовательность, показанную в следующей таблице:

	FR1	L1	FR2	L2	FR3	L3	FR4
SEQ ID NO:	21	27	22	28	23	31	24
SEQ ID NO:	21	27	22	28	23	31	24
SEQ ID NO:	21	26	22	28	23	31	24
SEQ ID NO:	21	27	22	28	23	30	24
SEQ ID NO:	21	27	22	28	23	519	24
SEQ ID NO:	21	26	22	28	23	30	24

В некоторых аспектах антитела специфически связываются с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15P α) и содержат варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых предпочтительных аспектах антитела содержат варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В некоторых предпочтительных аспектах антитела содержат варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых предпочтительных аспектах антитела содержат варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 454. Антитела могут дополнительно содержать варибельный участок легкой цепи или легкую цепь. Варибельный участок легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 454, SEQ ID NO: 457 или SEQ ID NO: 459. Варибельный участок легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 503, SEQ ID NO: 505, SEQ ID NO: 506, SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 509 или SEQ ID NO: 510. Легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 456, SEQ ID NO: 458 или SEQ ID NO: 460.

В некоторых аспектах антитела специфически связываются с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15P α) и содержат варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых предпочтительных аспектах антитела содержат варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В некоторых предпочтительных аспектах антитела содержат варибельный участок легкой цепи, содержащий

показанную в следующей таблице:

	VH	VL
SEQ ID NO:	4	8
SEQ ID NO:	4	503
SEQ ID NO:	4	505
SEQ ID NO:	4	509
SEQ ID NO:	4	510
SEQ ID NO:	454	455
SEQ ID NO:	454	503
SEQ ID NO:	454	457
SEQ ID NO:	454	505
SEQ ID NO:	454	406
SEQ ID NO:	454	507
SEQ ID NO:	454	5
SEQ ID NO:	454	509
SEQ ID NO:	454	510

Любое из антител, описанных или приведенных в качестве примера в данном документе, связывается с ИЛ-15, которым предпочтительно является ИЛ-15 человека. Антитела могут связываться с некомплексированным ИЛ-15 или ИЛ-15, когда находятся в комплексе с рецептором альфа ИЛ-15 (ИЛ-15P-альфа или ИЛ-15P α) - комплексом ИЛ-15. В некоторых аспектах ИЛ-15 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 511. В некоторых аспектах, ИЛ-15P-альфа содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 512, без AVI и His меток. В некоторых аспектах, ИЛ-15P-альфа содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 520.

Антитела могут иметь сродство к ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15P α) с константой диссоциации (KD) менее чем около 1×10^{-2} М. В некоторых вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-3} М. В других вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-4} М. В некоторых вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-5} М. В еще других вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-6} М. В других вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-7} М. В других вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-8} М. В других вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-9} М. В других вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-10} М. В еще других вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-11} М. В некоторых вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-12} М. В других вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-13} М. В других вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-14} М.

В еще других вариантах осуществления изобретения KD составляет менее чем около 1×10^{-15} М. В некоторых аспектах KD составляет менее чем около $1,8 \times 10^{-9}$ М. В некоторых аспектах KD составляет от около $1,2 \times 10^{-10}$ М до около 2×10^{-10} М. В некоторых аспектах KD составляет от около $1,3 \times 10^{-10}$ М до около $1,9 \times 10^{-10}$ М. В некоторых аспектах KD составляет от около $1,33 \times 10^{-10}$ М до около $1,93 \times 10^{-10}$ М. В некоторых аспектах KD составляет от около $1,6 \times 10^{-10}$ М до около $1,8 \times 10^{-10}$ М. В некоторых аспектах KD составляет около $1,7 \times 10^{-10}$ М. Значения сродства относятся к значениям, полученным с помощью стандартных методологий, включая поверхностный плазмонный резонанс (SPR), такой как анализы BIACORE® или анализ с использованием OCTET® Red 96 (Forte Bio) системы Dip-and-Read. В предпочтительном варианте осуществления изобретения константа диссоциации определяется с помощью SPR.

В общем анализе BIACORE® SPR антитело иммобилизовано на поверхности сенсорного чипа и подходящие концентрации ИЛ-15 или ИЛ-15 в комплексе с рецептором альфа ИЛ-15 пропускаются через поверхность. Изменения в показателе преломления обнаруживаются, и программное обеспечение используется для генерации сенсограмм для анализа. Взаимодействие между иммобилизованным антителом и ИЛ-15 или комплексом ИЛ-15 может осуществляться в течение любого подходящего промежутка времени, включая от около 1 до около 2 мин. Температура взаимодействия может быть любой подходящей температурой, включая около 25°C.

Антитела, которые связываются с ИЛ-15 (например, ИЛ-15 человека в комплексе с ИЛ-15P α), могут быть моноклональными антителами. Предпочтительно антитела представляют собой полноразмерные

антитела, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь. В некоторых аспектах антитела содержат производные или фрагменты или части антител, которые сохраняют антигенсвязывающую специфичность, а также предпочтительно существенно сохраняют аффинность полноразмерной молекулы родительского антитела (например, для ИЛ-15). Например, производные могут содержать один переменный участок (переменный участок тяжелой цепи или легкой цепи). Другие примеры подходящих производных и фрагментов антител включают, без ограничения, антитела с полиэпитопной специфичностью, диатела, минитела, молекулы FAb, F(Ab')₂, Fd, Fabc и Fv, одноцепочечные (Sc) антитела, одноцепочечные антитела Fv (scFv), легкие цепи отдельных антител, тяжелые цепи отдельных антител, слияния между цепями антител и другими молекулами, мономеры или димеры тяжелых цепей, мономеры или димеры легких цепей, димеры, состоящие из одной тяжелой и одной легкой цепи, и другие мультимеры. Одноцепочечные Fv-антитела могут быть мультвалентными. Производные, фрагменты и/или части антител могут быть получены рекомбинантно и экспрессированы с помощью любого типа клеток, прокариотическими или эукариотическими.

В полноразмерном антителе каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка тяжелой цепи (сокращенно обозначаемом в данном документе как HCVR или VH) и константного участка тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменного участка легкой цепи (сокращенно обозначаемом в данном документе как LCVR или VL) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена, CL. Участки VH и VL могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые участками определения комплементарности (CDR), чередующиеся с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Как правило, антигенсвязывающие свойства антитела с меньшей вероятностью будут нарушены изменениями последовательностей FR, чем изменениями последовательностей CDR. Молекулы иммуноглобулина могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно полностью человеческие. Полностью человеческие антитела представляют собой антитела, в которых вся молекула является человеческой или иным образом человеческого происхождения или включает аминокислотную последовательность, идентичную человеческой форме антитела. Полностью человеческие антитела включают антитела, полученные из библиотеки V-генов человека, например, где человеческие гены, кодирующие переменные участки антител, экспрессируются рекомбинантно. Полностью человеческие антитела могут экспрессироваться в других организмах (например, мышах и технологии ксеномыши) или в клетках других организмов, трансформированных генами, кодирующими человеческие антитела. Полностью человеческие антитела могут быть экспрессированы в крысиной системе OMNIRAT® (OMT, Inc.) согласно WO 08/151081. Полностью человеческие антитела могут, тем не менее, включать аминокислотные остатки, не кодируемые природными человеческими последовательностями, например мутации, введенные случайным образом, или сайт-направленные мутации.

В некоторых аспектах анти-ИЛ-15-антитела могут содержать неиммуноглобулин полученные белковые каркасы. Например, можно сослаться на (Ku et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6552-6556), в котором описывается четырехспиральный пучок белка цитохрома b562, имеющий две петли, рандомизированные для создания CDR, которые были отобраны для связывания антигена.

Анти-ИЛ-15 антитела могут содержать посттрансляционные модификации или фрагменты, которые могут влиять на активность антитела, период полувыведения или стабильность при хранении/сроке хранения. Например, антитела могут быть метилированными, ацетилованными, гликозилированными, сульфатированными, фосфорилированными, карбоксилированными и/или амидированными или могут содержать другие подходящие фрагменты, которые хорошо известны в данной области. Фрагменты включают любую химическую группу или комбинации групп, которые обычно находятся в молекулах иммуноглобулина в кровотоке или иным образом добавляются к антителам с помощью рекомбинантных систем экспрессии, включая прокариотические и эукариотические системы экспрессии.

Примеры модификаций боковых цепей, рассматриваемых в описании, включают модификации аминокислотных групп, такие как восстановительное алкилирование путем реакции с альдегидом с последующим восстановлением NaBH₄; амидирование с метилацетимидатом; ацилирование уксусным ангидридом; карбамоилирование аминокислотных групп цианатом; тринитробензилирование аминокислотных групп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS); ацилирование аминокислотных групп янтарным ангидридом и тетрагидрофталевым ангидридом; и пиридоксильное лизина пиридоксаль-5-фосфатом с последующим восстановлением NaBH₄.

Гуанидиновая группа остатков аргинина может быть модифицирована путем образования продуктов гетероциклической конденсации с такими реагентами, как 2,3-бутандион, фенилглиоксаль и глиоксаль. Карбоксильная группа может быть модифицирована активацией карбодиимида посредством образования O-ацилизомочевины с последующей деривацией, например, до соответствующего амида. Сульфидрильные группы могут быть модифицированы такими способами, как карбоксиметилирование йодо-

уксусной кислотой или йодацетамидом; окисление пермуравьиной кислоты до цистеиновой кислоты; образование смешанных дисульфидов с другими тиоловыми соединениями; реакция с малеимидом, малеиновым ангидридом или другим замещенным малеимидом; образование производных ртути с использованием 4-хлормеркурибензоата, 4-хлормеркурифенилсульфоновой кислоты, хлорида фенилртути, 2-хлормеркури-4-нитрофенола и других ртутных соединений; карбамоилирование цианатом при щелочном pH. Остатки триптофана могут быть модифицированы, например, окислением N-бромсукцинимидом или алкилированием индольного кольца 2-гидрокси-5-нитробензилбромидом или сульфенилгалогенидами. Остатки тирозина, с другой стороны, могут быть изменены нитрованием тетранитрометаном с образованием производного 3-нитротирозина. Модификация имидазольного кольца остатка гистидина может быть осуществлена путем алкилирования производными йодоуксусной кислоты или N-карбэтоксилирования диэтилпирокарбонатом.

Анти-ИЛ-15 антитела могут включать модификации, которые модулируют период полужизни и биораспределение в сыворотке, включая, без ограничения, модификации, которые модулируют взаимодействие антитела с Fc-рецептором новорожденных (FcRn), рецептором, играющим ключевую роль в защите IgG от катаболизма, и поддержание высокой концентрации сывороточных антител. Модификации периода полужизни в сыворотке могут происходить в участке Fc IgG1, IgG2 или IgG4, включая тройную замену M252Y/S254T/T256E (нумерация в соответствии с системой нумерации EC (Edelman, GM et al. (1969) Proc. Natl. Acad. США 63:78-85)), как описано в пат. США № 7083784. Другие замены могут происходить в положениях 250 и 428, см., например, пат. США 7217797, а также в положениях 307, 380 и 434, см., например, PCT публ. № WO 00/042072. Примеры аминокислотных замен константного домена, которые модулируют связывание с Fc-рецепторами и последующую функцию, опосредованную этими рецепторами, включая связывание FcRn и период полураспада в сыворотке, описаны в US публ. № 2009/0142340, 2009/0068175 и 2009/0092599. Антитела любого класса могут иметь C-концевой лизин тяжелой цепи, пропущенный или удаленный для снижения гетерогенности (ΔK). Замена S228P (нумерация EC) в IgG4 человека может стабилизировать обмен Fab-плечом антитела *in vivo* (Labrin et al. (2009) Nature Biotechnol. 27:8; 767-773), и эта замена может присутствовать одновременно с модификациями M252Y/S254T/T256E и/или ΔK.

Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно содержат человеческие константные домены. Константные домены тяжелой цепи предпочтительно представляют собой константные домены IgG1, IgG2 или IgG4 человека. Константные домены легкой цепи предпочтительно представляют собой константные домены лямбда человека.

Константные участки тяжелой цепи IgG1 человека, которые можно использовать с анти-ИЛ-15 антителами, могут быть выбраны из IgG1 человека (SEQ ID NO: 32), IgG1 (ΔK) человека (SEQ ID NO: 33), IgG1 человека 252Y/254T/256E (SEQ ID NO: 34), IgG1 человека 252Y/254T/256E (ΔK) (SEQ ID NO: 35), IgG1 человека L235A/G237A (SEQ ID NO: 36), IgG1 человека L235A/G237A (ΔK) (SEQ ID NO: 37) IgG1 человека L234A/L235A/G237A (SEQ ID NO: 38) и IgG1 человека L234A/L235A/G237A (ΔK) (SEQ ID NO: 39). Константные участки тяжелой цепи IgG2 человека, которые можно использовать с анти-ИЛ-15 антителами, могут быть выбраны из IgG2 человека (SEQ ID NO: 40), IgG2 человека (ΔK) (SEQ ID NO: 41), IgG2 человека A330S/P331S (SEQ ID NO: 42) и IgG человека (ΔK) (SEQ ID NO: 43). Константные участки тяжелой цепи IgG4 человека, которые можно использовать с анти-ИЛ-15 антителами, могут быть выбраны из IgG4 человека (SEQ ID NO: 44), IgG4 человека (ΔK) (SEQ ID NO: 45), IgG4 человека S228P (SEQ ID NO: 46), IgG4 человека S228P (ΔK) (SEQ ID NO: 47), IgG4 человека 228P/252Y/254T/256E (SEQ ID NO: 48), IgG4 человека 228P/252Y/254T/256E (ΔK) (SEQ ID NO: 49), IgG4 человека 252Y/254T/256E (SEQ ID NO: 50) и IgG4 человека 252Y/254T/256E (ΔK) (SEQ ID NO: 51).

Анти-ИЛ-15 антитела могут быть помечены, связаны или конъюгированы с любыми химическими или биомолекулярными фрагментами. Меченые антитела могут найти применение в терапевтических, диагностических или фундаментальных исследованиях. Такие метки/конъюгаты могут быть обнаружены, такие как флуорохромы, электрохемиллюминесцентные зонды, квантовые точки, радиоактивные метки, ферменты, флуоресцентные белки и люминесцентные белки, или могут содержать биотин или ПЭГ.

Антитела могут быть дериватизированы известными защитными/блокирующими группами для предотвращения протеолитического расщепления или повышения активности или стабильности.

Полинуклеотидные последовательности, которые кодируют анти-ИЛ-15 антитела, их домены (например, домены VH и VL) и их субдомены (например, FR и CDR) описаны в описании. Полинуклеотиды включают, но не ограничиваются ими, РНК, ДНК, кДНК, гибриды РНК и ДНК и одно-, двух- или трехцепочечные цепи РНК, ДНК или их гибриды. Последовательности комплементарных нуклеиновых кислот также находятся в объеме описания.

В некоторых аспектах полинуклеотид содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 7. Полинуклеотид может дополнительно содержать вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 или SEQ

ID NO: 8. Полинуклеотид может дополнительно содержать вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 9. Полинуклеотид может дополнительно содержать третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую константный участок тяжелой цепи антитела, такой как любой из константных участков IgG1, IgG2 или IgG4, описанных в данном документе.

В некоторых аспектах полинуклеотид содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 454. Полинуклеотид может дополнительно содержать вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 455, SEQ ID NO: 457, SEQ ID NO: 459, SEQ ID NO: 503, SEQ ID NO: 505, SEQ ID NO: 506, SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 509 или SEQ ID NO: 510. Полинуклеотид может дополнительно содержать вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 456, SEQ ID NO: 458 или SEQ ID NO: 460. Полинуклеотид может дополнительно содержать третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую константный участок тяжелой цепи антитела, такой как любой из константных участков IgG1, IgG2 или IgG4, описанных в данном документе.

В некоторых аспектах полинуклеотид содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 8. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 9. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 517. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 518.

В некоторых аспектах полинуклеотид содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 455, SEQ ID NO: 457, SEQ ID NO: 459, SEQ ID NO: 503, SEQ ID NO: 505, SEQ ID NO: 506, SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 509 или SEQ ID NO: 510. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 456, SEQ ID NO: 458 или SEQ ID NO: 460.

Любые такие полинуклеотиды могут содержаться в векторе. Таким образом, векторы, содержащие полинуклеотиды, предоставлены как часть описания. Векторы могут быть векторами экспрессии. Таким образом, обеспечиваются рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие последовательность, кодирующую интересующий полипептид. Вектор экспрессии может содержать одну или более дополнительных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь ими, регуляторные последовательности, маркер селекции, метка очистки или сигнал полиаденилирования.

Такие регуляторные элементы могут включать промотор транскрипции, энхансеры, сайты связывания мРНК с рибосомами или последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции.

Векторы экспрессии, особенно векторы экспрессии млекопитающих, могут включать один или более нетранскрибированных элементов, таких как источник репликации, подходящий промотор и энхансер, связанный с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (такие как необходимые сайты связывания рибосом), сайт полиаденилирования, сайты донора и акцептора сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Источник репликации, который дает возможность репликации у конкретного хозяина, также может быть включен.

Векторы можно использовать для трансформации любой из множества клеток-хозяев, хорошо известных специалистам в данной области, и предпочтительно клеток-хозяев, способных к экспрессии антител. Векторы включают, без ограничения, плазмиды, фагемиды, космиды, бактиды, бактериальные искусственные хромосомы (BAC), дрожжевые искусственные хромосомы (YACs) и бакуловирус, а также другие бактериальные, эукариотические, дрожжевые и вирусные векторы. Подходящие клетки-хозяева включают без ограничения клетки CHO, клетки NS0, клетки НЕК293 или любую известную, или полученную стабильную эукариотическую клеточную линию, а также включают клетки бактерий, дрожжей и насекомых.

Антитела могут также продуцироваться клетками гибридомы; способы получения гибридом хорошо известны и известны в данной области.

Описание также обеспечивает композиции, содержащие анти-ИЛ-15 антитела. Композиции могут содержать любое из антител, описанных и/или приведенных в качестве примера в данном документе, и приемлемый носитель, такой как фармацевтически приемлемый носитель. Подходящие носители включают любые среды, которые не влияют на биологическую активность антитела и предпочтительно не токсичны для хозяина, которому его вводят. Носитель может быть водным раствором. Композиции мо-

гут содержать любое из антител, описанных и/или приведенных в качестве примеров в данном документе, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы для лечения аутоиммунного заболевания, включая аутоиммунное заболевание, при котором ИЛ-15 не регулируется. Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы для лечения воспалительного заболевания, включая воспалительное заболевание, при котором ИЛ-15 не регулируется. Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы для лечения воспалительного расстройства, включая воспалительное расстройство, при котором ИЛ-15 не регулируется. В некоторых аспектах анти-ИЛ-15-антитела могут быть использованы для лечения целиакии, рефрактерной целиакии, ревматоидного артрита, псориаза, воспалительного заболевания кишечника, диабета 1 типа, очаговой алопеции, а также определенного типа рака, такого как Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов у субъекта. Таким образом, в описании представлены способы лечения.

В некоторых аспектах способы лечения включают введение анти-ИЛ-15-антитела или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении аутоиммунного заболевания, при котором нарушается регуляция ИЛ-15, так что аутоиммунное заболевание лечат у субъекта. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно вводят в количестве, которое эффективно для лечения аутоиммунного заболевания, при котором ИЛ-15 не регулируется у субъекта. Эффективное количество может варьироваться, например, в соответствии с потребностями или состоянием субъекта. Введение может осуществляться по указанию или под контролем врача.

В некоторых аспектах способы лечения включают введение анти-ИЛ-15-антитела или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении воспалительного заболевания, при котором нарушается регуляция ИЛ-15, так что воспалительное заболевание лечится у субъекта. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно вводят в количестве, которое эффективно для лечения воспалительного заболевания, при котором ИЛ-15 не регулируется у субъекта. Эффективное количество может варьироваться, например, в соответствии с потребностями или состоянием субъекта. Введение может осуществляться по указанию или под контролем врача.

В некоторых аспектах способы лечения включают введение анти-ИЛ-15-антитела или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении воспалительного расстройства, при котором нарушается регуляция ИЛ-15, так что воспалительное расстройство лечится у субъекта. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно вводят в количестве, которое эффективно для лечения воспалительного расстройства, при котором ИЛ-15 не регулируется у субъекта. Эффективное количество может варьироваться, например, в соответствии с потребностями или состоянием субъекта. Введение может осуществляться по указанию или под контролем врача.

В некоторых аспектах способы лечения включают введение анти-ИЛ-15-антитела или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении целиакии, так что целиакию лечат у субъекта, и целиакия может быть рефрактерной. Рефрактерная целиакия (RCD) поражает пациентов, которые не смогли вылечиться и демонстрируют постоянные симптомы целиакии, после 6-12 месяцев строгой безглютеновой диеты и когда другие причины симптомов (включая злокачественные новообразования) были исключены. Это может также произойти у пациентов, которые ранее отвечали на долгосрочную безглютеновую диету, но у которых теперь проявляются симптомы целиакии, при этом сохраняется строгая безглютеновая диета (Rishi et al. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology:10 537-546 (2016)). Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно вводят в количестве, которое эффективно для лечения целиакии у субъекта. Эффективное количество может варьироваться, например, в соответствии с потребностями или состоянием субъекта. Введение может осуществляться по указанию или под контролем врача.

Анти-ИЛ-15 антитела можно использовать для лечения или ингибирования одного или более симптомов воздействия глютена, например, вызванного приемом глютена. Один или более симптомов включают мышечную боль, боль в теле, боль в суставах, усталость, вздутие живота, газы, тошноту, судороги, запор, диарею, кожную сыпь, головную боль, головную боль при мигрени, депрессию, беспокойство, затуманенное сознание и раздражительность. Как правило, способы включают введение анти-ИЛ-15 антитела или его композиции субъекту, обладающему чувствительностью к глютену, который подвергался воздействию глютена, так что один или более симптомов воздействия глютена ингибируются или лечатся у субъекта. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно вводят в количестве, которое эффективно для лечения или ингибирования одного или более симптомов воздействия глютена у субъекта. Эффективное количество может варьироваться, например, в соответствии с потребностями или состоянием субъекта. Введение может осуществляться по указанию или под контролем врача.

В некоторых аспектах способы лечения включают введение анти-ИЛ-15-антитела или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении ревматоидного артрита, так что ревматоидный артрит лечится у субъекта. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно вводят в количестве, которое эффективно для лечения ревматоидного артрита у субъекта. Эффективное количество может варьироваться, например, в соответствии с потребностями или состоянием субъекта. Введение может осуществляться по указанию или под контролем врача.

В некоторых аспектах способы лечения включают введение анти-ИЛ-15-антитела или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении псориаза, так что псориаз лечится у субъекта. Анти-ИЛ-15 анти-

тела предпочтительно вводят в количестве, которое эффективно для лечения псориаза у субъекта. Эффективное количество может варьироваться, например, в соответствии с потребностями или состоянием субъекта. Введение может осуществляться по указанию или под контролем врача.

В некоторых аспектах способы лечения включают введение анти-ИЛ-15-антитела или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении воспалительного заболевания кишечника, так что воспалительное заболевание кишечника лечится у субъекта. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно вводят в количестве, которое эффективно для лечения воспалительного заболевания кишечника у субъекта. Эффективное количество может варьироваться, например, в соответствии с потребностями или состоянием субъекта. Введение может осуществляться по указанию или под контролем врача.

В некоторых аспектах способы лечения включают введение анти-ИЛ-15-антитела или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении диабета типа 1, так что диабет типа 1 лечится у субъекта. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно вводят в количестве, которое эффективно для лечения диабета 1 типа у субъекта. Эффективное количество может варьироваться, например, в соответствии с потребностями или состоянием субъекта. Введение может осуществляться по указанию или под контролем врача.

В некоторых аспектах способы лечения включают введение анти-ИЛ-15-антитела или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении очаговой алопеции, так что очаговая алопеция лечится у субъекта. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно вводят в количестве, которое эффективно для лечения очаговой алопеции у субъекта. Эффективное количество может варьироваться, например, в соответствии с потребностями или состоянием субъекта. Введение может осуществляться по указанию или под контролем врача.

В некоторых аспектах способы лечения включают введение анти-ИЛ-15-антитела или его композиции субъекту, нуждающемуся в лечении Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов, так что Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов лечится у субъекта. Анти-ИЛ-15 антитела предпочтительно вводят в количестве, которое эффективно для лечения Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов у субъекта. Эффективное количество может варьироваться, например, в соответствии с потребностями или состоянием субъекта. Введение может осуществляться по указанию или под контролем врача.

Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы при производстве лекарственного средства. Например, анти-ИЛ-15-антитела могут быть использованы при изготовлении или приготовлении лекарственного средства для применения при лечении целиакии. Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы при изготовлении или приготовлении лекарственного средства для применения при лечении рефрактерной целиакии. Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы при изготовлении или приготовлении лекарственного средства для применения при лечении ревматоидного артрита. Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы при изготовлении или приготовлении лекарственного средства для применения при лечении псориаза. Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы при изготовлении или приготовлении лекарственного средства для применения при лечении воспалительного заболевания кишечника. Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы при изготовлении или приготовлении лекарственного средства для применения при лечении диабета 1 типа. Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы при изготовлении или приготовлении лекарственного средства для применения при лечении очаговой алопеции. Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы при изготовлении или приготовлении лекарственного средства для применения при лечении Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов. Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы при производстве или приготовлении лекарственного средства для применения при лечении или ингибировании одного или более симптомов воздействия глютена, например, воздействия глютена у пациента, который имеет чувствительность к глютену или аллергию. Один или более симптомов включают мышечную боль, боль в теле, боль в суставах, усталость, вздутие живота, газы, тошноту, судороги, запор, диарею, кожную сыпь, головную боль, головную боль при мигрени, депрессию, беспокойство, затуманенное сознание и/или раздражительность.

Анти-ИЛ-15-антитела могут быть использованы для лечения целиакии. Анти-ИЛ-15-антитела могут быть использованы для лечения рефрактерной целиакии. Анти-ИЛ-15-антитела могут быть использованы для лечения ревматоидного артрита. Анти-ИЛ-15-антитела могут быть использованы для лечения псориаза. Анти-ИЛ-15-антитела могут быть использованы для лечения воспалительного заболевания кишечника. Анти-ИЛ-15-антитела могут быть использованы для лечения диабета 1 типа. Анти-ИЛ-15-антитела могут быть использованы для лечения очаговой алопеции. Анти-ИЛ-15-антитела могут быть использованы для лечения Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов. Анти-ИЛ-15 антитела могут быть использованы для лечения или ингибирования одного или более симптомов воздействия глютена, например воздействия глютена у пациента с чувствительностью к глютену или аллергией. Один или более симптомов включают мышечную боль, боль в теле, боль в суставах, усталость, вздутие живота, газы, тошноту, судороги, запор, диарею, кожную сыпь, головную боль, головную боль при мигрени, депрессию, беспокойство, затуманенное сознание и/или раздражительность.

Описание также включает в себя наборы, содержащие любое из анти-ИЛ-15 антител, и эти наборы могут использоваться, среди прочего, для доставки антител и других агентов для использования в диагностических, базовых исследованиях или терапевтических способах. В некоторых аспектах наборы со-

держат любое анти-ИЛ-15 антитело, описанное или приведенное в качестве примера в данном документе, и инструкции по применению антитела в способе лечения целиакии. В некоторых аспектах наборы содержат любое анти-ИЛ-15 антитело, описанное или приведенное в качестве примера в данном документе, и инструкции по применению антитела в способе лечения рефрактерной целиакии. В некоторых аспектах наборы содержат любое анти-ИЛ-15 антитело, описанное или приведенное в качестве примера в данном документе, и инструкции по применению антитела в способе лечения или ингибирования одного или более симптомов воздействия глютена, например, у пациента с чувствительностью к глютену или аллергией. В некоторых аспектах наборы содержат любое анти-ИЛ-15 антитело, описанное или приведенное в качестве примера в данном документе, и инструкции по применению антитела в способе лечения ревматоидного артрита. В некоторых аспектах наборы содержат любое анти-ИЛ-15 антитело, описанное или приведенное в качестве примера в данном документе, и инструкции по применению антитела в способе лечения псориаза. В некоторых аспектах наборы содержат любое анти-ИЛ-15 антитело, описанное или приведенное в качестве примера в данном документе, и инструкции по применению антитела в способе лечения воспалительного заболевания кишечника. В некоторых аспектах наборы содержат любое анти-ИЛ-15 антитело, описанное или приведенное в качестве примера в данном документе, и инструкции по применению антитела в способе лечения диабета 1 типа. В некоторых аспектах наборы содержат любое анти-ИЛ-15 антитело, описанное или приведенное в качестве примера в данном документе, и инструкции по применению антитела в способе лечения очаговой алопеции. В некоторых аспектах наборы содержат любое анти-ИЛ-15 антитело, описанное или приведенное в качестве примера в данном документе, и инструкции по применению антитела в способе лечения Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов.

Также предоставлены способы обнаружения ИЛ-15 в образце ткани, выделенном у субъекта. Как правило, такие способы включают в себя приведение в контакт любого анти-ИЛ-15 антитела, описанного или приведенного в качестве примера в данном документе, с образцом ткани, выделенным у субъекта, с образованием комплекса антитело-ИЛ-15 с рецептором альфа ИЛ-15 и обнаружение комплекса в образце ткани. Способ может дополнительно включать выделение образца ткани у субъекта. Образец ткани может быть из ткани желудочно-кишечного тракта, включая ткань пищевода, ткань желудка, ткань тонкого кишечника, ткань толстого кишечника и другие ткани желудочно-кишечного тракта. Антитело может быть конъюгировано с детектируемой меткой. Антитело может быть обнаружено с помощью вторичного антитела, которое помечено детектируемой меткой. Такие способы могут быть выполнены *in vivo*, *in vitro* или *in situ*.

Также предоставлены способы обнаружения комплекса ИЛ-15 и рецептора-альфа ИЛ-15 в образце ткани, выделенном у субъекта. Как правило, такие способы включают приведение в контакт любого анти-ИЛ-15 антитела, описанного или приведенного в качестве примера в данном документе, с образцом ткани, выделенным у субъекта, с образованием комплекса антитело-антиген анти-ИЛ-15 антитела, связанного с комплексом ИЛ-15 и рецептором альфа ИЛ-15, и обнаружение комплекса антитело-антиген в образце ткани. Способ может дополнительно включать выделение образца ткани у субъекта. Образец ткани может быть из ткани желудочно-кишечного тракта, включая ткань пищевода, ткань желудка, ткань тонкого кишечника, ткань толстого кишечника и другие ткани желудочно-кишечного тракта. Антитело может быть конъюгировано с детектируемой меткой. Антитело может быть обнаружено с помощью вторичного антитела, которое помечено детектируемой меткой. Такие способы могут быть выполнены *in vivo*, *in vitro* или *in situ*.

Следующие примеры предоставлены для более подробного описания. Они предназначены для иллюстрации, а не для ограничения описания. В примерах ссылка на положение остатка является ссылкой на положение в соответствующей последовательности, как изложено в данном документе, если не указано иное.

Пример 1. Получение трансгенных крыс, иммунизация и производство гибридом

1.1 Белок ИЛ-15 и белок ИЛ-15Р α

Человеческий интерлейкин 15 (ИЛ-15) был приобретен (Sigma) или произведен в системе экспрессии НЕК293F млекопитающих с использованием плазмид, кодирующих ИЛ-15 человека и растворимого рецептора α ИЛ-15 (ИЛ-15Р α) с HIS на N-конце и меткой AVI (SEQ ID NO: 512) в соотношении 1:1.

1.2 Получение трансгенных крыс

Трансгенных крыс получали, как описано в публикации PCT № WO 08/151081. Вкратце, экспрессирующая конструкция мегануклеазы была интегрирована в геном животного. Экспрессия мегануклеазы в половых клетках приводила к двухцепочечным разрывам в эндогенных генах иммуноглобулина крысы. Спаривание таких трансгенных крыс привело к появлению мутантных/инактивированных эндогенных генов иммуноглобулина крысы.

Трансгенных крыс дополнительно модифицируют для переноса искусственных генов иммуноглобулина человека, так что крысы способны продуцировать антитела с полностью человеческими вариабельными участками.

1.3 Иммунизация

Для создания полностью человеческих моноклональных антител к комплексу ИЛ-15 с рецептором-альфа ИЛ-15 трансгенных крыс (полученных, как описано выше) иммунизировали ДНК, кодирующей ИЛ-15 человека, и ДНК, кодирующей ИЛ-15Р α человека.

Десять животных были иммунизированы, и иммунный ответ отслеживался в течение всего курса иммунизации с помощью образцов плазмы, полученных при субмандибулярных кровотечениях. Плазму подвергали скринингу на экспрессию антител с помощью ИФА, и животных с достаточными титрами анти-ИЛ-15 антител отбирали для слияния и получения гибридомы. Животных с высоким титром за 5 дней до умерщвления подкожно стимулировали рекомбинантным комплексом ИЛ-15 человека.

1.4 Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к комплексу ИЛ-15

Для создания гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к комплексу ИЛ-15 с рецептором-альфа ИЛ-15, спленоциты и клетки лимфатических узлов от иммунизированных животных выделяли и сливали с иммортализованной клеточной линией. Суспензии отдельных клеток лимфоцитов были слиты с Р3Х63Аg8.653, не секретирующими клетки миеломы мыши (ATCC, CRL-1580). Клетки высевали при приблизительно 1×10^5 клеток/мл в планшеты для микротитрования с плоским дном с последующей 2-недельной инкубацией в селективной среде, содержащей помимо обычных реагентов 10% фетальной клоновой сыворотки и 1x HAT (Sigma). Затем отдельные лунки подвергали скринингу с помощью ИФА и ВΙΑСОРЕ® на антитела к ИЛ-15 IgG человека с высокой аффинностью.

Пример 2. Скрининг гибридом

2.1 Использование ИФА для отбора антител, которые связываются с комплексом ИЛ-15, но не связываются с некомплексированным рецептором α ИЛ-15

Микротитрационные планшеты покрывали очищенным ИЛ-15 или очищенным ИЛ-15Р α или очищенным комплексом ИЛ-15. Вкратце, планшеты для микротитрования покрывали очищенным белком в ФСБ и затем блокировали нерелевантными белками, такими как бычий сывороточный альбумин (БСА), разведенный в ФСБ. Разведения надосадков гибридомы добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при 37°C. Планшеты промывали ФСБ/TWEEN® 20, а затем инкубировали с Fc-специфическим поликлональным реагентом коза-античеловеческий IgG, конъюгированным с подходящим реагентом обнаружения (например, пероксидазой хрена) щелочной фосфатазы в течение 1 ч при 37°C. После промывания планшеты были обработаны подходящим субстратом (например, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин ТМД) и проанализированы при ОП 405. Гибридомы, которые продуцировали антитела, демонстрирующие положительную реактивность с комплексом ИЛ-15, но не с ИЛ-15Р α , были отобраны для дальнейшей характеристики.

2.2 Использование клеточного ИФА (кИФА) для отбора антител, которые связываются с комплексом ИЛ-15, но не связываются с некомплексированным рецептором α ИЛ-15

Каждую из гибридом, протестированных как указано выше, также тестировали в иммуноферментном анализе на основе клеток (кИФА) для отбора антител, которые связываются с комплексом ИЛ-15, но не связываются с некомплексированным ИЛ-15Р α .

кИФА проводился следующим образом. Клетки НЕК трансфицировали с ДНК, кодирующей ИЛ-15 и ИЛ-15Р α , так что они экспрессировали комплекс ИЛ-15. Трансфицированные клетки НЕК наносили на планшет для ИФА и на планшет наносили разведения надосадков гибридомы, чтобы они могли связываться с комплексом ИЛ-15, экспрессируемым на поверхности клеток. Анализ повторяли с использованием клеток НЕК, трансфицированных с ИЛ-15Р α , так что они экспрессировали некомплексированный ИЛ-15Р α . Преимущество использования кИФА в дополнение к классическому ИФА состоит в том, что для скрининга антител используется нативный белковый комплекс.

В качестве положительного контроля экспрессию комплекса ИЛ-15 или некомплексированного ИЛ-15Р α на клеточной поверхности анализировали с использованием античеловеческого ИЛ-15-фикозитрин (PE) антитела (R&D Systems, Кат. № IC2471P). Гибридомы, продуцирующие антитела, которые продемонстрировали положительную реактивность с комплексом ИЛ-15, но не с ИЛ-15Р α , были отобраны для дальнейшей характеристики.

Репрезентативный выбор результатов продемонстрирован на фиг. 1. Антитело 4 связывалось с некомплексированным ИЛ-15 и комплексом ИЛ-15, но не с некомплексированным ИЛ15Р α . Антитело 1А6 не связывалось с некомплексированным ИЛ-15, комплексом ИЛ-15 или ИЛ-15Р α и не было отобрано для дальнейшей характеристики. Антитело 1В3 связывало некомплексированный ИЛ-15, комплекс ИЛ-15 и ИЛ-15Р α . Связывание с некомплексированным ИЛ-15Р α является недостатком, поскольку оно указывает на то, что клоны не являются специфичными к ИЛ-15.

Пример 3. Идентификация антител-кандидатов для дальнейшей разработки

3.1 Анализ на основе клеток СТLL-2

1500 образцов гибридомы, которые связывают комплекс ИЛ-15, но не ИЛ-15 α , были протестированы в анализе на мышинной клетке СТLL-2, чтобы определить, какие из них нейтрализуют биологическую активность ИЛ-15. Клеточная линия СТLL-2 происходит от цитотоксической Т-клеточной лимфомы (ATCC: TIB-214) и реагирует как на ИЛ-2, так и на ИЛ-15.

Надосадки гибридомы (неочищенные антитела) тестировали на их способность нейтрализовать вызванную ИЛ-15 пролиферацию клеток CTLL-2.

Клетки CTLL-2 инкубировали в полной среде без ИЛ-2 или ИЛ-15 в течение 4 ч перед тестированием. Клетки CTLL-2 (5×10^4 /лунка) инкубировали в 96-луночных планшетах с комплексом ИЛ-15 с рецептором-альфа ИЛ-15 при 200 пМ для индукции пролиферации клеток. Надосадки гибридомы добавляли в планшеты и инкубировали в течение 48 ч. Ингибирование пролиферации клеток затем оценивали с использованием анализа жизнеспособности люминесцентных клеток CELLTITER-GLO® (Promega) в соответствии с инструкциями производителя и считывания с люминометра GLOMAX® 96 Microplate (Promega). Данные не показаны.

3.2 Анализы BIACORE®

Параллельно с анализами на основе клеток, описанными выше, 1500 гибридом также тестировали на активность связывания комплекса ИЛ-15 и измеряли их аффинность. Использовали поверхностный плазмонный резонанс (SPR). SPR-скрининг проводили с использованием биосенсора BIACORE® 4000 (GE Healthcare) в одной концентрации аналита в анализе прогона. CM5 Series S (GE Healthcare) была установлена в машине. Использовали нормализацию с помощью раствора Bia Normalization (GE Healthcare). Гидродинамическая адресация выполнялась на пристыкованном чипе и прошла внутренний контроль качества.

Антитело против Fc-фрагмента крысы (Bethyl A110-136A) иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа CM5 с использованием набора для аминного связывания (GE Healthcare). Антитело разводили в ацетате натрия pH 4,5 до концентрации 50 мкг/мл для иммобилизации и иммобилизовали в точках 1, 2, 4, 5 в проточных ячейках 1-4 с использованием буфера HBS-EP+ (GE Healthcare) и время связывания 10 мин. Все взаимодействия были измерены при 25°C. Это привело к уровню иммобилизации от между 10000 до 12000 единиц ответа для каждой точки на четырех проточных ячейках. Клетки регенерировали с использованием 100 мМ буфера фосфорной кислоты. Для оценки связывания гибридомы 70 мкл рабочего буфера HBS-EP+ добавляли к 50 мкл надосадка гибридомы крысы. Использовался следующий метод:

Запуск - Регенерация 3 цикла по 10 с каждый со скоростью 30 мкл/мин.

Пробный прогон:

Захват - Точка 1 - Проточные ячейки 1-4 - 130 с инъекция - 30 мкл/мин - нормальная инъекция - на этом этапе 4 различных образца загружаются в точку 1 из каждой из четырех проточных ячеек

Захват - Точка 5 - Проточные ячейки 1-4 - 130 с инъекция - 30 мкл/мин - нормальная инъекция - на этом этапе 4 различных образца загружаются в точку 1 из каждой из четырех проточных ячеек

Образец - все точки, все проточные ячейки - 60-секундная инъекция, 60-секундная скорость смещения - 30 мкл/мин - нормальная инъекция - комплекс ИЛ-15 человека (20 мкг/мл; партия 491p90A) вводится через все проточные ячейки и все точки.

Регенерация 1-20 с 100 мМ фосфорной кислоты

Регенерация 2-15 с 100 мМ фосфорной кислоты

Регенерация 3-10 с 100 мМ фосфорной кислоты

Между каждым 96-луночным планшетом выполнялся другой цикл регенерации - в соответствии с циклом запуска.

Анализ

Используя программное обеспечение BiaEvaluation, для анализа использовали захват с кинетикой. Сенсограммы для 5-4 и 1-2 были проанализированы. Это позволило вычитать сигнал комплекса ИЛ-15 из точки, в которой не было антител. Точка 3 не использовалась в анализе. Затем каждую сенсограмму анализировали, и те образцы, которые не обнаруживали связывания антитела с комплексом, отбрасывали, а образцы, которые демонстрировали связывание с комплексом ИЛ-15 с рецептором-альфа ИЛ-15, были одобрены. Была выполнена подгонка кривой и получена таблица измерений сродства.

3.3 Секвенирование переменного участка

Молекулярная идентичность переменных участков антител в отобранных пеллетах неональной гибридомы была установлена с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Вкратце, 96-луночные планшеты, содержащие пеллеты гибридомы, размораживали после криоконсервации при -80°C в RNALATER® (Thermo). Планшеты центрифугировали при 1000×g в течение 5 мин для осаждения клеток и удаляли буфер RNALATER®. РНК выделяли из планшетов гибридом с использованием 96-луночного набора для очистки РНК GENELUTE™ (Sigma #RTN9602, RTN9604) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию и качество полученных образцов РНК определяли с использованием спектрофотометра NANODROP® 8000 (Thermo). РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием олиго(dT) праймера и обратной транскриптазы AccuScript (Agilent # 600184). Реакцию синтеза кДНК собирали в соответствии с протоколом производителя и синтез кДНК проводили при 42°C в течение 30 мин.

Аmplификацию переменных участков антител человека из гибридом, полученных от трансгенных грызунов, осуществляли с помощью ПЦР с использованием либо PfuUltraII (Agilent), либо ДНК полиме-

раз высокого разрешения Q5 (NEB) в соответствии с указаниями производителя. Тяжелые цепи амплифицировали с использованием пар праймеров, специфичных для последовательности ДНК константного участка тяжелой цепи грызуна и последовательностей ДНК лидерных последовательностей тяжелой цепи человека. Варибельные участки легкой цепи лямбда амплифицировали аналогичным образом, используя пары праймеров, специфичных для последовательности ДНК константного участка лямбда человека и последовательности ДНК лидерных последовательностей лямбда цепи человека.

Успешная амплификация варибельных участков была подтверждена запуском небольшой аликвоты в реакции ПЦР на геле с использованием системы электрофореза в э-геле (Thermo). Реакции очистки после ПНР проводились с использованием 96-луночной системы очистки ПЦР GENELUTE™ (Sigma # PCR9604) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию полученной очищенной ДНК оценивали с использованием спектрофотометра Nanodrop. Секвенирование по Сэнгеру фрагментов ПЦР проводили с использованием олиго, предназначенных для внутреннего связывания с ампликонами тяжелой или легкой цепи. Полученные последовательности ДНК были концептуально транслированы в аминокислотные последовательности для дальнейшего анализа перед их использованием для производства полноразмерных цепей антител. Варибельные участки антител с уникальными аминокислотными последовательностями (по меньшей мере, с одной аминокислотной заменой в полной последовательности) отбирали для превращения в полноразмерные человеческие антитела.

3.4. Получение плазмид для получения антител.

Последовательности варибельного участка обратно транслировали в последовательности ДНК с использованием технологии GENEOPTIMIZER® перед синтезом полученной ДНК de novo путем сборки синтетических олигонуклеотидов (GeneArt, Германия). Синтезированные последовательности варибельного участка тяжелой и легкой цепей субклонировали в векторы экспрессии млекопитающих, содержащие либо константный участок тяжелой цепи IgG1 человека (такую как регистрационный номер Swissprot P01857), либо константный участок лямбда человека (регистрационный номер Swissprot P0CG05) для получения полноразмерных цепей антител.

3.5 Экспрессия антител

Антитела продуцировали путем совместной трансфекции плазмид, кодирующих тяжелые и легкие цепи антител, в клетки EXP1293® (Life Technologies). За день до трансфекции определяли количество клеток, необходимое для эксперимента. Для каждых 20 мл трансфекции требовалось $3,6 \times 10^7$ клеток в 20 мл среды экспрессии EXP1293®. За день до трансфекции клетки высевали в 50 мл пробирки биореактора TPP с плотностью $0,9 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C в увлажненной атмосфере с 8% CO₂ в воздухе на орбитальном шейкере, вращающемся при 200 оборотах в минуту. В день трансфекции количество клеток и их жизнеспособность определяли с использованием автоматического счетчика клеток. Использовали только культуры с > 98% жизнеспособных клеток. Для каждых 20 мл трансфекции липид-ДНК-комплексы готовили путем разбавления 10 мкг ДНК тяжелой цепи и 10 мкг ДНК легкой цепи в ОПТИ-МЕМ® I в среде с уменьшенной сывороткой (кат. № 31985-062) до общего объема 1,0 мл. 54 мкл реагента EXPIFECTAMINE® 293 разводили в среде ОПТИ-МЕМ® I до общего объема 1,0 мл. Оба флакона осторожно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. После инкубации разбавленную ДНК смешивали с разведенным реагентом EXPIFECTAMINE® 293 и смесью реагентов DNA-EXPIFECTAMINE® 293 инкубировали еще 20 мин при комнатной температуре, чтобы обеспечить образование комплексов реагента DNA-EXPIFECTAMINE® 293. После инкубации 2 мл комплекса реагента ДНК-EXPIFECTAMINE® 293 добавляли в каждую пробирку биореактора TPP объемом 50 мл. В пробирку с отрицательным контролем добавляли 2 мл среды ОПТИ-МЕМ® I вместо комплекса реагента ДНК-EXPIFECTAMINE® 293. Клетки инкубировали в инкубаторе при 37°C с увлажненной атмосферой с 8% CO₂ в воздухе на орбитальном шейкере, вращающемся со скоростью 200 об/мин. Приблизительно через 16-18 ч после трансфекции в каждую пробирку добавляли 100 мкл энхансера трансфекции 1 EXPIFECTAMINE® 293 и 1,0 мл энхансера трансфекции 2 EXPIFECTAMINE® 293. Антитела собирали приблизительно через 72 ч после трансфекции.

3.6 Очистка антител

Культуры трансфицированных клеток EXP1293® центрифугировали в пробирках объемом 50 мл при 3000×g в течение 20 мин и надосадки фильтровали с использованием фильтра 0,22 мкм (Corning). Содержащие антитела надосадки очищали с использованием робота Gilson ASPEC GX274 с помощью хроматографии на протеине А. Вкратце, картриджи SPE (Agilent, 12131014), заполненные 1,2 мл смолы MABSELECT SURE® белка А (GE Healthcare), предварительно уравнивали 1X ФСБ 3 объемами колонки. 18 мл надосадка пропускали через колонки с последующей промывкой 4 мл 1X ФСБ. Каждую колонку предварительно элюировали с 0,9 мл 0,1 М лимонной кислоты, pH 2,9. Очищенные антитела элюировали с 2 мл 0,1 М лимонной кислоты, pH 2,9. Антитела обессоливали в Sørensens ФСБ (59,5 mM K₂HPO₄, 7,3 mM Na₂HPO₄, 2H₂O, 145,4 mM NaCl (pH ~ 5,8)) с использованием колонок PD-10 (GE Healthcare).

3.7 Трехточечное разведение на клетках CTLL-2

Каждое очищенное антитело тестировали в трех разных разведениях на его способность ингибировать опосредованную ИЛ-15 пролиферацию клеток CTLL2.

Клетки CTLL-2 инкубировали в полной среде без ИЛ-2 или ИЛ-15 в течение 4 часов перед тестированием. Клетки (5×10^4 /лунка) инкубировали в 96-луночных планшетах с 200 пМ комплекса ИЛ-15 с рецептором-альфа ИЛ-15, концентрацией, которая индуцировала 50% максимальной клеточной пролиферации (EC_{50}). Разведения антител добавляли в планшеты и инкубировали в течение 48 ч. Были использованы три разведения анти-ИЛ-15 антител: 2000, 200 и 20 пМ. Ингибирование пролиферации клеток затем оценивали с использованием анализа жизнеспособности люминесцентных клеток CELLTITER-GLO® (Promega) в соответствии с инструкциями производителя и считывания с люминометра GLOMAX® 96 Microplate (Promega). Данные выражали в единицах относительной люминесценции (количество жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения присутствующего АТФ, показателя метаболически активных клеток).

Этот грубый ответ на дозу способности антител функционально нейтрализовать биологическую активность ИЛ-15 использовали для отбора антител для дальнейшего анализа. Репрезентативный выбор результатов продемонстрирован на фиг. 2А. Антитело 4 было сильнодействующим антагонистом активности ИЛ-15.

3.8 Полная доза-ответ на клетках CTLL-2

Выбранные антитела прогоняли в 10-точечной версии вышеуказанного анализа клеток CTLL-2 с целью получения кривых полная доза-ответ.

Репрезентативный выбор результатов продемонстрирован на фиг. 2В. Относительный профиль ингибирования каждого антитела оценивали с использованием значения IC_{50} (концентрация анти-ИЛ-15 антител, при которой пролиферация клеток уменьшается вдвое). Из протестированных антител наиболее сильными антителами были антитело 4 и антитело 10F.

3.9 Полная доза-ответ на клетках НК-92

Наиболее сильные антитела в анализе клеток CTLL-2 были подвергнуты дополнительному анализу клеток с использованием клеток НК-92. Клеточная линия происходит от НК злокачественной неходжкинской лимфомы (ATCC: CRL-2407).

Клетки НК-92 инкубировали в полной среде без ИЛ-2 или ИЛ-15 в течение 4 ч перед тестированием. Клетки (5×10^4 /лунка) инкубировали в 96-луночных планшетах с ИЛ-15 в комплексе с рецептором-альфа ИЛ-15 при 25 пМ (EC_{50}) для индукции пролиферации клеток. Дозы антител добавляли в планшеты и инкубировали в течение 48 ч. Ингибирование пролиферации клеток затем оценивали с использованием анализа жизнеспособности люминесцентных клеток CELLTITER-GLO® (Promega) в соответствии с инструкциями производителя и считывания с люминометра GLOMAX® 96 Microplate (Promega), как описано выше. Данные были выражены как относительные единицы люминесценции.

Репрезентативный выбор результатов продемонстрирован на фиг. 3. Относительный профиль ингибирования каждого антитела оценивали с использованием значения IC_{50} . Антитело 4 имело самое низкое ингибирующее значение IC_{50} (0,1 нМ) и было идентифицировано как наиболее мощный ингибитор клеточной пролиферации, управляемой ИЛ-15.

Пример 4. Модификация антитела

Антитело 4 было модифицировано с целью оказания положительного влияния на биофизические свойства антитела, а также улучшения активности.

4.1 Расположение критических для связывания аминокислот

Варианты родительского антитела были получены путем модификации каждого остатка в последовательностях CDR и оценки влияния на активность и свойства связывания антитела (сканирование CDR). Девять вариантов в каждом положении CDR были получены путем модификации остатков на аланин (A), аспарагиновую кислоту (D), гистидин (H), лизин (K), лейцин (L), глутамин (Q), серин (S), триптофан (W) или тирозин (Y). Эти девять аминокислот были выбраны из-за их диапазона свойств, так что все функциональные свойства были протестированы, как продемонстрировано в табл. 1.

Таблица 1. Функциональные свойства аминокислоты

Аминокислота	Функциональное свойство
Аланин (A)	Маленький размер
Аспарагиновая кислота (D)	Кислая
Гистидин (H)	Основная; Кольцевая структура
Лизин (K)	Основная

Лейцин (L)	Гидрофобная
Глутамин (Q)	Амид
Серин (S)	Нуклеофильная
Триптофан (W)	Ароматическая
Тирозин (Y)	Ароматическая

Это привело к отбору ~520 вариантов антитела 4, каждый из которых отличался от антитела 4 на 1 аминокислоту. Антитела генерировали, как описано ранее, и скрининг проводили с использованием поверхностного плазмонного резонанса на системе Biacore T200 (GE Healthcare) с использованием чипа CM5 Protein A (GE Healthcare). В качестве рабочего буфера использовался HBS-EP+ (GE Healthcare), и все взаимодействия измерялись при 25°C, а скорость сбора данных была установлена на 10 Гц. Перед запуском способа был выполнен цикл запуска, в котором обе проточные ячейки чипа были очищены двумя последовательными 60-секундными импульсами 0,1 М лимонной кислоты (pH 3,0).

Надосадки EXP1293® F-клеток, коэкспрессирующих варианты антитела, разводили 1 к 100 в HBS-EP+ (GE Healthcare), и комплекс ИЛ-15 человека разводили до 10 мкг/мл в том же буфере. Антитела захватывались во вторую проточную ячейку чипа и измерялось связывание путем инъекции 30 мкл комплекса ИЛ-15 человека со скоростью потока 30 мкл/мин через обе проточные ячейки и давая 120 с времени диссоциации. Поверхность чипа регенерировали между циклами двумя последовательными 60-секундными импульсами 0,1 М лимонной кислоты (pH 3,0) на обе проточные ячейки.

Данные от FC2-1 использовались для анализа. Полученные сенсограммы были проанализированы путем создания двух пользовательских точек отчета, каждая из которых рассчитывалась для окна старта продолжительностью 1 с, начинающегося либо через 5 с после введения образца ("раннее связывание"), либо за 5 с до окончания диссоциации ("позднее связывание"). Антитела были ранжированы на основе отношения этих двух точек отчета ("позднее связывание"/"раннее связывание") в качестве оценки скорости диссоциации. Относительные уровни захвата были использованы в качестве приблизительного показателя производительности. Результаты экспериментов по модификации CDR продемонстрированы на фиг. 5-34. На фиг. 5-33 показаны отдельные модификации, которые привели к улучшенному антителу (заштриховано серым), а на фиг. 34 обобщены единичные и множественные протестированные модификации, которые привели к улучшению антитела.

Эти эксперименты идентифицировали аминокислоты, которые были критически важны для связывания и активности, а также аминокислоты, которые могли быть заменены без изменения связывания или активности. Неожиданно было обнаружено, что замена аминокислот в положении 54 или 56 в CDR2 тяжелой цепи ароматическими аминокислотами Y или W приводила к увеличению активности антитела.

Дальнейшие варианты были сделаны для проверки замены аминокислот в положении 54 или 56 в CDR2 тяжелой цепи ароматической аминокислотой фенилаланин (F). Эти два варианта также показали увеличение активности в анализе пролиферации клеток НК-92.

Были созданы двойные варианты, где обе аминокислоты в положении 54 или 56 CDR2 тяжелой цепи были модифицированы либо на Y, W, либо на F. Активность двойных вариантов оценивали в анализе пролиферации клеток НК-92, как описано в разделе 3.9. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2. Двойные варианты 54-56.

		Положение 54		
		F	Y	W
Положение 56	F	4,9 пМ	6,6 пМ	3,4 пМ
	Y	11,2 пМ	7,4 пМ	10,1 пМ
	W	8,3 пМ	7,6 пМ	5,1 пМ

Было обнаружено, что эффект от включения двух ароматических аминокислот в положениях 54 и 56 вместо того, чтобы быть противодействующим, вместо этого приводил к кумулятивному улучшению активности.

Антитело 11 (содержащее 54Y и 56Y) имеет по меньшей мере 10-кратное улучшение IC₅₀ в анализе пролиферации клеток НК-92 по сравнению с антителом 4 (фиг. 35 и табл. 3).

4.2 Модификация антитела 4 для снижения потенциальных иммуногенных эпитопов

Для удаления потенциально иммуногенных эпитопов в антителах могут быть сделаны замены пептидной последовательности, чтобы вернуть последовательность в этой области обратно в последовательность антител зародышевой линии. Замена I82aS в тяжелой цепи (антитело 63) привела к последовательности зародышевой линии и удалила предсказанный иммуногенный пептид в этой области. Эта замена не оказала влияния на активность в анализе НК-92, как показано в табл. 3 (антитело 63 по сравнению с антителом 11).

Замена N30S в легкой цепи (антитело 73) привела к последовательности зародышевой линии и удалила предсказанный иммуногенный пептид в этой области. Эта замена оказала незначительное влияние на активность в анализе НК-92, как показано в табл. 3 (антитело 73 по сравнению с антителом 11).

Когда обе замены были объединены в одно антитело, антитело 64, наблюдалось небольшое снижение активности по сравнению с антителом 11 (фиг. 35).

Таблица 3. Список вариантов пониженной иммуногенности

Антитело №	Замены тяжелой цепи	Замены легкой цепи	IC 50 (НК-92) в пМ	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:	Полная L SEQ ID NO:
Антитело 4	Дикий тип	ДТ	148	7	8	9
Антитело 11	S54Y + N56Y	ДТ	6,3	454	8	9
Антитело 63	S54Y + N56Y + I82aS	ДТ	4,21075	4	8	
Антитело 64	S54Y + N56Y + I82aS	N30S	13,5975	4	455	456
Антитело 65	S54Y + N56Y + I82aS	D92E	42,48	4	503	
Антитело 66	S54Y + N56Y + I82aS	S93L	6,0443	4	457	458
Антитело 67	S54Y + N56Y + I82aS	S93E	7,688	4	505	
Антитело 68	S54Y + N56Y + I82aS	S93F	5,338	4	459	460
Антитело 69	S54Y + N56Y + I82aS	N30S + D92E	162,5	4	507	
Антитело 70a	S54Y + N56Y + I82aS	N30S + S93L	18,178	4	5	6
Антитело 71	S54Y + N56Y + I82aS	N30S + S93E	26,39	4	509	
Антитело 72	S54Y + N56Y + I82aS	N30S + S93F	20,93	4	510	
Антитело 73	S54Y + N56Y	N30S	11,842	454	455	
Антитело 74	S54Y + N56Y	D92E	33,9	454	503	
Антитело 75	S54Y + N56Y	S93L	3,136	454	457	
Антитело 76	S54Y + N56Y	S93E	7,686	454	505	
Антитело 77	S54Y + N56Y	S93F	5,694	454	506	
Антитело 78	S54Y + N56Y	N30S + D92E	168	454	507	
Антитело 79	S54Y + N56Y	N30S + S93L	12,38	454	5	
Антитело 80	S54Y + N56Y	N30S + S93E	22,75	454	509	
Антитело 81	S54Y + N56Y	N30S + S93F	17,29	454	510	

4.3 Модификация антитела 64 для улучшения технологичности изготовления

Аминокислотный анализ вариabельной последовательности тяжелой и легкой цепи антитела 64 и родственных антител идентифицировал аминокислоты, которые могут подвергаться изомеризации. Изменения в этих аминокислотах могут со временем изменить стабильность антитела. В легкой цепи D92 и S93 были идентифицированы как потенциальный сайт изомеризации аспарагиновой кислоты. Чтобы уменьшить потенциальное влияние этих предсказанных проблем, были изготовлены варианты антитела 64, содержащие консервативные или полуконсервативные аминокислотные замены в этих положениях. Эти замены и их влияние на активность полученных вариантов приведены в табл. 4. На фиг. 35 продемонстрирована репрезентативная выборка вариантов, протестированных в анализе пролиферации клеток НК-92.

Модификации для повышения технологичности изготовления путем изменения D92 приводят к потере активности (см. Антитело 68 по сравнению с антителом 11). Изменение S93 на L93 неожиданно привело к улучшению активности антитела, как показано в табл. 3 и на фиг. 35.

Краткое изложение модификаций, внесенных в антитело 4 для создания антитела 70, приведено в табл. 4.

Таблица 4. Краткое изложение модификации

Аминокислотное положение	Немодифицированный остаток (антитело 4)	Модифицированный остаток (антитело 70)	Улучшенное свойство
H54	S	Y	Улучшенная активность
H56	N	Y	Улучшенная активность
H82a	I	S	Удаляет потенциальный иммуногенный эпитоп с помощью модифицирования на уровне генов зародышевой линии
L30	N	S	Удаляет потенциальный иммуногенный эпитоп с помощью модифицирования на уровне генов зародышевой линии
L93	S	L	Уменьшает потенциальную изомеризацию сайта

Пример 5. Средство к рецептору и селективность вариантов антитела 70

Были созданы варианты константного участка антитела 70. Варибельный участок тяжелой цепи антитела 70 был синтезирован в рамке с константными доменами изотипа IgG человека, описанными в табл. 5.

Таблица 5. Варианты антитела 70

Варианты антитела 70	SEQ ID NO
Антитело 70a	33
Антитело 70b	35
Антитело 70e	47
Антитело 70f	49

ИЛ-15 связывается с и передает сигналы через комплекс, состоящий из ИЛ-15Р α , ИЛ-2Р β и ИЛ-2Р γ . Антитела оценивали на их способность связывать ИЛ-15Р α , а также цитокины, которые имеют общий рецептор ИЛ-2Р β / γ , такие как ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-9 и ИЛ-21. Варианты антитела 70 не связывались с ИЛ-15Р α , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-9 и ИЛ-21.

Связывание вариантов антитела 70 с ИЛ-15 человека в комплексе с рецептором-альфа ИЛ-15 оценивали с использованием поверхностного плазмонного резонанса на системе BIACORE® T200 (GE Healthcare) с использованием сенсорного чипа белка А (GE Healthcare). Антитела захватывали во вторую проточную ячейку до уровня 150-200 RU. Очищенные цитокины разбавляли до 10 мкг/мл в HBS-EP+. Связывание измеряли путем инъекции 45 мкл каждого цитокина при скорости потока 30 мкл/мин по обеим проточным ячейкам и давали 180 с времени диссоциации. Поверхность чипа регенерировали между циклами двумя 10-секундными импульсами 50 мМ гидроксида натрия. В качестве рабочего буфера использовался HBS-EP+ (GE Healthcare), и все взаимодействия измерялись при 25°C, а скорость сбора данных равной 10 Гц.

Краткое содержание данных поверхностного плазмонного резонанса показано на фиг. 36. Средство может быть измерено с помощью KD (константа равновесной диссоциации между антителом и его антигеном). Варианты антитела 70 имели самые низкие значения KD (от 0,133 до 0,193 нМ) по сравнению с антителом 4 (среднее KD=0,629 нМ) и AMG714 (среднее KD=1,84 нМ). Большая разница в KD между вариантами антитела 70 и AMG714 обусловлена скоростью диссоциации (kd). ИЛ-15 диссоциирует от AMG714 в десять раз быстрее, чем скорость диссоциации ИЛ-15 от вариантов антитела 70. После связывания с ИЛ-15, антитело 70 и его варианты остаются связанными дольше и поэтому превосходно ингибируют активность ИЛ-15. Это было проверено в анализе эффективности на основе клеток.

Активность вариантов антитела 70 и AMG714 оценивали в анализе пролиферации НК-92 с ИЛ-15 в комплексе с рецептором-альфа ИЛ-15 при 25 пМ (EC₅₀) для индукции пролиферации клеток, как описано в примере 3. На фиг. 37 и в табл. 6 показано, что IC₅₀ вариантов антитела 70 была в 83-98 раз ниже, чем IC₅₀ AMG714. Следовательно, антитело 70 превосходно ингибировало активность ИЛ-15 в анализе активности на основе клеток.

Таблица 6. Значения IC₅₀ для анти-ИЛ-15 антител в анализе пролиферации НК-92

Антитело	Среднее значение IC ₅₀ (пМ)	Ст. Откл.	Мин. IC ₅₀ (пМ)	Макс. IC ₅₀ (пМ)
AMG714	1303,2	666,2	377,8	2653,9
Антитело 70a	14,7	3,8	10,2	22,0
Антитело 70b	13,3	2,5	10,6	16,6
Антитело 70e	15,7	4,7	11,7	20,9
Антитело 70f	14,6	5,0	7,3	29,8

Последующие исследования с антителом 70F привели к среднему средству к эпитопу, имеющему KD 430 пМ. В целом, эти результаты предполагают, что варианты антитела 70 имеют улучшенную способность к связыванию, аффинность и активность с ИЛ-15 человека по сравнению с AMG714.

Пример 6. Эпитопное картирование антитела 70

Картирование эпитопа проводили с использованием экспериментов по сканированию аланином. Был проведен модельный анализ для определения вероятных экспонированных остатков ИЛ-15, которые не были вовлечены в связывание ИЛ-15R α . Затем были сконструированы конструкции ИЛ-15, в которых каждый из этих теоретически экспонированных остатков был замещен аланином. Список этих вариантов приведен в табл. 7.

Таблица 7. Список вариантов аланина ИЛ-15

Остаток	Положение	Процент воздействия растворителя на боковую цепь
N	1	37,7
V	3	52
N	4	55
S	7	55,1
D	8	26,8
K	10	66,1
K	11	53,6
E	13	35,2
D	14	65,5
L	15	35,2
Q	17	70,7
S	18	79,1
H	20	94,5
S	29	34
D	30	78,8
H	32	57,2
P	33	61,1
S	34	69,8
K	36	46
K	41	63,6
Q	48	61,4
D	56	43,7
A	57	66,7
H	60	56,4
D	61	61
E	64	70,4
I	68	64,6
L	69	31,6
N	72	59,6
S	75	70,2
N	77	77,9
N	79	96,5
V	80	96,9
T	81	91,5
E	82	42,9
S	83	93,8
K	86	65,7
E	92	64,1
K	94	50,5
N	95	59,2
K	97	77,1
E	98	37,6
Q	101	49,5
H	105	55,2
Q	108	60,7
M	109	55,4
I	111	41,3
N	112	93,3

Эти конструкции затем коэкспрессировали с ИЛ-15R α и надосадком из экспрессионных культур, протестированных на экспрессию белка и связывание с антителом 70a с использованием SPR.

Используемый рабочий буфер был HBS-EP+ (GE Healthcare). Все взаимодействия были измерены при 25°C, и скорость сбора данных была установлена на 10 Гц. Данные от FC2-1 использовались для анализа. Полученные сенсограммы были проанализированы путем создания двух пользовательских точек отчета, каждая из которых рассчитывалась для окна старта продолжительностью 5 с, начинающегося либо через 10 с после введения образца ("раннее связывание"), либо за 10 с до окончания диссоциации ("позднее связывание"). Эти значения были вычтены из значений для нетрансфицированного контроля, и сначала была оценена относительная скорость диссоциации, взяв соотношение этих двух пользовательских точек отчета ("позднее связывание"/"раннее связывание"), а затем получив результирующие значения как фракцию значения, рассчитанного для ИЛ-15 человека дикого типа, находящегося в комплексе с рецептором-альфа ИЛ-15 (данные не показаны).

Чтобы подтвердить результаты скрининга надосадка, образцы, которые показали более высокую скорость диссоциации по сравнению с ИЛ-15 человека дикого типа, образующим комплекс с рецептором-альфа ИЛ-15, были очищены и повторно протестированы с помощью SPR. Сенсорный чип белка А (GE Healthcare) использовался для захвата антитела 70а во вторую проточную ячейку до уровня захвата 150-200 RU. Очищенные аланиновые сканируемые конструкции ИЛ-15 разбавляли до 10 мкг/мл в HBS-EP+ и затем делали серию 2-кратных разведений. Связывание измеряли путем инъекции 45 мкл каждого разведения при скорости потока 30 мкл/мин через обе проточные ячейки и давали 600 с времени диссоциации. Поверхность чипа регенерировали между циклами с помощью 10-секундного импульса 50 мМ гидроксида натрия. В качестве рабочего буфера использовался HBS-EP+ (GE Healthcare) Все взаимодействия измерялись при 25°C, а скорость сбора данных была установлена на 10 Гц. Данные из FC2-1 были использованы для анализа, и сгенерированные сенсограммы были подобраны с использованием уравнения Ленгмюра 1:1 (с использованием локальной подгонки Rmax) для определения KD. Данные показаны на фиг. 38 для всех вариантов аланина ИЛ-15, коэкспрессированных с ИЛ-15Pα, которые показали снижение связывания с тестируемыми анти-ИЛ-15 антителами. Антитело 70а имело низкое связывание с мутированным ИЛ-15 с заменой Q108A. AMG714 не имеет связывания или значительно снижает связывание с мутированным ИЛ-15 со следующими аминокислотными заменами: E98A, Q101A, N105A и Q108A. Эти результаты показывают, что мутация этих 4 аминокислот нарушает связывание AMG714 с комплексом ИЛ-15 с альфа-рецептором ИЛ-15, и только мутация Q108 нарушает связывание антитела 70а с ИЛ-15, образующим комплекс с рецептором-альфа ИЛ-15. Результаты на фиг. 38 показывают, что для тестируемых остатков в ИЛ-15 связывание антитела AMG714 уменьшается при изменении остатков, тогда как связывание антитела 70а не снижается путем изменения, учитывая высокую аффинность антитела для ИЛ-15; только изменение Q108 в ИЛ-15 приводило к снижению связывания антителом 70а.

Учитывая, что оба антитела (антитело 70а и AMG714) имели слабое связывание или не связывались с мутантом ИЛ-15 Q108A, был проведен дополнительный скрининг на антитело 70а с другим анти-ИЛ-15 антителом, которое связывало Q108 и комплекс ИЛ-15 дикого типа с равным сродством, демонстрирующим, что мутант Q108A правильно свернут. Аланиновое сканирование идентифицирует остатки, которые при мутировании могут нарушать связывание антитела с ИЛ-15. Чтобы определить точные остатки, которые контактируют с ИЛ-15 и, таким образом, определить эпитоп, связывающий антитело 70а, взаимодействие антитела 70а с ИЛ-15 человека было охарактеризовано с помощью рентгеновской кристаллографии.

При подготовке к экспериментам по кристаллизации рекомбинантный ИЛ-15 человека был экспрессирован и очищен от бактерий. Fab антитела 70а (где Fab представляет собой фрагмент, связывающий антиген) получали путем опосредованного папаином расщепления шарнира антитела, которое отделяет Fab антитела от Fc. Fab очищали с помощью стандартных методов хроматографии на белке-А и формировали комплекс с ИЛ-15. Fab: ИЛ-15 очищали с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру и устанавливали для скрининга на кристаллизацию с использованием скринов на кристаллизацию с разреженной матрицей. Конечные кристаллы, использованные для сбора дифракционных данных, были сформированы в 10% полиэтиленгликоле (ПЭГ) 20000, 20% ПЭГ 500 монометилом эфире (ММЕ), 30 мМ CaCl₂, 30 мМ MgCl₂, 100 мМ неуказанного имидазола/какодилата натрия/MES (кислота)/Бис-Трис буферной смеси, pH 6,5. Данные дифракции были собраны до 2,25 Å: на линии луча i04 на установке Diamond Synchrotron. Структура была решена путем молекулярной замены с использованием опубликованных структур человеческих молекул ИЛ-15 и Fab в качестве шаблонов для построения модели. Структура была итеративно уточнена по экспериментальным данным до значений R/Rfree 23,6/28,9. Структура показывает, что переменные участки антитела 70а связываются в сайтах связывания ИЛ-2Pγ и ИЛ-2Pβ ИЛ-15 человека, таким образом блокируя взаимодействие этих рецепторных единиц с ИЛ-15 (фиг. 39А и 39В). Это дополнительно демонстрируется путем изучения взаимодействия боковых цепей ИЛ-15 с боковыми цепями Fab, сравнения их с боковыми цепями ИЛ-15, которые взаимодействуют с ИЛ-2Pγ и ИЛ-2Pβ, и поиска боковых цепей или остатков общее для обоих взаимодействий.

В табл. 8 перечислены взаимодействия между боковыми цепями ИЛ-15 и боковыми цепями фрагмента Fab антитела 70а. Боковые цепи антитела 70а Fab, которые связываются с ИЛ-15, образуют паратоп антитела 70а и родственных антител. Представленные в таблице интерпретации соответствуют "гид-

рофобным взаимодействиям" - ван-дер-ваальсовым взаимодействиям между парами атомов; "опосредованной водой" - опосредованные водой водородные связи между парами атомов; "водородная связь" - водородные связи гетероатомов между 2,5-3,5 ;;; "Н-ri водородная связь" - водородная связь, соответствующая донорному/акцепторному атому в ароматическом соединении

Таблица 8. Боковые цепи взаимодействия ИЛ-15 с FAb антитела 70a

Остаток ИЛ-15		Антитело 70a Fab			
остаток	Название химического атома	CDR	Остаток	Название химического атома	Интерпретация
Ile6	боковая цепь	CDR_L1	Tyr31	Фенильное кольцо	Гидрофобное взаимодействие
Ser7	Карбонильный остов	CDR_L1	Arg29	Карбонильный остов	Водно-опосредованная водородная связь
Lys10	Аминогруппа	CDR_L1	Leu28	Карбонильный остов	Водородная связь
Lys10	Аминогруппа	CDR_L1	Arg29	Карбонильный остов	Водородная связь
Lys10	Карбонильный остов	CDR_L1	Tyr32	Гидроксильная группа	Водородная связь
Lys10	Алифатическая часть боковой цепи	CDR_L1	Tyr32	Фенильное кольцо	Гидрофобное взаимодействие
Glu13	Карбоксилат	CDR_H3	Trp99	Индольный азот	Водородная связь
Glu13	Карбоксилат	CDR_L2	Lys51	Амидный остов	Водно-опосредованная водородная связь
Glu13	Карбоксилат	CDR_L2	Asn53	Амидный азот	Водно-опосредованная водородная связь
Asp14	Карбоксилатная группа	CDR_L1	Tyr32	Гидроксильная группа	Водородная связь
Asp14	Карбоксилатная группа	CDR_L2	Lys51	Аминогруппа	Водородная связь
Ser29	Карбонильный остов	CDR_H1	Ser32	Гидроксильная группа	Водородная связь
Val31	Карбонильный остов	CDR_H2	Tyr52	Гидроксильная группа	Водородная связь
Pro81	Боковая цепь	CDR_H2	Tyr54	Фенильные кольца	Гидрофобное взаимодействие
Gln101	Амидный азот	CDR_H3	Ile97	Карбонильный остов	Водородная связь
Val104	Боковая цепь	CDR_H3	Trp99	Индольная группа	Гидрофобное взаимодействие
His105	Азот боковой цепи	CDR_H3	Gly98	Амидный остов	Водородная связь
His105	Азот боковой цепи	CDR_H1	Ser32	Карбонильный остов	Водородная связь
Gln108	Амидный азот	CDR_L3	Gly95	Карбонильный остов	Водородная связь
Gln108	Амидный кислород	CDR_L1	Tyr31	Гидроксильная группа	Водородная связь
Gln108	Амидный кислород	CDR_H3	Gly99	Карбонильный остов	Водно-опосредованная водородная связь
Ile111	Карбонильный остов	CDR_L3	Lys95A	Аминогруппа	Водородная связь
Asn112	Амидный азот	CDR_H1	Trp34	Индольная группа	Н-ri водородная связь
Asn112	Карбонильный остов	CDR_H2	Asn58	Амидный азот	Водородная связь
Thr113	Метил боковой цепи	CDR_H2	Tyr56	Фенильное кольцо	Гидрофобное взаимодействие
Ser114	С-конец	CDR_L3	Lys95A	Аминогруппа	Водородная связь

Аналогичный анализ был выполнен на рентгеновской структуре четвертичного комплекса рецептора ИЛ-15 (код pdb 4GS7). В табл. 9 показаны остатки ИЛ-15, важные для связывания комплекса ИЛ-15 с ИЛ-2R γ и ИЛ-2R β на основе водородной связи, которая происходит между боковыми цепями ИЛ-15 и боковыми цепями ИЛ-2R γ и ИЛ-2R β .

Таблица 9. Взаимодействия боковых цепей ИЛ-15 с ИЛ-2Р γ и ИЛ-2Р β

Остаток ИЛ-15		Остаток ИЛ-2Р γ		
Остаток	Название химического атома	Остаток	Название химического атома	Интерпретация
Asp30	Амидный кислород	Asn71	Азот боковой цепи	Водородная связь
Asp30	Карбоксилатная группа	Thr105	Гидроксильная группа	Водородная связь
His32	Азот боковой цепи	Asp73	Карбоксилатная группа	Водородная связь
Gln108	Амидный кислород	Tyr103	Гидроксильная группа	Водородная связь
Gln108	Аминогруппа	Pro207	Амидный кислород	Водородная связь
Gln108	Аминогруппа	Ser211	Гидроксильная группа	Водородная связь
Asn112	Карбоксилатная группа	Cys160	Сульфид	Водородная связь
Asn112	Аминогруппа	Tyr103	Гидроксильная группа	Водородная связь
Остаток ИЛ-15		Остаток ИЛ-2Р β		
Остаток	Название химического атома	Остаток	Название химического атома	Интерпретация
Asn1	Карбоксилатная группа	Thr74	Гидроксильная группа	Водородная связь
Asp8	Карбоксилатная группа	His133	Азот боковой цепи	Водородная связь
Asp8	Карбоксилатная группа	Tyr134	Гидроксильная группа	Водородная связь
Glu64	Карбоксилатная группа	Arg42	Аминогруппа	Водородная связь
Asn65	Карбоксилатная группа	Arg42	Аминогруппа	Водородная связь
Asn65	Карбоксилатная группа	Arg42	Аминогруппа	Водородная связь
Ser7	Гидроксильная группа	Glu136	Карбоксилатная группа	Водородная связь
Asn65	Азот боковой цепи	Gln70	Карбонильный остов	Водородная связь

Площадь поверхности, доступная растворителю, образованная при взаимодействии антитела 70 с ИЛ-15 человека, составляет 2270,9 \pm 2. Эта величина была рассчитана в RYMOL с использованием метода Strake and Rupley (1973) *J. Mol. Biol.* 79: 351-71.

Сравнение взаимодействий боковой цепи FAb антитела 70a с ИЛ-15 и взаимодействий боковой цепи бета- и гамма-цепей ИЛ2Р с ИЛ-15 идентифицирует несколько общих остатков. S7 (Ser7) образует водородную связь с ИЛ-2Р β , а Q108 (Gln108) и N112 (Asn112) образуют водородные связи с ИЛ-2Р γ (фиг. 39С-39Е). Эти 3 остатка также образуют эпитоп на ИЛ-15, с которым FAb антитела 70a связывается и образует водородные связи, тем самым предотвращая взаимодействие ИЛ-15 с ИЛ-2Р β и ИЛ-2Р γ .

Тройной мотив тирозина, содержащий Y52/54/56 в CDRH2, обнаруженный во время созревания аффинности и активности антитела 70a, является ключевой детерминантой связывания антитела с ИЛ-15 человека. Изучая кристаллическую структуру (фиг. 39F-39H), можно видеть, что этот мотив скрывает и защищает гидрофобные остатки вокруг спирали-4 ИЛ-15, предотвращая сольватацию и стабилизируя структуру.

Пример 7. Обнаружение проточной цитометрией вариантов связывания с ИЛ-15 на первичных клетках человека

Чтобы дополнительно охарактеризовать антитела, была проверена их способность связывать ИЛ-15 на первичных клетках человека. Периферические мононуклеарные клетки человека (PBMC) были выделены и очищены от лейкоцитарной пленки с использованием Lymphoprep (Axis-Shield, Lymphoprep), и связывание свинца Ат было оценено с помощью анализа проточной цитометрией.

1×10^6 жизнеспособных PBMC первоначально высевали на лунку в 96-луночный полипропиленовый планшет (Sigma/Corning) и окрашивали красителем Zombie Violet (Biolegend) в течение 20 мин при 4°C. Клетки дополнительно окрашивали TruStain FcX Fc блоком (Biolegend), разведенным в буфере FACS, в течение 10 мин при комнатной температуре. Для окрашивания поверхности, PBMC окрашивали 10 мкг/мл тестируемых антител или антител изотипического контроля (перечислены в табл. 10) и инкубировали в течение 20 мин при 4°C. После иммуноокрашивания образцы затем фиксировали с помощью BD цитофикс/цитоперм (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя и хранили при 4°C

до анализа. Для внутриклеточного окрашивания РВМС фиксировали с помощью ВД цитофикс/цитоперм (BD Biosciences) перед окрашиванием. Образцы анализировали с использованием BD FACSCanto II (BD Biosciences).

Первоначальная дублетная дискриминация была выполнена на всех клеточных событиях, чтобы удалить клеточные агрегаты из анализа. Живые клетки отбирали после исключения мертвых клеток с использованием красителя на жизнеспособность. Первичное стробирование лейкоцитов разделяло клетки на следующие: CD3⁻CD8⁻ клетки, CD3⁺CD8⁺ Т-клетки и CD3⁺CD8⁻ (предположительно CD4⁺) Т-клетки. Дальнейший анализ CD3⁻ популяции разделил клетки на CD19⁺ В-клетки и CD19⁻ клеточную популяцию. Последняя популяция снова была подвергнута дополнительному стробированию для отбора на CD56dimCD16⁺ и CD56briCD16dim⁻ НК-клетки. Кроме того, на основании уровней экспрессии CD14 и CD16 моноциты (Hi SSC-популяция) были впоследствии подразделены на три основных подгруппы моноцитов: классические (CD14⁺ CD16⁻), промежуточные (CD14intCD16int) и неклассические (CD14dimCD16⁺). Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения для анализа FLOWJO®V.10.

Таблица 10. Список антител и конъюгатов

Специфичность	Конъюгат	Клон	Виды и Изотип	Поставщик
Анти-человеческие антитела				
CD3	APC-Vio770	REA613	Рекомбинантный человеческий IgG1	Miltenyi Biotec
CD8	VioGreen	BW135/80	IgG2a мыши	Miltenyi Biotec
CD14	PerCP	TUK4	IgG2a к мыши	Miltenyi Biotec
CD16	FITC	REA423	Рекомбинантный человеческий IgG1	Miltenyi Biotec
CD19	PE	LT19	IgG1 к мыши	Miltenyi Biotec
CD56	PE Vio770	AF12-7H3	IgG1 мыши	Miltenyi Biotec
ИЛ-15	iFluor647	Антитело 70a	IgG1 к человека	Внутренний
	iFluor647	Антитело 70b	IgG1 к человека	Внутренний
	iFluor647	Антитело 70e	IgG4 λ человека	Внутренний
	iFluor647	Антитело 70f	IgG4 λ человека	Внутренний
Антитела изотипического контроля				
Анти-KLH IgG1	C3 iFluor647		IgG1 человека	Внутренний
Анти-KLH IgG4	C3 iFluor647		IgG4 человека	Внутренний
APC: аллофикоцианин; FITC: Флуоресценн изотиоцианат; PE: Фикоэритрин; PerCP: Перидинина хлорофилл белок				

Репрезентативное связывание вариантов антитела 70 с моноцитами продемонстрировано на фиг. 40. Умеренное связывание вариантов антитела 70 было обнаружено на клеточной поверхности всех подгрупп моноцитов (классических, промежуточных и неклассических). Сообщалось о более высоких уровнях связывания во внутриклеточном связывании во всех подгруппах моноцитов. Маргинальные различия в уровнях обнаружения связывания были обнаружены между обоими вариантами антитела 70. На поверхности Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ и всех подмножеств НК-клеток не было обнаружено или было обнаружено слабое связывание. Эти результаты показывают, что варианты антитела 70 были способны связывать ИЛ-15 человека на первичных клетках.

Пример 8. Эффективность анти-ИЛ-15-антител в животных моделях

8.1 Нейтрализация in vivo ИЛ-15 человека и ИЛ-15 в комплексе с рецептором-альфа ИЛ-15

Это исследование было предпринято для определения степени, в которой рекомбинантный ИЛ-15 человека или комплекс ИЛ-15/ИЛ-15Р α может индуцировать размножение НК и НКТ-клеток у мышей C57BL/6, и степени, в которой иллюстративное антитело по данному изобретению может нейтрализовать такую индукцию.

Группам из 8 самцов мышей C57BL/6 вводили одну дозу антитела 70f (в дозе 10, 3, 1, 0,3 или 0,1 мг/кг) или изотипического контроля (10 мг/кг) внутрибрюшинно в день 1 (за 1 ч до первой инъекции цитокина). НК1.1+ клетки индуцировали внутрибрюшинной инъекцией рекомбинантного комплекса ИЛ-15 (где ИЛ-15Р α представляет собой химеру Fc) (1,5 мкг/мышь) ежедневно в течение 3 дней с 1 по 3 день. На день 4 собирали селезенки мышей. Суспензии клеток готовили из всей селезенки каждой мыши и подсчитывали на автоматическом счетчике клеток. Количество НК1.1+ оценивали по суспензиям клеток методом проточной цитометрии в расчете на % от общего количества спленоцитов. Использовали конъюгированное с фикоэритрином антимишиное НК-1.1 (BD553165). 50000 событий/образец были получены на цитометре.

Как продемонстрировано на фиг. 41, инъекция комплекса ИЛ-15/ИЛ-15Р α индуцировала накопле-

ние НК1.1+ клеток в селезенке мыши. Это накопление может быть значительно ингибировано лечением антителом 70f от 0,3 мг/кг, но не антителом изотипического контроля человека.

8.2. Влияние анти-ИЛ-15 антител на количество циркулирующих НК-клеток у приматов, не являющихся человеком

Ранее было показано, что введение анти-ИЛ-15 антител снижает количество циркулирующих НК-клеток у обезьян *Synomolgus* (Lebrec et al. (2013) *J. Immunol.* 191:5551-5558). Чтобы дополнительно охарактеризовать антитело 70, следствие антагонистической активности ИЛ-15 на циркулирующих НК-клетках тестировали *in vivo*. Группы из 4 самцов обезьян *Synomolgus* получали одну внутривенную инъекцию антитела 70f в дозе 1 или 10 мг/кг или антитела 70b в дозе 10 мг/кг. Циркулирующие количества НК-клеток были определены количественно по экспрессии маркера НК-клеток CD159a (NKG2A), определенной с помощью анализа проточной цитометрии образцов цельной крови до введения дозы и в дни исследования 2, 5, 8, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 102, 120 и 150.

Отдельные временные точки для каждой обезьяны и среднее (сплошная линия) количество НК-клеток периферической крови продемонстрированы на фиг. 42. Введение антитела 70f в дозе 1 или 10 мг/кг или антитела 70b в дозе 10 мг/кг приводило к значительному уменьшению количества циркулирующих НК-клеток до введения дозы, начиная с 7 дня исследования, которое поддерживалось до 120 дня исследования у большинства животных.

8.3. Влияние анти-ИЛ-15 антител на резус-модель целиакии у приматов, не являющихся человеком

Хроническая диарейная болезнь под названием "Чувствительная к глютену энтеропатия" была описана в подгруппе макак-резусов в неволе, которых кормили глютеносодержащей пищей. При кормлении глютеносодержащей пищей чувствительные к глютену макаки демонстрировали признаки и симптомы целиакии, в том числе наличие аутоантител к трансглутаминазам кишечной ткани, антиглиадиновые сывороточные антитела, снижение резорбции питательных веществ, снижение метаболизма ксенобиотиков, атрофию ворсинок, снижение разнообразия микробиома кишечника, хроническую диарею, потерю веса, предрасположенность к раку и иммуногенетическую (MHC II-связанную) ассоциацию (Bethune MT et al. (2008) *PLoS ONE.* 3(2):e1614). Безглютеновая диета полностью изменила эти клинические, гистологические и серологические особенности, в то время как повторное введение пищевого глютена вызвало быстрый рецидив. Интересно, что биопсия чувствительных к глютену макак показала сверхэкспрессию ИЛ-15 в тканях тонкого кишечника (Sestak K. et al. (2016) *Nutrients.* 8(7):401.)

Способность анти-ИЛ-15 антитела по изобретению ингибировать глютеининдуцированные симптомы тестировали на макаках-резусах с чувствительной к глютену энтеропатией. Безглютеновые (GFD) и глютеносодержащие (GD) диеты давали всем 6 чувствительным к глютену макакам, чтобы вызвать стадии иммунологической ремиссии и рецидива, соответственно, характеризуемые антиглиадин (AGA) и анти-трансглутаминаза 2 (TG2) положительными и отрицательными ответами антител плазмы, как описано в Sestak et al., 2015; 2016. После индукции рецидива AGA/TG2 антитела, антитело 70f внутривенно (в/в) вводили еженедельно в дозе 10 мг/кг (BW) трем животным в течение 28 дней (группа 1) и трем животным в течение 90 дней (группа 2) в то время как макаки по-прежнему питались глютеносодержащей диетой. Кишечные биопсии были взяты на этапах исследования, чтобы измерить отношение высоты ворсинок к глубине крипты, и количество интраэпителиальных лимфоцитов (IEL). Присутствие аутоантител против антител к трансглутаминазе-2 и антиглиадину измеряли на образцах сыворотки. Дизайн исследования продемонстрирован на фиг. 45A.

Оценка антител AGA и TG2 в плазме (IgG), энтеропатии GS, включая морфометрическую оценку высоты ворсинок тонкого кишечника в зависимости к глубине крипты, то есть отношение V/C, была проведена в соответствии с ранее установленными протоколами Sestak et al, 2015; 2016. Биопсии тонкого кишечника собирали в моменты времени, соответствующие иммунологическому рецидиву (GD) и ремиссии (GFD), а также началу и концу периода лечения анти-ИЛ-15 антителом. Биопсии были собраны и обработаны для подсчета интраэпителиальных лимфоцитов (IEL), как описано Sestak et al., 2016.

Результаты

Оценка биопсии тканей тонкого кишечника, собранной от чувствительных к глютену макак-резусов, во время и после лечения анти-ИЛ-15 антителом, показала улучшение энтеропатии при морфологической оценке структуры ткани тонкого кишечника, то есть соотношения высоты ворсинки к глубине крипты (V/C). На глютеносодержащей диете у макак в обеих группах отмечалась значительная потеря высоты ворсинок, структуры ткани глубины крипты (фиг. 45B). Соотношения V/C значительно улучшились при лечении анти-ИЛ15-антителами ($p < 0,0001$) в пользу обеих групп целиакии, поскольку все обработанные животные демонстрировали повышенную высоту ворсинок тонкого кишечника, то есть соотношения V/C в степени сопоставимой со здоровым соответствующему возрасту контролю (фиг. 45B).

Чтобы оценить эффективность лечения анти-ИЛ-15 антителами макак-резусов, чувствительных к глютену, сравнивали количество IEL тонкого кишечника между образцами биопсии, взятыми в моменты времени, представляющие диету GD (6 месяцев), GFD (3 месяца) и лечение анти-ИЛ-15 антителами (дни 35 и 61) во время GD (фиг. 45C). По сравнению с подсчетом IEL, взятым в более ранний момент времени, когда животные находились на GD, в обеих группах, получавших лечение анти-ИЛ-15 антителом,

уровень IEL был значительно ниже ($p < 0,0001$). Несмотря на то, что на диете, содержащей глютен, лечение анти-ИЛ15 антителами, измеренное на 35-й день после лечения (TD35) в группе 1 и на TD61 у макак группы 2, привело к большему снижению IEL ($p < 0,0001$), чем связанное с 3 месяцами GFD (фиг. 45C).

До начала лечения уровни антиглиадиновых антител увеличивались при воздействии глютена и снижались на безглютеновой диете у 5/6 животных (животное 1В не имело ответа AGA), что указывало на то, что животные были чувствительны к глютену (фиг. 45D). Лечение анти-ИЛ-15 снижало антиглиадиновые антитела (AGA) у 5/5 животных, которые имели высокие уровни AGA до лечения, что было удивительно, учитывая, что эти животные все еще подвергались воздействию GD.

Таким образом, лечение анти-ИЛ15 антителами ослабляло индуцированное глютенем повреждение слизистой оболочки тонкого кишечника (улучшенное отношение V/C), ослабляло индуцированное глютенем воспаление слизистой оболочки тонкого кишечника (уменьшенное количество IEL) и ослабляло индуцированные глютенем сывороточные антитела (сниженные антиглиадиновые антитела), как измерено в модели макаки-резуса при целиакии.

Описание не ограничено вариантами осуществления, описанными и приведенными в качестве примера выше, но допускает изменение и модификацию в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, причем указанное антитело специфически связывается с ИЛ-15 человека, причем указанный ИЛ-15 образует комплекс с рецептором альфа ИЛ-15(ИЛ-15P α).

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что содержит HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

3. Антитело по п.1 или 2, отличающееся тем, что содержит LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

отличающееся тем, что содержит LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

отличающееся тем, что содержит LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

отличающееся тем, что содержит LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или

отличающееся тем, что содержит LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 519.

4. Антитело по п.3, отличающееся тем, что содержит (i) варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и (ii) варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

отличающееся тем, что антитело содержит варибельный участок тяжелой цепи, содержащий (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 454, и (ii) варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

отличающееся тем, что антитело содержит (i) варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и (ii) варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 455, или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 456;

отличающееся тем, что антитело содержит (i) варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и (ii) варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 457, или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 458; или

отличающееся тем, что антитело содержит (i) варибельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и (ii) варибельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 459, или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 460.

5. Антитело по п.1, отличающееся тем, что содержит HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и FR3 тяжелой цепи, со-

NO: 454, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 507;

(m) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 454, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

(n) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 454, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 509; или

(o) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 454, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 510.

10. Антитело по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что содержит константный домен IgG.

11. Антитело по п.10, отличающееся тем, что содержит константный домен IgG4, константный домен IgG1 или константный домен IgG2.

12. Антитело по п.11, отличающееся тем, что константный домен IgG4 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51,

отличающееся тем, что константный домен IgG1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39, или

отличающееся тем, что константный домен IgG2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43.

13. Антитело по любому из пп.1-12, отличающееся тем, что ингибирует пролиферацию клеток натуральных киллеров (НК) с IC_{50} от около 0,1 до около 900 пМ в анализе пролиферации НК-клеток,

отличающееся тем, что антитело ингибирует пролиферацию НК-клеток с IC_{50} от около 1 до около 60 пМ в анализе пролиферации НК-клеток,

отличающееся тем, что антитело ингибирует пролиферацию НК-клеток с IC_{50} от около 5 до около 35 пМ в анализе пролиферации НК-клеток,

отличающееся тем, что антитело способно нейтрализовать ИЛ-15.

14. Антитело по любому из пп.1-13, отличающееся тем, что связывается с эпитопом, содержащим остаток Q108 ИЛ-15 человека.

15. Антитело по п.14, в котором эпитоп дополнительно содержит остатки S7 и N112 ИЛ-15 человека.

16. Антитело по любому из пп.1-16, отличающееся тем, что имеет аффинность к ИЛ-15 человека, которая имеет значение константы диссоциации (KD) менее чем около $1,8 \times 10^{-9}$ М, как определено поверхностным плазмонным резонансом, или при этом константа диссоциации (KD) составляет менее чем 1×10^{-9} М.

17. Антитело, которое связывается с ИЛ-15, причем указанный ИЛ-15 находится в комплексе с рецептором альфа ИЛ-15 (ИЛ-15P α), содержащее вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, отличающееся тем, что указанный вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и отличающееся тем, что вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

18. Антитело по п.17, отличающееся тем, что содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6,

отличающееся тем, что антитело, дополнительно содержит константный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, или

отличающееся тем, что антитело, дополнительно содержит константный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, или отличающееся тем, что антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

19. Композиция для лечения целиакии, рефрактерной целиакии, ревматоидного артрита, псориаза, воспалительного заболевания кишечника, диабета 1 типа, очаговой алопеции, Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов, аутоиммунного заболевания, аутоиммунного заболевания, при котором нарушается регуляция ИЛ-15, воспалительного заболевания или воспалительного состояния, или воспалительного заболевания или воспалительного состояния, при котором нарушается регуляция ИЛ-15, содержащая антитело по любому из пп.1-18 и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

20. Применение антитела по любому из пп.1-18 для лечения целиакии, рефрактерной целиакии, ревматоидного артрита, псориаза, воспалительного заболевания кишечника, диабета 1 типа, очаговой алопеции, Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов, аутоиммунного заболевания, аутоиммунного заболевания при котором нарушается регуляция ИЛ-15, воспалительного заболевания или воспалительного состояния, или воспалительного заболевания или воспалительного состояния при котором нарушается регуляция ИЛ-15.

21. Способ *in vitro* для обнаружения ИЛ-15 или комплекса ИЛ-15 и рецептора альфа ИЛ-15 в образце ткани, выделенном из субъекта, включающий приведение в контакт антитела по любому из пп.1-18 с образцом ткани, выделенным из субъекта, с образованием комплекса антитело-ИЛ-15 с указанным рецептором альфа ИЛ-15 или комплекса антитело-антиген антитела с ИЛ-15 и рецептором альфа ИЛ-15, и обнаружение комплекса антитело-ИЛ-15 или комплекса антитело-антиген в указанном образце ткани.

22. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую варибельную область тяжелой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

23. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую варибельную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

24. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело по любому из пп.1-18.

25. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п.24.

26. Трансформированная клетка, которая экспрессирует антитело по любому из пп.1-18, где указанная клетка содержит экспрессионный вектор по п.25.

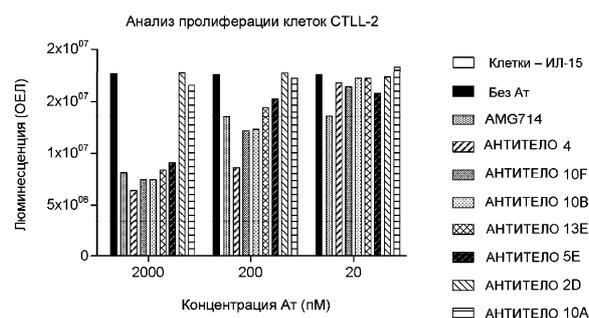
27. Способ получения антитела, которое специфически связывается с ИЛ-15 человека, при этом ИЛ-15 находится в комплексе с ИЛ-15R α , включающий (i) культивирование клетки по п.26 в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного антитела, и (ii) выделение указанного антитела.

28. Клетка, экспрессирующая варибельную область тяжелой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где указанная клетка трансфицирована экспрессионным вектором, содержащим полинуклеотид по п.22.

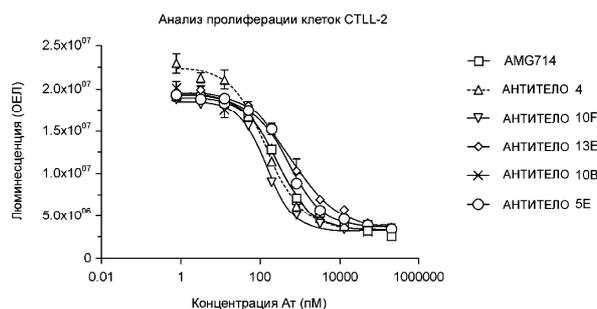
29. Клетка, экспрессирующая варибельную область легкой цепи антитела, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, при этом клетка трансфицирована экспрессионным вектором, содержащим полинуклеотид по п.23.

Клон	Супернатанты гибридомы инкубированные на					
	Клетка трансфицирована с (ИФА)...		Планшеты покрыты с (ИФА)...			
	Комплекс ИЛ-15		Комплекс ИЛ-15		Свободный рецептор ИЛ-15R α	
	гfu	% положительных	гfu	% положительных	гfu	% положительных
АНТИТЕЛО 1A6	120	12%	150	18%	93	16%
АНТИТЕЛО 1B3	1160	120%	1629	191%	1488	258%
АНТИТЕЛО 2D	972	98%	1280	142%	30	6%
АНТИТЕЛО 4	1534	149%	1242	140%	97	19%
АНТИТЕЛО 10A	1435	119%	1222	139%	57	11%
АНТИТЕЛО 10B	1471	122%	1160	132%	72	14%
АНТИТЕЛО 10F	1235	102%	831	95%	96	19%
АНТИТЕЛО 13E	1435	118%	1362	167%	113	16%
АНТИТЕЛО 5E	994	100%	810	94%	41	10%
АНТИТЕЛО 10H	1137	119%	1752	217%	1440	316%
АНТИТЕЛО 10F-7	43	4%	152	19%	88	19%

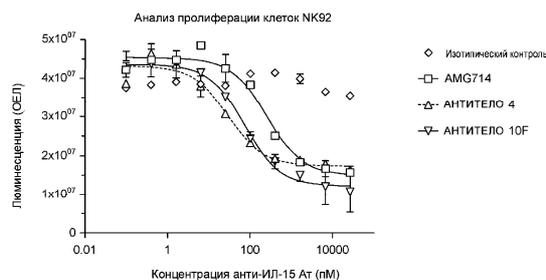
Фиг. 1



Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 3

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/с)	Kd (1/с)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
1	VL_Q024A	338.1	1.35E+05	1.55E-04	1.15E-09	138.8	133.3	129.6	0.972
1	VL_Q024L	335.6	1.39E+05	1.60E-04	1.15E-09	139.5	134.5	130.6	0.971
1	VL_Q024Y	324.8	1.39E+05	1.45E-04	1.04E-09	134.3	129.4	126	0.974
1	VL_Q024W	358.3	1.36E+05	1.40E-04	1.03E-09	148.1	142.6	139	0.975
1	VL_Q024K	336.6	1.28E+05	1.65E-04	1.29E-09	134.8	128.4	124.6	0.970
1	VL_G025Q	309.3	8.36E+04	3.88E-04	4.64E-09	110.8	94.3	89.9	0.953
1	VL_G025W	387.8	7.42E+04	7.03E-03	9.47E-09	121	83.8	39.8	0.475
1	VL_G025S	370.9	8.85E+04	3.94E-04	4.45E-09	135	117.3	111.6	0.951
1	VL_G025Y	348.7	7.23E+04	3.65E-03	5.04E-08	115.4	85.9	57.3	0.667
1	VL_G025H	384.3	9.15E+04	2.90E-04	3.17E-09	140.6	123.5	118.8	0.962
1	VL_D026A	353	1.21E+05	1.65E-04	1.36E-09	139.2	131	127.4	0.973
1	VL_D026Q	417.8	1.12E+05	1.81E-04	1.61E-09	160.3	149.7	145.4	0.971
1	VL_D026S	356	1.20E+05	1.69E-04	1.41E-09	140.2	132.1	128.3	0.971
1	VL_D026W	396.7	1.15E+05	1.76E-04	1.53E-09	153.6	144.3	140.1	0.971
1	VL_D026H	366.2	1.19E+05	1.35E-04	1.13E-09	142.2	134.1	130.7	0.975
1	VL_D026K	328.7	1.15E+05	1.79E-04	1.55E-09	128.9	120.3	116.8	0.971

Фиг. 4

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/с)	Kd (1/с)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
1	VL_D026K	429.2	1.30E+05	4.78E-04	3.69E-09	175.1	167	156.9	0.940
1	VL_T027A	322.1	9.77E+04	1.94E-04	1.99E-09	118.6	106.3	103.1	0.970
1	VL_T027K	385	6.16E+04	7.42E-03	1.21E-07	111.2	70.3	31.5	0.448
1	VL_T027S	412.1	1.25E+05	6.70E-04	5.37E-09	166.8	157.1	144.7	0.921
1	VL_T027D	331.7	1.28E+05	4.64E-03	3.62E-08	131	114.7	68.6	0.598
1	VL_T027Y	329.6	9.76E+04	4.14E-03	4.24E-08	120.6	98.7	62.1	0.629
1	VL_T027H	369.9	1.09E+05	4.82E-03	4.43E-08	137.8	115.4	67.8	0.588
1	VL_L028A	347.2	6.52E+04	1.16E-03	1.76E-08	118	89.7	78.8	0.878
1	VL_L028K	345.7	1.45E+05	1.22E-03	8.45E-09	7	6.7	5.8	0.866
1	VL_L028Q	336.9	5.98E+04	2.86E-03	4.78E-08	108.5	75.3	54.7	0.726
1	VL_L028Y	403.9	5.26E+04	3.02E-04	5.75E-09	126.1	89.3	86	0.963
1	VL_L028D	376.9	1.26E+05	4.93E-04	3.93E-09	7.1	7.4	7.1	0.959
1	VL_R029A	334.2	1.46E+05	1.63E-04	1.12E-09	146	141.3	137.3	0.972
1	VL_R029K	305.7	1.38E+05	1.66E-04	1.20E-09	129.8	124.5	120.9	0.971
1	VL_R029Q	372.9	1.45E+05	1.49E-04	1.02E-09	162.3	157.6	153.6	0.975
1	VL_R029W	339.7	1.35E+05	1.59E-04	1.18E-09	141.7	135.8	132.1	0.973
1	VL_R029S	348.9	1.45E+05	1.69E-04	1.17E-09	152.6	147.9	143.7	0.972

Фиг. 5

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/с)	Kd (1/с)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
1	VL_R029L	398.9	1.42E+05	1.51E-04	1.06E-09	171.9	166.7	162.4	0.974
1	VL_R029D	384	1.40E+05	1.50E-04	1.07E-09	167.4	162.4	158.3	0.975
1	VL_R029Y	424.6	1.41E+05	1.39E-04	9.89E-10	180.3	175.3	170.8	0.974
1	VL_R029H	414	1.42E+05	1.35E-04	9.47E-10	177.9	173.3	169.1	0.976
1	VL_N030H	330.4	1.25E+05	3.05E-04	2.45E-09	134.9	127.3	121.9	0.958
1	VL_N030D	421.3	1.35E+05	6.28E-04	4.65E-09	180.2	172.5	159.5	0.925
1	VL_N030Y	357.1	1.39E+05	1.08E-03	7.80E-09	147.6	139.8	122.5	0.876
1	VL_N030W	434.1	1.14E+05	2.75E-03	2.40E-08	169	150.1	110.3	0.735
1	VL_N030S	342.8	1.42E+05	3.42E-04	2.41E-09	146.7	141.2	134.5	0.953
1	VL_N030L	305.5	1.42E+05	3.38E-03	2.38E-08	125.3	114.1	77.6	0.680
1	VL_Y031A	346.4	1.20E+05	3.21E-04	2.67E-09	7.9	7.2	7.1	0.986
1	VL_Y031K	288.3	1.06E+05	2.43E-04	2.29E-09	7.4	6.5	6.3	0.969
1	VL_Y031Q	392.9	1.36E+10	3.54E+02	2.61E-08	19.4	18.2	8.4	0.462
1	VL_Y031S	394	1.59E+05	1.87E-03	1.18E-08	10.7	10.8	9.2	0.852
1	VL_Y031L	3	8.54E+04	4.69E-04	5.49E-09	7.4	5.7	5.4	0.947
1	VL_Y031D	403.2	9.13E+04	5.59E-07	6.13E-12	7.8	7.5	7.6	1.013
1	VL_Y031H	363.6	1.49E+05	8.97E-04	6.00E-09	8.2	8	7.4	0.925

Фиг. 6

040821

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
1	VL_Y032A	401.9	1.05E+05	7.29E-03	6.94E-08	144	144	112.8	0.470
1	VL_Y032K	281.5	8.23E+04	1.74E-03	2.11E-08	101	101	82.6	0.821
1	VL_Y032Q	353.6	9.69E+04	4.54E-04	4.69E-09	140.3	140.3	124.6	0.945
1	VL_Y032W	364.2	1.03E+05	2.06E-04	2.00E-09	138.8	138.8	126.1	0.971
1	VL_Y032S	344.3	2.66E+05	5.85E-03	2.20E-08	15.5	15.5	15.4	0.623
1	VL_Y032L	315	1.00E+05	6.45E-04	6.43E-09	125.5	125.5	112	0.925
1	VL_Y032D	353.2	2.21E+05	3.55E-02	1.61E-07	102.1	102.1	65.5	0.153
1	VL_Y032H	298.7	1.15E+05	1.80E-04	1.56E-09	122.9	122.9	114.5	0.972
1	VL_A033L	339.6	4.58E+04	3.34E-04	7.31E-09	112.5	112.5	73	0.960
1	VL_A033D	363.2	3.60E+04	6.17E-04	1.71E-08	110.3	110.3	61.2	0.930
1	VL_A033Y	389.5	3.93E+04	8.74E-03	2.22E-07	64.5	64.5	31.4	0.411
1	VL_A033Q	375.6	3.21E+04	9.43E-04	2.94E-08	107.5	107.5	55.2	0.900
1	VL_A033W	384	1.09E+05	3.34E-04	3.06E-09	7.4	7.8	7.8	0.923
1	VL_A033H	383.4	4.35E+04	6.08E-03	1.40E-07	101.8	55.7	55.7	0.522
1	VL_A033K	353.9	1.27E+05	8.64E-04	6.82E-09	7.2	7.2	7.2	0.889
1	VL_S034A	380.3	1.36E+05	1.55E-04	1.14E-09	159.2	153.1	153.1	0.973
1	VL_S034L	361.4	7.86E+04	1.07E-04	1.36E-09	7.1	5.6	5.6	0.982

Фиг. 7

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
1	VL_S034D	388.7	4.67E+04	8.33E-03	1.78E-07	44.9	24.2	10.3	0.426
1	VL_S034Y	351.5	8.05E+04	6.45E-07	8.01E-12	7.3	6	5.9	0.983
1	VL_S034Q	373.7	8.52E+07	6.82E-01	8.00E-09	9.8	10.3	6.7	0.650
1	VL_S034W	355.6	1.16E+05	2.17E-04	1.87E-09	7.3	6.9	6.5	0.942
1	VL_S034H	378.9	7.57E+05	1.33E-01	1.75E-07	68.3	42.3	7.3	0.173
1	VL_G025K	397.5	5.98E+04	5.25E-04	8.78E-09	125.3	93.7	88.1	0.940
1	VL_G025L	394.7	6.02E+04	4.22E-03	7.01E-08	126.9	86.3	54.6	0.633
1	VL_G025D	395.2	1.33E+05	2.31E-04	1.73E-09	165.4	158.3	152.9	0.966
1	VL_D026Y	470.1	1.18E+05	1.54E-04	1.30E-09	184.5	173.8	169.4	0.975
1	VL_T027Q	421.7	1.03E+05	2.51E-03	2.43E-08	161.2	140.1	105.7	0.754
1	VL_T027W	345.4	7.80E+04	4.75E-03	6.08E-08	121.6	90.7	53.4	0.589
1	VL_T027L	380	1.05E+05	2.35E-03	2.24E-08	150	130.6	100.3	0.768
1	VL_L028S	357.7	5.93E+04	4.48E-03	7.55E-08	114.9	76.6	46.7	0.610
1	VL_L028W	404.6	5.44E+04	5.20E-03	9.57E-08	116.3	71.4	41.9	0.587
1	VL_L028H	398.6	5.97E+04	7.56E-04	1.27E-08	134.7	99.8	91.6	0.918
1	VL_N030K	320.8	7.47E+04	1.00E-03	1.34E-08	112	90	80.2	0.891
1	VL_N030Q	379.1	1.20E+05	1.05E-03	8.71E-09	155.4	143.8	126.9	0.882

Фиг. 8

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
1	VL_Y031W	343.9	1.84E+05	8.74E-03	4.75E-08	145.1	126.2	48.6	0.385
1	VL_G050L	400.4	5.95E+04	8.12E-04	1.37E-08	126.1	93	84.8	0.912
1	VL_G050D	383	1.50E+05	4.97E-04	3.30E-09	169.8	164.3	154	0.937
1	VL_G050Y	368.2	8.91E+04	8.58E-04	9.62E-09	136.8	117.8	106.4	0.903
1	VL_K051A	358.7	1.48E+05	1.40E-04	9.42E-10	161.8	157	153.1	0.975
1	VL_K051L	391.7	1.40E+05	1.21E-04	8.65E-10	174.7	168.9	165.2	0.978
1	VL_K051Q	361.2	1.43E+05	1.47E-04	1.03E-09	162.8	157.3	153.3	0.975
1	VL_K051Y	312.9	1.34E+05	1.51E-04	1.12E-09	138.8	132.7	129.5	0.976
1	VL_K051S	415.3	7.08E+04	2.25E-04	3.18E-09	163.9	132.4	128.6	0.971
1	VL_K051W	447.3	1.26E+05	1.73E-04	1.38E-09	190.8	182.1	177.3	0.974
1	VL_N052A	320.3	1.34E+05	1.76E-04	1.31E-09	140.3	134.3	130.6	0.972
1	VL_N052Q	430.2	1.27E+05	1.67E-04	1.31E-09	184.9	176.8	172.2	0.974

2	VH_G026A	268.4	1.46E+05	1.85E-04	1.26E-09	107.8	104.7	101.4	0.968
2	VH_G026K	360	1.30E+05	1.78E-04	1.36E-09	145.1	139.5	135.3	0.970
2	VH_G026W	354.4	1.34E+05	1.60E-04	1.19E-09	144.8	140	136	0.971
2	VH_G026S	341.3	1.41E+05	1.66E-04	1.18E-09	143.6	139.4	135.3	0.971

Фиг. 9

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
2	VH_G026L	356.7	1.43E+05	1.66E-04	1.16E-09	150.7	147.2	142.8	0.970
2	VH_G026D	363.9	1.47E+05	1.88E-04	1.28E-09	155.9	152.8	148	0.969
2	VH_G026Y	341.7	1.38E+05	1.78E-04	1.30E-09	142.1	137.2	133.1	0.970
2	VH_G026H	386.6	1.36E+05	1.85E-04	1.38E-09	160.4	155.9	151.1	0.969
2	VH_G027K	366.2	1.30E+05	1.79E-04	1.38E-09	147.4	141.7	137.3	0.969
2	VH_G027Q	318.7	1.42E+05	1.96E-04	1.38E-09	135.6	131.2	126.9	0.967
2	VH_G027W	303.4	1.38E+05	1.90E-04	1.38E-09	128.8	121.8	117.8	0.967
2	VH_G027S	371.6	1.38E+05	1.77E-04	1.28E-09	154.9	150.8	146.1	0.969
2	VH_G027L	348.8	1.47E+05	1.67E-04	1.14E-09	149.5	145.7	141.3	0.974
2	VH_G027D	314.6	1.44E+05	2.23E-04	1.55E-09	137.2	132.4	127.8	0.965
2	VH_G027Y	391.9	1.38E+05	1.82E-04	1.32E-09	164.8	160.3	155.5	0.970
2	VH_G027H	368.6	1.42E+05	1.88E-04	1.33E-09	156.3	152.4	147.6	0.969
2	VH_S028A	373.7	1.42E+05	1.63E-04	1.15E-09	158.8	155	150.5	0.971
2	VH_S028L	336.4	1.41E+05	1.85E-04	1.31E-09	142.9	137.9	133.6	0.969
2	VH_S028Y	342.1	1.39E+05	1.67E-04	1.20E-09	143.7	138.5	134.4	0.970
2	VH_S028W	341.9	1.34E+05	1.95E-04	1.46E-09	141.5	135.6	131.3	0.968
2	VH_S028H	310.9	1.39E+05	1.74E-04	1.25E-09	131.7	126.9	123.1	0.970

Фиг. 10

040821

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
2	VH_S028K	385.6	1.25E+05	1.75E-04	1.40E-09	154.2	147.9	143.6	0.971
2	VH_I029A	368.5	1.38E+05	2.26E-04	1.64E-09	154.2	150.1	144.8	0.965
2	VH_I029K	319.9	1.27E+05	2.42E-04	1.91E-09	123.3	116.8	112.4	0.962
2	VH_I029Q	338.6	1.37E+05	2.24E-04	1.64E-09	140.5	135.9	131.2	0.965
2	VH_I029W	321.1	1.35E+05	2.26E-04	1.68E-09	131.8	125.7	121.4	0.966
2	VH_I029L	371.5	1.42E+05	1.56E-04	1.10E-09	158	153.5	149.1	0.971
2	VH_I029H	351.4	1.33E+05	2.41E-04	1.82E-09	143.5	137	132	0.964
2	VH_S030A	310.2	1.43E+05	1.56E-04	1.09E-09	133.3	128.5	124.9	0.972
2	VH_S030L	328.8	1.34E+05	1.88E-04	1.40E-09	139.3	133.4	129.3	0.969
2	VH_S030D	362.3	1.45E+05	1.88E-04	1.30E-09	159	154.4	149.6	0.969
2	VH_S030Y	358	1.29E+05	1.86E-04	1.44E-09	149.2	142.6	138.3	0.970
2	VH_S030Q	367	1.41E+05	1.39E-04	9.81E-10	157.2	152.4	148.4	0.974
2	VH_S030W	376.4	1.32E+05	1.76E-04	1.33E-09	155.5	149.6	145.1	0.970
2	VH_S030H	380.5	1.41E+05	1.51E-04	1.07E-09	160.7	155.9	151.6	0.972
2	VH_S030K	343.5	1.24E+05	1.61E-04	1.30E-09	136.7	129.7	126	0.971
2	VH_S031A	349.6	1.39E+05	1.78E-04	1.28E-09	148.6	143.4	139.1	0.970
2	VH_S031L	351.2	1.32E+05	1.96E-04	1.48E-09	148.3	142	137.6	0.969

Фиг. 11

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
2	VH_S031D	363.4	1.37E+05	2.79E-04	2.03E-09	158.3	152.6	146.5	0.960
2	VH_S031Y	371.5	1.35E+05	2.22E-04	1.64E-09	155.9	150.3	145.1	0.965
2	VH_S031Q	334.3	1.40E+05	1.78E-04	1.27E-09	142.5	137.3	133.2	0.970
2	VH_S031W	355.8	1.27E+05	1.75E-04	1.37E-09	142	135.3	131.2	0.970
2	VH_S031H	356.4	1.37E+05	1.95E-04	1.43E-09	150	144.5	139.8	0.967
2	VH_S031K	380.3	1.30E+05	2.73E-04	2.10E-09	156.7	150.7	144.8	0.961
2	VH_S032A	332.3	1.38E+05	1.36E-04	9.87E-10	140.6	135.6	132.2	0.975
2	VH_S032L	366.7	1.30E+05	1.64E-03	1.19E-08	149.7	139.7	116.8	0.836
2	VH_S032D	364.2	1.07E+05	2.77E-03	2.60E-08	149.3	129.9	95.4	0.734
2	VH_S032Y	313.6	1.39E+05	6.63E-04	4.77E-09	130.1	124.3	114.1	0.918
2	VH_S032Q	545.7	1.32E+05	2.52E-04	1.92E-09	224.6	216.9	208.9	0.963
2	VH_S032W	371.9	1.24E+05	3.25E-04	2.63E-09	144.5	137	130.7	0.954
2	VH_S032H	339.4	1.33E+05	5.65E-04	4.24E-09	141.1	133.6	124.1	0.929
2	VH_S032K	386.6	1.17E+05	8.48E-04	7.24E-09	148.9	138.3	124.8	0.902
2	VH_N033A	355.8	1.21E+05	2.63E-04	2.16E-09	146.2	138.5	133.3	0.962
2	VH_N033K	302.3	1.02E+05	2.65E-04	2.60E-09	116.1	105.8	101.6	0.960
2	VH_N033Q	365.1	1.38E+05	1.65E-04	1.19E-09	156.1	152.2	147.8	0.971

Фиг. 12

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
2	VH_N033W	381.1	1.31E+05	3.48E-04	2.65E-09	156.5	150.9	143.6	0.952
2	VH_N033S	321.5	1.28E+05	2.41E-04	1.88E-09	134.1	128	123.3	0.963
2	VH_N033L	344	1.29E+05	2.02E-04	1.56E-09	140.6	134.3	129.8	0.966
2	VH_N033D	372.7	1.03E+05	1.25E-03	1.21E-08	148.2	133	115.2	0.866
2	VH_N033Y	377.8	1.38E+05	2.11E-04	1.53E-09	160.5	155.8	150.5	0.966
2	VH_N033H	358.6	1.40E+05	1.41E-04	1.01E-09	153.5	148.6	144.6	0.973
2	VH_N033A	397.2	1.22E+05	2.68E-03	2.20E-08	164.1	148.8	110.1	0.740
2	VH_W034Q	378	1.25E+05	1.90E-03	1.51E-08	153.7	142.4	114.8	0.806
2	Parent clone	361.4	1.41E+05	1.38E-04	9.82E-10	156.5	151.9	147.9	0.974
2	VH_W034S	446	9.21E+04	2.79E-03	3.03E-08	171.1	143.5	105.4	0.734
2	VH_W034L	335.3	1.33E+05	1.17E-03	8.85E-09	140.8	132.4	115.2	0.870
2	VH_W034D	344.6	1.31E+05	3.31E-03	2.53E-08	150	134.3	92.4	0.688
2	VH_W034H	366.3	1.04E+05	2.61E-03	2.51E-08	139.5	121.5	90.7	0.747
2	VH_W035A	23.7	1.04E+05	6.49E-04	6.21E-09	10.6	9.1	8.4	0.923
2	VH_W035K	20.7	9.20E+04	6.04E-04	6.56E-09	12.4	10.5	9.7	0.924
2	VH_W035Q	76.3	9.27E+04	3.20E-04	3.45E-09	31.1	27.7	26.5	0.957
2	VH_W035Y	327.9	1.38E+05	1.77E-04	1.29E-09	140.7	135.8	131.7	0.970

Фиг. 13

040821

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
2	VH_I029S	334.2	1.39E+05	2.40E-04	2.65E-09	143.3	138.2	133.1	0.963
2	VH_I029D	343.6	1.43E+05	2.52E-04	1.88E-09	152.5	147.5	142.1	0.963
2	VH_I029Y	382.8	1.32E+05	2.09E-04	1.56E-09	159.8	153.7	148.6	0.967
2	VH_W034K	325.8	3.25E+05	4.06E-02	1.21E-08	68.4	48.4	10.8	0.223
2	VL_R091D	1.9	1.05E+05	6.94E-04	1.53E-09	9.3	8.2	7.5	0.915
2	VH_E050S	348.9	1.56E+05	1.86E-03	1.01E-09	155.4	147.7	118.9	0.805
2	VH_E050L	376.3	1.16E+05	7.91E-03	2.20E-08	132.2	105.4	44.2	0.419
2	VH_E050D	367.4	1.35E+05	3.40E-03	1.51E-08	156.5	141.5	96.5	0.682
2	VH_E050Y	379.9	1.07E+05	5.24E-03	9.82E-10	135.7	112.8	63.4	0.562
2	VH_E050H	352.9	1.46E+05	1.02E-03	3.03E-08	152.6	146.2	129	0.882
2	VH_I051A	361.3	1.45E+05	1.84E-04	8.85E-09	158.6	153.9	149.2	0.969
2	VH_I051K	359.9	1.16E+05	3.26E-04	2.53E-08	141.5	132.1	126.2	0.955
2	VH_I051Y	388.4	1.32E+05	1.73E-04	2.51E-08	163.7	156.6	152.1	0.971
2	VL_P055Q	370.6	1.35E+05	1.72E-04	6.21E-09	161.8	155.4	150.9	0.971
2	VL_R054D	377.5	8.42E+04	2.07E-04	6.56E-09	97.6	84.4	81.7	0.968
2	VH_P100Y	350.1	6.91E+04	5.89E-04	3.45E-09	120.7	95.5	89.1	0.933
2	VH_S100aD	393.8	9.83E+04	3.07E-06	3.12E-11	10.1	9.6	9.5	0.990

Фиг. 14

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
2	VL_S090W	386.1	1.27E+05	4.87E-04	3.84E-09	10.3	10.4	9.9	0.952
2	VL_N089H	400.3	1.40E+05	5.11E-04	3.64E-09	175.2	168.7	157.9	0.936
2	VL_P055H	378.3	1.38E+05	1.44E-04	1.04E-09	164.8	159.7	155.6	0.974
2	VH_Y102A	407.7	1.36E+05	1.20E-04	8.80E-10	173.1	167.7	163.7	0.976
2	VL_N053Y	387.3	1.14E+05	3.56E-04	3.13E-09	157.5	146.8	139.9	0.953
2	VL_S056A	335.5	1.44E+05	1.51E-04	1.05E-09	148.9	144.8	140.8	0.972
2	VL_S056Q	360.8	1.41E+05	1.53E-04	1.09E-09	158.9	153.9	149.8	0.973
3	VH_I097K	479.1	1.38E+05	2.35E-04	1.70E-09	190.3	184.2	173.2	0.940
3	VH_I097S	640.8	1.32E+05	9.43E-04	7.15E-09	259.8	247.3	198.1	0.801
3	VH_I097L	572.5	1.40E+05	3.00E-04	2.15E-09	237.1	229.6	212.9	0.927
3	VH_I097D	585	1.55E+05	4.70E-03	3.04E-08	211.8	192.9	76.3	0.396
3	VH_I097Y	541.7	9.89E+04	2.27E-04	2.29E-09	206.5	186.9	176.6	0.945
3	VH_I097H	559.9	1.22E+05	1.46E-04	1.19E-09	218.6	207.7	199.5	0.961
3	VH_G098K	514	7.22E+04	1.69E-07	2.35E-12	5.7	6.2	7.5	1.210
3	VH_G098W	582.4	1.09E+05	4.29E-07	3.94E-12	4.8	6.5	6.6	1.015
3	VH_G098S	552.6	2.15E+05	3.20E-02	1.48E-07	168.6	111.8	6.6	0.059

Фиг. 15

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
3	VH_G098D	766.5	1.12E+05	4.84E-02	4.30E-07	153.7	59.5	9.9	0.166
3	VH_G098Y	622.4	7.45E+04	6.00E-09	8.06E-14	5.7	5.9	7	1.186
3	VH_W099A	544.2	9.58E+04	2.74E-07	2.85E-12	5.1	5.9	6.6	1.119
3	VH_W099K	583.7	6.75E+04	9.48E-08	1.40E-12	6	5.4	7	1.296
3	VH_W099Q	564.8	1.65E+05	2.81E-04	1.71E-09	6.4	9.6	8.1	0.844
3	VH_W099Y	610.4	2.12E+05	1.91E-02	9.02E-08	208.5	161.4	13.9	0.086
3	VH_W099S	693.4	1.54E+05	2.69E-07	1.75E-12	5.9	7.4	7.9	1.068
3	VH_W099D	579.5	6.93E+04	3.51E-07	5.08E-12	4.9	5	5.7	1.140
3	VH_W099H	664.4	2.88E+05	3.94E-02	1.37E-07	207.8	139.4	8.4	0.060
3	VH_P100A	600.8	4.80E+05	9.72E-02	2.03E-07	129.4	76.1	7	0.092
3	VH_P100K	532.7	1.00E+05	7.84E-04	7.84E-09	6.1	10.4	7.1	0.683
3	VH_P100Q	638.1	1.47E+05	2.22E-06	1.50E-11	5.5	8.5	7.9	0.929
3	VH_P100W	744.8	9.12E+04	8.95E-07	9.81E-12	6	7.2	8.5	1.181
3	VH_P100S	520.8	7.99E+05	1.93E-01	2.42E-07	109.9	58.3	6.2	0.106
3	VH_P100L	912.7	1.26E+05	2.13E-06	1.69E-11	6.7	10.6	9.9	0.934
3	VH_P100D	679.9	7.17E+04	2.92E-07	4.07E-12	4.8	5.3	6.2	1.170
3	VH_P100H	736.3	1.48E+05	1.32E-04	8.91E-10	15.5	18.5	17.1	0.924

Фиг. 16

040821

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
3	VH_S100aA	655.9	1.16E+05	2.22E-04	1.92E-09	266.8	250.7	236.9	0.945
3	VH_S100aL	617.3	1.27E+05	7.29E-04	5.75E-09	253.9	240.5	202.3	0.841
3	VH_S100aQ	667.6	1.41E+05	1.77E-04	1.25E-09	282.2	274.5	261.8	0.954
3	VH_S100aW	616.1	1.10E+05	5.59E-04	5.08E-09	243.2	224.7	196.7	0.875
3	VH_S100aH	647.1	1.46E+05	2.06E-04	1.41E-09	281.3	274.2	259.9	0.948
3	VH_S100aK	799.8	3.10E+05	4.10E-02	1.32E-07	234.4	159.1	10.3	0.065
3	VH_F100bA	330.8	8.97E+04	4.80E-04	5.34E-09	123.2	107.5	96.2	0.895
3	VH_F100bK	-2.9	9.43E+04	4.28E-03	4.54E-08	5	5	2.2	0.440
3	VH_F100bQ	283.7	7.88E+04	5.62E-04	7.13E-09	102.3	85	74.7	0.879
3	VH_F100bW	14.1	4.24E+05	6.96E-03	1.64E-08	8.8	7.5	2.7	0.360
3	VH_F100bS	355.8	9.81E+04	3.85E-04	3.92E-09	145.3	129.4	118.4	0.915
3	VH_F100bL	744.1	1.81E+05	3.80E-04	2.10E-09	360.2	355.3	325.5	0.916
3	VH_F100bD	-9.8	8.83E+04	1.34E-02	1.51E-07	6.5	4.6	0	0.000
3	VH_F100bH	-0.8	6.00E+04	1.21E-02	2.02E-07	7.2	4.3	0	0.000
3	VH_D101A	140.8	1.46E+05	4.56E-04	3.13E-09	69.4	68	60.8	0.894
3	VH_D101L	-0.6	7.58E+04	1.47E-02	1.94E-07	6	4	-0.2	-0.050
3	VH_D101Q	735.8	1.83E+05	2.54E-04	1.39E-09	343.1	337.8	319	0.944

Фиг. 17

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
3	VH_D101S	-2	1.57E+05	5.89E-03	3.76E-08	4.6	5.2	1.8	0.346
3	VH_D101W	245.1	1.51E+05	4.03E-04	2.67E-09	109.9	107.2	97.6	0.910
3	VH_D101H	534.2	2.09E+05	4.27E-04	2.04E-09	259	255.1	232.6	0.912
3	VH_D101K	698.6	2.13E+05	4.12E-04	1.93E-09	321.1	315.4	289.4	0.918
3	VH_Y102K	899.4	2.73E+05	2.21E-04	8.08E-10	450.8	451.8	430.5	0.953
3	VH_Y102Q	763.5	3.30E+05	2.37E-04	7.17E-10	394.6	396.2	376.4	0.950
3	VH_Y102W	660.2	3.26E+05	2.43E-04	7.46E-10	346.9	348.4	330.1	0.947
3	VH_Y102L	778.2	1.33E+05	1.56E-04	1.17E-09	328.1	316.4	303.2	0.958
3	VH_Y102D	339.3	1.51E+05	2.60E-04	1.72E-09	146.5	143.6	134.2	0.935
3	VH_Y102H	720	1.37E+05	1.82E-04	1.19E-09	308.2	298.4	285.7	0.957
3	VH_E095A	819.8	9.76E+04	4.61E-04	4.72E-09	298.7	269.4	241	0.895
3	VH_E095K	621.7	5.79E+10	2.61E-02	4.51E-09	12.5	19.9	11.2	0.563
3	VH_E095Q	0.5	9.82E+04	4.84E-03	4.93E-08	5	4.1	1.1	0.268
3	VH_E095W	735.9	1.09E+05	5.16E-10	4.71E-15	7.6	8.4	10.4	1.238
3	VH_E095S	158	1.13E+05	8.78E-04	7.78E-09	67.4	62.1	50.2	0.808
3	VH_E095L	878.7	9.70E+04	6.37E-04	6.57E-09	314.3	281.6	241.9	0.859
3	VH_E095D	776.9	8.75E+04	9.77E-04	1.12E-08	259.2	224.6	178.5	0.795

Фиг. 18

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
3	VH_E095Y	23.9	1.10E+05	1.31E-03	1.19E-08	15	14.3	10.6	0.741
3	VH_E095H	694.5	9.06E+04	8.47E-04	9.34E-09	244.1	213.6	175.2	0.820
3	VH_G096A	599	1.06E+05	9.02E-04	8.51E-09	250.1	227.6	184.5	0.811
3	VH_G096K	-1	5.54E+05	8.41E-03	1.52E-08	5	5	2.4	0.480
3	VH_G096Q	609.8	9.98E+04	1.53E-03	1.53E-08	244.5	216.7	152.9	0.706
3	VH_G096W	-2.7	4.37E+05	5.74E-03	1.32E-08	5.4	5.9	3.6	0.610
3	VH_G096S	939.9	1.01E+05	1.07E-03	1.06E-08	382.2	341.9	267.2	0.782
3	VH_G096L	807.4	3.47E+05	4.78E-02	1.38E-07	204.8	140.5	13	0.093
4	VL_S090A	399.4	1.21E+05	2.03E-04	1.68E-09	158.7	149.1	141.2	0.947
4	VL_S090L	382.7	9.53E+04	3.82E-03	4.01E-08	88.6	64.7	34.7	0.536
4	VL_S090D	388.3	9.69E+04	5.99E-03	6.19E-08	126.7	95.9	31.1	0.324
4	VL_S090Y	379.9	7.60E+08	1.15E-02	1.51E-07	37.4	26.4	4.5	0.170
4	VL_S090Q	395.2	1.83E+09	1.40E-02	7.65E-08	20.4	18.3	3.7	0.202
4	VL_S090H	383.2	1.56E+10	2.44E-02	1.56E-08	7.6	9.8	4.3	0.439
4	VL_R091A	421.8	7.20E+04	1.96E-03	2.72E-08	75.7	59.6	37.8	0.634
4	VL_R091K	404.1	1.74E+05	1.59E-02	9.14E-08	142.7	108.8	8.3	0.076

Фиг. 19

040821

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
4	VL_R091Q	400.5	8.98E+07	2.00E-01	2.23E-07	72.7	38.2	4.4	0.115
4	VL_R091W	397.9	7.93E+04	4.22E-04	5.33E-09	4.4	5.1	4.4	0.863
4	VL_R091L	398.6	8.23E+04	3.12E-04	3.79E-09	4.7	5.2	4.7	0.904
4	VL_R091Y	408.2	1.24E+05	8.09E-04	6.52E-09	4.9	5.1	4.1	0.804
4	VL_R091H	388.3	1.40E+05	5.41E-02	3.87E-07	85	33.2	5.1	0.154
4	VL_D092A	404.3	7.79E+04	3.30E-04	4.24E-09	137.4	114.5	105.6	0.922
4	VL_D092L	393.1	1.85E+05	2.60E-02	1.41E-07	101.3	68.3	5.6	0.082
4	VL_D092Q	382.2	8.07E+04	2.18E-03	2.70E-08	126.2	102.3	62.7	0.613
4	VL_D092Y	380.6	1.15E+05	1.09E-02	9.41E-08	99.1	71.6	14.6	0.204
4	VL_D092S	384.7	1.09E+05	2.35E-04	2.15E-09	148.3	137.9	129.7	0.941
4	VL_D092W	380.4	8.75E+04	2.35E-03	2.68E-08	117.8	95.5	58.7	0.615
4	VL_D092H	380.3	6.82E+04	9.91E-04	1.45E-08	125	98.8	78.6	0.796
4	VL_D092K	396.8	9.43E+04	6.91E-03	7.32E-08	99.2	69.6	22.2	0.319
4	VL_S093A	390.7	1.32E+05	2.29E-04	1.74E-09	162.9	156.4	147.3	0.942
4	VL_S093L	405.5	1.47E+05	1.58E-04	1.08E-09	173.5	169	161.7	0.957
4	VL_S093D	399	1.33E+05	2.62E-04	1.98E-09	167.8	160.9	150.4	0.935
4	VL_S093Y	411.3	1.39E+05	1.72E-04	1.24E-09	171.9	165.9	158.2	0.954

Фиг. 20

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
4	VL_S093Q	388.9	1.35E+05	2.17E-04	1.61E-09	163.7	158.3	149.5	0.944
4	VL_S093W	413	1.40E+05	1.65E-04	1.18E-09	171.6	166	158.4	0.954
4	VL_S093H	388.9	1.26E+05	2.26E-04	1.79E-09	159.1	152.3	143.6	0.943
4	VL_S093K	396	1.15E+05	2.03E-04	1.77E-09	156.2	146	138.3	0.947
4	VL_S094A	411.6	1.27E+05	2.42E-04	1.91E-09	169	160.4	150.6	0.939
4	VL_S094L	395.2	1.37E+05	2.33E-04	1.70E-09	167.4	162	152.5	0.941
4	VL_S094D	404.5	1.31E+05	2.73E-04	2.08E-09	171	164	153	0.933
4	VL_S094K	409	1.29E+05	2.66E-04	2.07E-09	167.8	160.1	149.6	0.934
4	VL_S094Q	390.5	1.27E+05	2.05E-04	1.62E-09	158.6	150.6	142.7	0.948
4	VL_S094W	418.1	1.35E+05	2.59E-04	1.93E-09	172.5	165.4	154.5	0.934
4	VL_S094H	416.6	1.15E+05	2.50E-04	2.17E-09	164.2	153.2	143.7	0.938
4	VL_S094K	387.2	1.02E+05	2.73E-04	2.68E-09	146.8	134.1	125.1	0.933
4	VL_G095A	396.5	1.17E+05	1.45E-03	1.24E-08	156.5	144.3	103.1	0.714
4	VL_G095K	399.5	1.53E+05	2.34E-03	1.53E-08	8.8	13.8	6.4	0.464
4	VL_G095Q	406.1	1.45E+05	1.18E-02	8.13E-08	25.2	29.7	6.9	0.232
4	VL_G095W	419.5	1.94E+05	5.16E-02	2.66E-07	83.4	39.2	7	0.179
4	VL_G095S	405.3	1.99E+05	1.84E-02	9.23E-08	128.1	95.5	10.3	0.105

Фиг. 21

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
4	VL_K095aD	408.9	1.68E+05	6.66E-03	3.96E-08	171.9	153.7	39.1	0.254
4	VL_G095L	390.8	1.23E+05	2.37E-02	1.92E-07	113.2	71.1	6.7	0.094
4	VL_G095D	400.3	1.45E+05	3.91E-02	2.70E-07	96.7	49.5	7.1	0.143
4	VL_G095Y	404.5	6.00E+05	9.08E-02	1.51E-07	115.8	71.9	7	0.097
4	VL_G095H	403.3	2.16E+05	2.87E-03	1.33E-08	11.3	18.9	8.6	0.455
4	VL_K095aD	404.9	1.42E+05	4.49E-04	3.17E-09	176.5	171	153.2	0.896
4	VL_K095aL	408.7	1.38E+05	3.36E-04	2.43E-09	177.3	171.4	157.5	0.919
4	VL_K095aQ	406.1	1.49E+05	3.21E-04	2.16E-09	179.2	174.8	161.2	0.922
4	VL_K095aY	438.6	1.35E+05	4.46E-04	3.30E-09	184.6	176.5	158.1	0.896
4	VL_K095aS	410.9	1.41E+05	3.98E-04	2.82E-09	178.2	173	156.7	0.906
4	VL_K095aW	431.4	1.31E+05	1.20E-03	9.11E-09	174.9	164.8	124.1	0.753
4	VL_N095bA	413.5	1.43E+05	2.05E-04	1.43E-09	176.8	172.1	162.8	0.946
4	VL_N095bK	408.6	1.27E+05	1.84E-04	1.45E-09	168.1	160.6	152.7	0.951
4	VL_N095bQ	403	1.36E+05	2.29E-04	1.67E-09	170.1	165	155.3	0.941
4	VL_N095bW	397	1.45E+05	1.91E-04	1.31E-09	170.9	167.3	158.8	0.949
4	VL_N095bS	423.4	1.42E+05	1.92E-04	1.35E-09	181.1	175.7	166.7	0.949
4	VL_N095bL	418.8	1.37E+05	1.97E-04	1.44E-09	177.5	171.6	162.6	0.948

Фиг. 22

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
4	VL_N095bD	424.5	1.48E+05	2.81E-04	1.90E-09	185.8	180.7	168	0.930
4	VL_N095bY	424.2	1.31E+05	2.87E-04	2.18E-09	170.2	163	151.3	0.928
4	VL_N095bH	395.5	1.40E+05	1.97E-04	1.40E-09	169.2	164.8	156.3	0.948
4	VL_L096A	407.8	1.13E+05	4.70E-04	4.14E-09	161.5	150.8	134.4	0.891
4	VL_L096K	403.1	1.22E+06	1.25E-01	1.02E-07	88.7	67.8	10.2	0.150
4	VL_L096Q	409.3	1.15E+05	2.16E-04	1.88E-09	161.7	152.4	144	0.945
4	VL_L096Y	416.2	1.18E+05	1.32E-03	1.11E-08	171.4	158.9	117	0.736
4	VL_L096S	419.5	1.09E+05	3.64E-04	3.34E-09	163.1	151.1	137.9	0.913
4	VL_L096W	410.5	1.27E+05	2.88E-03	2.27E-08	166.1	152.6	79.5	0.521
4	VL_L096D	-2.8	8.50E+04	1.28E-03	1.51E-08	7.5	6.5	4.6	0.708
4	VL_L096H	410.3	1.26E+05	1.69E-04	1.34E-09	173.8	166.5	159	0.955
4	VL_V097A	408.9	1.36E+05	2.30E-04	1.69E-09	174.3	169.1	159.1	0.941
4	VL_V097K	426.9	1.01E+05	4.58E-04	4.54E-09	163.4	147.6	132	0.894
4	VL_V097Q	427.8	1.24E+05	3.45E-04	2.79E-09	175.9	166.6	152.8	0.917
4	VL_V097W	416.4	1.06E+05	9.69E-04	9.18E-09	163.2	148.6	118.5	0.797
4	VL_V097L	421.7	1.19E+05	4.81E-04	4.03E-09	172.4	162.5	144.5	0.889
4	VL_V097D	440	1.44E+05	2.45E-04	1.71E-09	190.4	185.1	173.5	0.937

Фиг. 23

040821

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
4	VL_V097Y	427.1	8.66E+04	7.91E-04	9.13E-09	158.5	136	112.9	0.830
4	VL_V097H	440.1	1.07E+05	4.14E-04	3.87E-09	174.5	159.9	144.5	0.904
4	VL_N089A	420	9.54E+04	6.32E-04	6.62E-09	57.7	52.5	44.9	0.855
4	VL_N089K	450.3	8.69E+04	1.09E-03	1.26E-08	154.6	132.1	102.4	0.775
4	VL_N089Q	446.1	1.22E+05	5.22E-04	4.27E-09	184.9	174.1	153.4	0.881
4	VL_N089W	419.9	9.00E+04	6.41E-03	7.12E-08	115.9	82	28.6	0.349
4	VL_N089S	408.9	1.34E+05	2.05E-04	1.53E-09	174.7	169	160	0.947
4	VL_N089L	425.2	1.49E+05	2.02E-04	1.36E-09	186.4	182.5	172.7	0.946
4	VL_N089D	458.8	5.19E+04	5.50E-04	1.06E-08	144.6	101.1	88.7	0.877
4	VL_N089Y	435.4	1.21E+05	8.81E-04	7.28E-09	168.5	157.2	127.4	0.810
4	VL_S090K	411.5	8.16E+04	1.03E-07	1.27E-12	7.7	7.8	8	1.026
4	VL_K095aH	447.6	1.32E+05	4.73E-04	3.59E-09	190.2	181.6	161.8	0.891
4	Parent clone	447	1.42E+05	1.82E-04	1.28E-09	193.4	188	178.9	0.952
4	VL_K051W	489.9	1.28E+05	2.16E-04	1.69E-09	207.5	198.1	187.2	0.945
4	VL_N052Q	434.8	1.26E+05	2.01E-04	1.59E-09	184.6	176.5	167.3	0.948
5	VH_W034Y	477.5	1.55E+05	5.98E-04	3.87E-09	198.1	191.4	165.8	0.866

Фиг. 24

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
5	VH_G026Q	489.2	1.67E+05	1.77E-04	1.06E-09	213.7	210	200.6	0.955
5	VH_S035aL	504.6	8.75E+04	5.54E-04	6.33E-09	159.3	136.9	120.1	0.877
5	VH_G027A	439.9	1.68E+05	1.63E-04	9.70E-10	192.2	189.3	181.4	0.958
5	VH_S028D	520.7	1.68E+05	1.94E-04	1.15E-09	232.6	227.9	217	0.952
5	VH_S028Q	482.1	1.67E+05	1.82E-04	1.09E-09	212.9	209.5	199.9	0.954
5	VH_I051Q	508.6	1.48E+05	1.91E-04	1.29E-09	205.4	198.8	189.2	0.952
5	VH_I051W	494.9	1.50E+05	2.35E-04	1.57E-09	205.8	199.7	188.3	0.943
5	VH_I051S	477.1	1.63E+05	2.03E-04	1.24E-09	206.2	202.4	192.2	0.950
5	VH_I051L	489.8	1.70E+05	1.70E-04	1.00E-09	211.1	207.8	198.8	0.957
5	VH_I051D	51.2	1.52E+05	5.21E-04	3.43E-09	19.5	17.9	15.8	0.883
5	VH_N060H	497	1.72E+05	1.54E-07	8.94E-10	220	217.1	208.4	0.960
5	VH_I051H	366.2	1.59E+05	2.26E-04	1.42E-09	153.1	149.2	140.9	0.944
5	VH_Y052A	495.6	1.42E+05	8.84E-04	6.22E-09	212.5	202.4	164.5	0.813
5	VH_Y052K	475.6	1.27E+05	1.51E-03	1.19E-08	187.4	174.3	122.9	0.705
5	VH_Y052Q	460.9	1.38E+05	8.48E-04	6.13E-09	196.5	186.9	153.3	0.820
5	VH_Y052W	484.1	1.68E+05	1.36E-04	8.13E-10	210.2	207.1	199.7	0.964
5	VH_Y052S	484.1	1.43E+05	9.42E-04	6.60E-09	209.1	199.5	160	0.802

Фиг. 25

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
5	VH_Y052L	512.7	1.54E+05	1.46E-04	9.47E-10	221.9	216.3	208.1	0.962
5	VH_Y052D	526.4	1.47E+05	6.08E-04	4.13E-09	234.6	225.3	195	0.866
5	VH_Y052H	508.9	1.57E+05	2.59E-04	1.64E-09	219.7	214.5	201.1	0.938
5	VH_H053A	528.2	1.52E+05	2.39E-04	1.57E-09	224.6	218.1	205.4	0.942
5	VH_H053L	511.9	1.51E+05	2.80E-04	1.86E-09	217.3	211.1	197	0.933
5	VH_H053Q	507.3	1.61E+05	2.00E-04	1.24E-09	220.6	216.3	205.5	0.950
5	VH_H053Y	518.6	1.60E+05	1.68E-04	1.05E-09	224.4	219.4	210	0.957
5	VH_H053S	519.4	1.56E+05	2.23E-04	1.43E-09	223.8	217.9	205.9	0.945
5	VH_H053W	529.4	1.62E+05	1.68E-04	1.04E-09	230.2	225.6	215.9	0.957
5	VH_H053D	549.6	1.42E+05	3.73E-04	2.63E-09	238.4	228.7	209	0.914
5	VH_H053K	505.8	1.55E+05	1.66E-04	1.07E-09	210.4	205.7	196.8	0.957
5	VH_S054A	539.2	1.68E+05	1.38E-04	8.22E-10	238.3	234.5	226	0.964
5	VH_S054L	515.3	1.68E+05	1.49E-04	8.89E-10	226.1	222.6	214	0.961
5	VH_S054D	489.1	1.43E+05	3.00E-04	2.10E-09	214.6	206.8	192.2	0.929
5	VH_S054Y	540.7	2.24E+05	1.38E-04	6.17E-10	249	248.9	239.7	0.963
5	VH_S054Q	531.1	1.73E+05	1.67E-04	9.70E-10	234.8	231.5	221.5	0.957
5	VH_S054W	532.2	2.69E+05	1.38E-04	5.06E-10	249.8	251	241.7	0.963

Фиг. 26

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
5	VH_S054H	549.4	1.91E+05	1.45E-04	7.57E-10	248.7	246.5	237.1	0.962
5	VH_S054K	518.7	1.58E+05	3.20E-04	2.03E-09	218.3	213.6	197.2	0.923
5	VH_G055A	548.7	1.66E+05	1.52E-04	9.15E-10	242.6	238.4	228.9	0.960
5	VH_G055K	536.2	1.45E+05	1.65E-04	1.14E-09	222.4	216	206.8	0.957
5	VH_G055Q	544.4	1.64E+05	1.61E-04	9.79E-10	238.8	234.4	224.7	0.959
5	VH_G055W	555.2	1.56E+05	1.81E-04	1.16E-09	234.6	229.1	218.5	0.954
5	VH_G055S	535	1.66E+05	1.58E-04	9.52E-10	235.4	231.3	222	0.960
5	VH_G055L	550	1.62E+05	1.53E-04	9.45E-10	240.3	235.6	226.2	0.960
5	VH_G055D	2.8	1.23E+02	1.74E-03	1.41E-01	0.1	-1	-0.6	0.600
5	VH_G055Y	531	1.60E+05	1.60E-04	1.00E-09	229.1	224.8	215.6	0.959
5	VH_G055H	556.9	1.60E+05	1.53E-04	9.59E-10	242.1	237.3	228	0.961
5	VH_N056A	587.1	1.59E+05	2.04E-04	1.28E-09	255.6	249.9	237.2	0.949
5	VH_N056K	569.3	1.39E+05	5.09E-04	3.67E-09	232.2	222.5	196.9	0.865
5	VH_N056Q	528.2	1.58E+05	1.97E-04	1.25E-09	231.2	226.5	215.3	0.951
5	VH_N056W	551.8	2.16E+05	1.42E-04	6.59E-10	253	253	243.5	0.962
5	VH_N056S	578.6	1.62E+05	2.31E-04	1.42E-09	254.7	249.4	235.4	0.944
5	VH_N056L	562.5	1.80E+05	1.53E-04	8.49E-10	252.4	249.7	239.8	0.960

Фиг. 27

040821

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
5	VH_N056D	547.5	1.55E+05	1.41E-04	9.11E-10	245.3	239.6	230.9	0.964
5	VH_N056Y	566.6	1.85E+05	1.44E-04	7.78E-10	255.2	253.6	244	0.962
5	VH_N056H	598.7	1.83E+05	1.23E-04	6.74E-10	268	265.5	256.6	0.966
5	VH_N058A	594	1.67E+05	3.39E-04	2.03E-09	262.3	257.1	236.4	0.919
5	VH_N058L	581.7	1.52E+05	1.86E-04	1.23E-09	250.1	243.3	231.8	0.953
5	VH_N058D	528.4	1.49E+05	2.18E-04	1.46E-09	227.5	221.6	209.7	0.946
5	VH_N058Y	568.6	1.48E+05	7.03E-04	4.75E-09	242	233.3	197.5	0.847
5	VH_N058H	569.5	1.31E+05	1.20E-03	9.15E-09	233.9	219.6	166.1	0.756
5	VH_Y059A	192.3	1.88E+05	1.94E-04	1.03E-09	90	89.4	85	0.951
5	VH_Y059K	577.4	1.51E+05	2.14E-04	1.42E-09	247.6	241.2	228.5	0.947
5	VH_Y059Q	604.4	1.67E+05	2.01E-04	1.20E-09	268.4	263.5	250.2	0.950
5	VH_Y059W	587.3	1.61E+05	2.05E-04	1.27E-09	257.8	252.4	239.6	0.949
5	VH_Y059S	596.1	1.72E+05	1.87E-04	1.09E-09	267.1	263.3	250.8	0.953
5	VH_Y059L	598.9	1.67E+05	1.98E-04	1.18E-09	267	262.7	249.7	0.951
5	VH_Y059D	600.1	1.79E+05	1.71E-04	9.57E-10	275.3	272.3	260.5	0.957
5	VH_Y059H	609.9	1.67E+05	1.76E-04	1.05E-09	272	267.3	255.2	0.955
5	VH_N060A	618.5	1.76E+05	1.63E-04	9.24E-10	278.1	274.7	263.1	0.958

Фиг. 28

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
5	VH_N060K	613.1	1.67E+05	1.78E-04	1.06E-09	273.2	269	256.9	0.955
5	VH_N060Q	623.1	1.77E+05	1.53E-04	8.66E-10	281.5	278.2	267.1	0.960
5	VH_N060W	605.3	1.77E+05	1.53E-04	8.62E-10	273.6	270.6	259.9	0.960
5	VH_N060L	600.4	1.82E+05	1.38E-04	7.58E-10	272.5	270.1	260.2	0.963
5	VH_N060D	623.6	1.87E+05	1.62E-04	8.66E-10	287.8	285.5	273.5	0.958
5	VH_N060Y	622.3	1.81E+05	1.33E-04	7.33E-10	282.8	280.3	270.2	0.964
5	Parent clone	623.1	1.70E+05	1.66E-04	9.79E-10	278.3	274.1	262.4	0.957

5	VL_S034K	399.8	2.40E+04	3.73E-07	1.56E-11	5	0.9	3.3	3.667
5	VL_G050A	407.9	1.45E+05	1.86E-04	1.28E-09	172.8	167.2	159.4	0.953
5	VL_G050K	392.1	7.58E+04	6.76E-04	8.92E-09	121	99.4	84.9	0.854
5	VL_G050Q	403.2	9.54E+04	2.72E-04	2.85E-09	141.9	126.2	118.1	0.936
5	VL_G050W	393.6	7.54E+04	1.79E-04	2.38E-09	138.1	114.9	110	0.957
5	VL_G050S	401.2	1.35E+05	2.13E-04	1.58E-09	163.5	156.9	148.6	0.947
5	VL_Q024D	419	1.51E+05	1.46E-04	9.66E-10	181.1	176.8	170	0.962
5	VL_Q024S	390.5	1.46E+05	1.39E-04	9.52E-10	166.6	162.3	156.4	0.964
5	VL_Q024H	392.2	1.44E+05	1.44E-04	9.97E-10	166.3	161.5	155.5	0.963

Фиг. 29

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
6	VL_G025A	383.7	1.17E+05	1.64E-04	1.40E-09	154.6	145.5	139.7	0.960
6	VL_N030A	402.5	1.74E+05	2.95E-04	1.70E-09	177.4	175	162.5	0.929
6	VL_G050H	385.3	9.19E+04	2.67E-04	2.90E-09	141.6	126	118	0.937
6	VL_K051D	400.9	6.14E+04	5.79E-04	9.42E-09	151.1	114.4	100.2	0.876
6	VL_K051H	394.9	1.34E+05	9.78E-05	7.30E-10	171.4	165.4	161.1	0.974
6	VL_N052K	407.2	1.01E+05	1.92E-04	1.90E-09	156.9	142.2	135.7	0.954
6	VL_N052W	403	1.21E+05	2.75E-04	2.27E-09	162.7	153.2	143.2	0.935
6	VL_N052S	382.7	1.42E+05	1.81E-04	1.27E-09	163.3	158.5	151.3	0.955
6	VL_N052L	398	1.06E+05	1.75E-04	1.65E-09	161.9	148.3	142	0.958
6	VL_N052D	398.7	1.50E+05	1.43E-04	9.50E-10	176	172.1	165.7	0.963
6	VL_N052Y	410.3	1.30E+05	2.01E-04	1.55E-09	168.2	160.7	152.7	0.950
6	VL_N052H	413.5	1.27E+05	1.90E-04	1.49E-09	169.3	160.9	153.4	0.953
6	VL_N053A	411.7	1.36E+05	2.23E-04	1.64E-09	172.2	165.6	156.6	0.946
6	VL_N053K	398.1	1.14E+05	2.13E-04	1.88E-09	152.2	142.3	135	0.949
6	VL_N053Q	375.2	1.41E+05	1.93E-04	1.37E-09	159.3	154.6	147.1	0.951
6	VL_N053W	399.4	1.01E+05	3.18E-04	3.14E-09	148.4	134.9	125	0.927
6	VL_N053S	390.8	1.51E+05	1.71E-04	1.14E-09	167.7	164.3	157	0.956

Фиг. 30

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
6	VL_N053L	411.2	1.32E+05	2.32E-04	1.76E-09	171.9	164.4	155.1	0.943
6	VL_N053D	418.1	1.64E+05	1.59E-04	9.69E-10	188.6	185.6	178.1	0.960
6	VL_N053H	391.1	1.26E+05	2.07E-04	1.65E-09	158.4	151.1	143.5	0.950
6	VL_R054A	401.5	1.45E+05	1.39E-04	9.54E-10	174	169.2	163	0.963
6	VL_R054K	428.1	1.46E+05	1.46E-04	9.99E-10	183.4	178	171.2	0.962
6	VL_R054Q	421.5	1.49E+05	1.33E-04	8.92E-10	182.9	178.2	172	0.965
6	VL_R054W	405.7	1.24E+05	1.18E-04	9.49E-10	165.7	157.6	152.6	0.968
6	VL_R054L	422.4	1.49E+05	1.26E-04	8.45E-10	184.6	179.6	173.6	0.967
6	VL_R054Y	405.2	1.42E+05	1.11E-04	7.84E-10	174.1	169.2	164.2	0.970
6	VL_R054H	413.7	1.45E+05	1.58E-04	1.09E-09	177	171.7	164.7	0.959
6	VL_P055A	395.2	1.37E+05	1.41E-04	1.03E-09	168.6	163.2	157.2	0.963
6	VL_P055K	418.4	1.22E+05	1.55E-04	1.27E-09	169.2	159.8	153.5	0.961
6	VL_P055L	392.7	1.40E+05	1.44E-04	1.03E-09	166.5	161.5	155.5	0.963
6	VL_P055D	412.4	1.41E+05	1.54E-04	1.09E-09	178	172.2	165.5	0.961
6	VL_P055Y	423.8	1.31E+05	1.59E-04	1.22E-09	175.1	167.1	160.3	0.959
6	VL_S056L	395.4	1.48E+05	1.38E-04	9.36E-09	169.6	165.6	159.6	0.964
6	VL_S056D	382.4	1.56E+05	1.40E-04	9.00E-10	168.5	165.5	159.4	0.963

Фиг. 31

040821

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
6	VL_S056Y	417.4	1.41E+05	1.38E-04	9.79E-10	174.7	169.2	163	0.963
6	VL_S056W	372.2	1.36E+05	1.38E-04	1.02E-09	154.2	149.2	143.8	0.964
6	VL_S056H	428.9	1.45E+05	1.36E-04	9.39E-10	181.9	176.8	170.3	0.963
6	VL_S056K	413.5	1.38E+05	1.40E-04	1.02E-09	171.5	165.9	159.8	0.963
6	VL_Y031L	400.6	1.21E+05	2.56E-02	2.11E-07	106.1	63.5	6.4	0.101
6	VH_W035L	430.2	1.17E+05	1.15E-04	9.82E-10	151.6	142.6	138.1	0.988
6	VH_W035D	84.2	8.74E+04	5.11E-04	5.85E-09	27.7	24.3	21.6	0.889
6	VH_W035H	415.3	1.18E+05	1.93E-04	1.63E-09	162.4	153.1	145.7	0.952
6	VH_S035aA	427.8	1.48E+05	1.26E-04	8.48E-10	180.4	175.8	169.8	0.986
6	VH_S035aD	432.7	1.07E+05	9.84E-04	9.23E-09	167.4	151.1	120.2	0.795
6	VH_S035aY	405.1	4.28E+04	6.71E-07	1.57E-11	5.9	3.7	6.2	1.676
6	VH_S035aQ	393.7	1.58E+05	2.15E-02	1.36E-07	132	90.4	7	0.077
6	VH_S035aW	415.5	5.61E+04	2.71E-06	4.63E-11	4.7	3.5	5.7	1.629
6	VH_S035aH	415.5	9.64E+04	3.19E-02	3.31E-07	86.2	42	6.4	0.152
6	VH_S035aK	419.7	7.61E+04	7.25E-08	9.53E-13	7.3	7.4	7.5	1.014
6	VH_E050A	428.8	1.51E+05	3.53E-03	2.33E-08	177.7	165.1	74.2	0.449
6	VH_E050K	391.5	2.15E+05	2.74E-07	1.27E-12	3.7	3.8	5.8	1.526

Фиг. 32

Цикл №	Аминокислотная замена	Уровень захвата	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (M)	Rmax (RU)	Раннее связывание	Позднее связывание	Позднее связывание/Раннее связывание
6	VH_E050Q	440.4	1.56E+05	5.21E-03	3.33E-08	181.1	163.4	51.7	0.316
6	VH_E050W	434.5	1.59E+05	1.83E-04	1.15E-08	6.1	12.8	5.9	0.461
6	VH_T057A	424.4	1.50E+05	1.94E-04	1.29E-09	181.6	177.1	168.5	0.951
6	VH_T057K	418.5	1.31E+05	1.91E-04	1.46E-09	169.2	161.8	154.1	0.952
6	VH_T057Q	418.3	1.53E+05	1.30E-04	8.52E-10	180.9	177.3	171.1	0.965
6	VH_T057W	406.2	1.52E+05	1.33E-04	8.73E-10	175.6	172.2	166.1	0.965
6	VH_T057S	441.8	1.53E+05	1.55E-04	1.01E-09	190.6	186.3	178.7	0.959
6	VH_T057L	420.7	1.52E+05	1.64E-04	1.08E-09	181.9	177.9	170.2	0.957
6	VH_T057D	433.8	1.65E+05	1.06E-04	6.40E-10	195.2	192.6	187	0.971
6	VH_T057Y	423	1.51E+05	1.50E-04	9.96E-10	182	178.1	171.2	0.961
6	VH_T057H	417.9	1.45E+05	2.02E-04	1.39E-09	177.2	172.5	163.8	0.950
6	VH_N058K	408.4	1.24E+05	7.45E-04	6.01E-09	161.5	151.7	127.3	0.839
6	VH_N058Q	423	1.45E+05	1.11E-04	7.65E-10	180.7	176.1	170.7	0.969
6	VH_N058W	412.4	1.34E+05	4.73E-04	3.52E-09	171.3	164.4	146.8	0.893
6	VH_G098L	408.7	4.32E+04	5.30E-07	1.23E-11	6.1	3.8	6.6	1.737
6	Parent clone	434.6	1.50E+05	1.60E-04	1.07E-09	186.1	181.8	174.3	0.959

Фиг. 33

АНТИТЕЛО	Тяжелая цепь	Легкая цепь
АНТИТЕЛО 4	Дикий тип (ДТ)	Дикий тип (ДТ)
АНТИТЕЛО 1	S54F	ДТ
АНТИТЕЛО 2	S54Y	ДТ
АНТИТЕЛО 3	S54W	ДТ
АНТИТЕЛО 6	N56W	ДТ
АНТИТЕЛО 7	S54F + N56F	ДТ
АНТИТЕЛО 8	S54Y + N56F	ДТ
АНТИТЕЛО 9	S54W + N56F	ДТ
АНТИТЕЛО 10	S54F + N56Y	ДТ
АНТИТЕЛО 11	S54Y + N56Y	ДТ
АНТИТЕЛО 12	S54W + N56Y	ДТ
АНТИТЕЛО 13	S54F + N56W	ДТ
АНТИТЕЛО 14	S54Y + N56W	ДТ
АНТИТЕЛО 15	S54W + N56W	ДТ
АНТИТЕЛО 16	ДТ	D92S
АНТИТЕЛО 20	S35aA	ДТ
АНТИТЕЛО 21	W35L	ДТ
АНТИТЕЛО 22	Y52W	ДТ
АНТИТЕЛО 23	N56H	ДТ
АНТИТЕЛО 24	N56L	ДТ
АНТИТЕЛО 25	T57D	ДТ
АНТИТЕЛО 26	N58Q	ДТ
АНТИТЕЛО 27	N60Y	ДТ
АНТИТЕЛО 29	ДТ	G50S
АНТИТЕЛО 30	ДТ	K51A
АНТИТЕЛО 31	ДТ	K51H

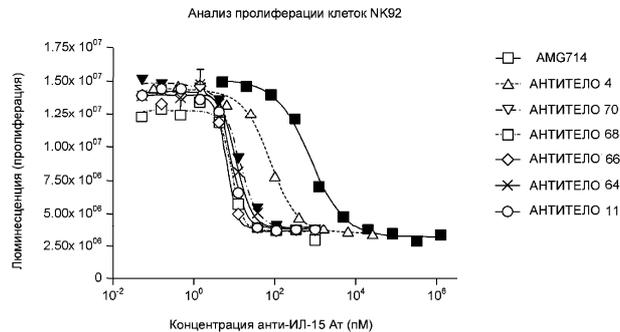
Фиг. 34А

АНТИТЕЛО	Тяжелая цепь	Легкая цепь
АНТИТЕЛО 32	ДТ	K51L
АНТИТЕЛО 33	ДТ	R54L
АНТИТЕЛО 34	ДТ	R54Q
АНТИТЕЛО 35	ДТ	R54Y
АНТИТЕЛО 36	Y102S	ДТ
АНТИТЕЛО 37	Y102L	ДТ
АНТИТЕЛО 38	Y102A	ДТ
АНТИТЕЛО 39	Y102H	ДТ
АНТИТЕЛО 40	S54F + N56W	K51H
АНТИТЕЛО 41	S54Y + N56W	K51H
АНТИТЕЛО 42	S54W + N56W	K51H
АНТИТЕЛО 43	S54F + N56W	R54Y
АНТИТЕЛО 44	S54Y + N56W	R54Y
АНТИТЕЛО 45	S54W + N56W	R54Y
АНТИТЕЛО 46	S54W+N60Y	ДТ
АНТИТЕЛО 47	N56W+N60Y	ДТ
АНТИТЕЛО 48	S54W+N56W+N60Y	ДТ
АНТИТЕЛО 49	ДТ	K51H + R54L
АНТИТЕЛО 50	ДТ	K51H + R54Y
АНТИТЕЛО 51	ДТ	N30S
АНТИТЕЛО 52	S54Y + N56W	N30S
АНТИТЕЛО 53	S54Y + N56Y	N30S
АНТИТЕЛО 54	ДТ	D92E
АНТИТЕЛО 55	S54Y + N56W	D92E
АНТИТЕЛО 56	S54Y + N56Y	D92E
АНТИТЕЛО 57	I82aS	ДТ
АНТИТЕЛО 58	S54Y + N56W + I82aS	ДТ
АНТИТЕЛО 59	I82aS	N30S
АНТИТЕЛО 60	S54Y + N56W + I82aS	N30S

Фиг. 34В

АНТИТЕЛО	Тяжелая цепь	Легкая цепь
АНТИТЕЛО 61	I82aS	D92E
АНТИТЕЛО 62	S54Y + N56Y + I82aS	D92E
АНТИТЕЛО 63	S54Y + N56Y + I82aS	ДТ
АНТИТЕЛО 64	S54Y + N56Y + I82aS	N30S
АНТИТЕЛО 65	S54Y + N56Y + I82aS	D92E
АНТИТЕЛО 66	S54Y + N56Y + I82aS	S93L
АНТИТЕЛО 67	S54Y + N56Y + I82aS	S93E
АНТИТЕЛО 68	S54Y + N56Y + I82aS	S93F
АНТИТЕЛО 69	S54Y + N56Y + I82aS	N30S+92E
АНТИТЕЛО 70	S54Y + N56Y + I82aS	N30S+S93L
АНТИТЕЛО 71	S54Y + N56Y + I82aS	N30S+S93E
АНТИТЕЛО 72	S54Y + N56Y + I82aS	N30S+S93F
АНТИТЕЛО 73	S54Y + N56Y	N30S
АНТИТЕЛО 74	S54Y + N56Y	D92E
АНТИТЕЛО 75	S54Y + N56Y	S93L
АНТИТЕЛО 76	S54Y + N56Y	S93E
АНТИТЕЛО 77	S54Y + N56Y	S93F
АНТИТЕЛО 78	S54Y + N56Y	N30S+D92E
АНТИТЕЛО 79	S54Y + N56Y	N30S+S93L
АНТИТЕЛО 80	S54Y + N56Y	N30S+S93E
АНТИТЕЛО 81	S54Y + N56Y	N30S+S93F

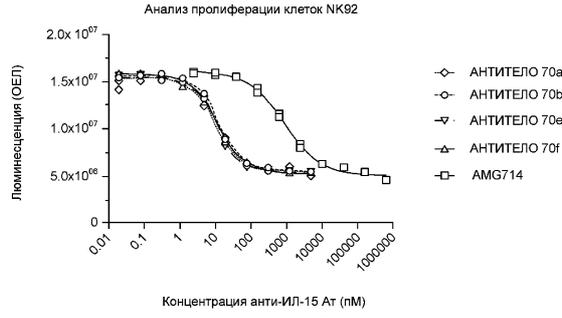
Фиг. 34С



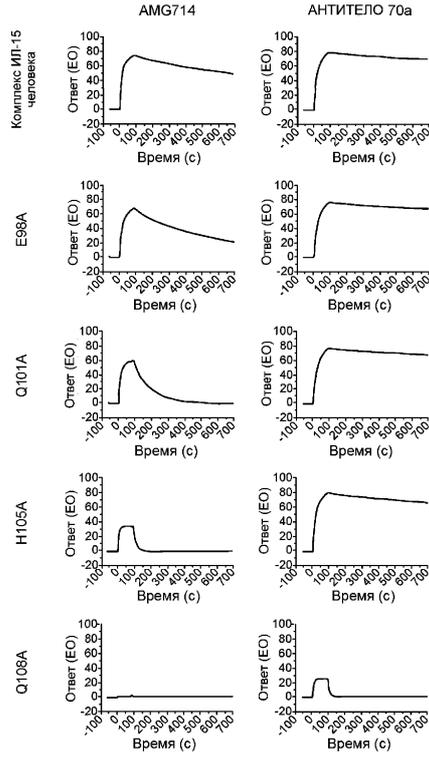
Фиг. 35

Образец	Лиганд	Ka (1/c)	Kd (1/c)	KD (нМ)			
Комплекс ИЛ-15 человека	АНТИТЕЛО 70a	2.52e+05	2.61e+05	3.47e-05	3.75e-05	0.133	0.149
	АНТИТЕЛО 70b	2.49e+05	2.54e+05	3.92e-05	3.89e-05	0.154	0.157
	АНТИТЕЛО 70e	2.37e+05	2.47e+05	4.31e-05	4.58e-05	0.174	0.193
	АНТИТЕЛО 70f	2.49e+05	2.60e+05	4.44e-05	4.32e-05	0.171	0.173
	АНТИТЕЛО 4	1.48e+05	1.50e+05	9.43e-05	9.31e-05	0.630	0.628
	AMG714	2.09e+05	2.14e+05	3.98e-04	3.80e-04	1.86	1.82

Фиг. 36



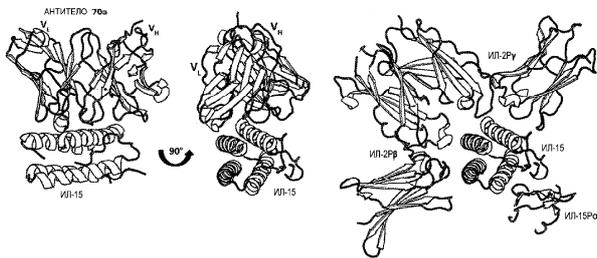
Фиг. 37



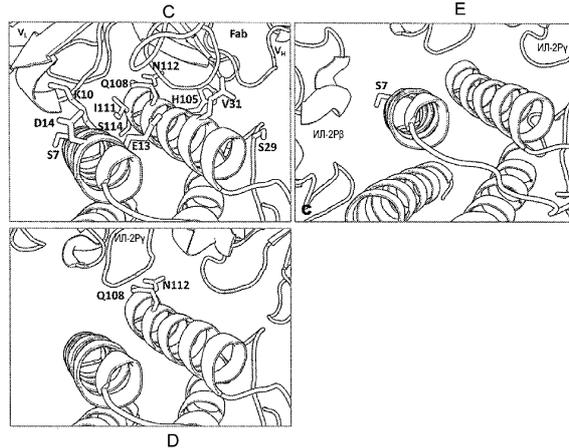
Фиг. 38

A

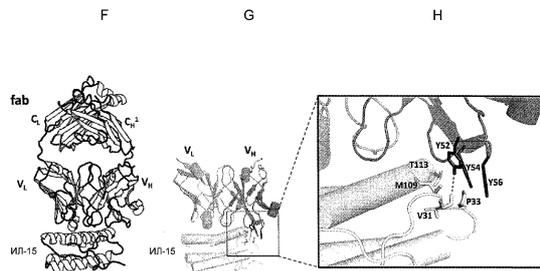
B



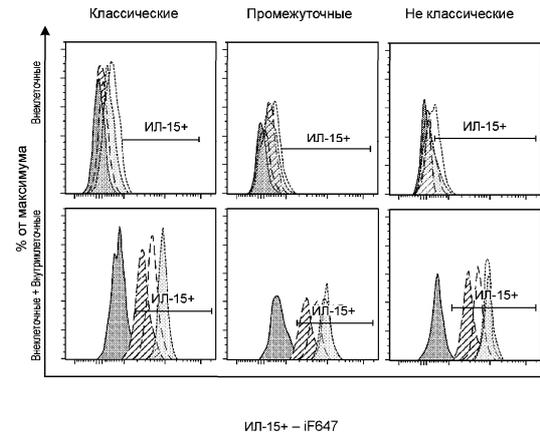
Фиг. 39A, B



Фиг. 39C, D, E



Фиг. 39F, G, H



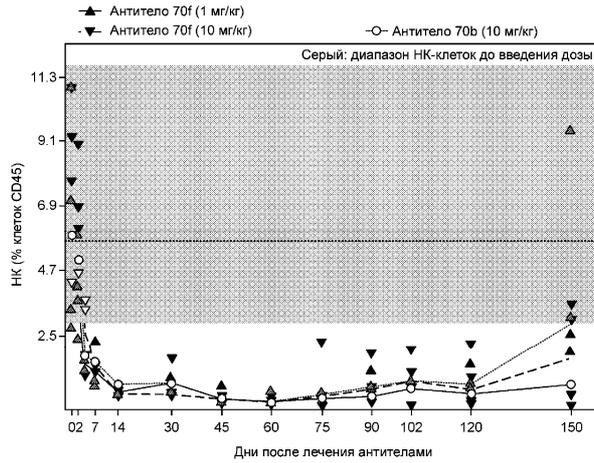
ИЛ-15+ – iF647

- - - - - АНТИТЕЛО 70а ▨ АНТИТЕЛО 70е ■ Изотип
 - - - - - АНТИТЕЛО 70б ▩ АНТИТЕЛО 70г

Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42

H1	H2	H3
58	18 или 19	20
59	18 или 19	20
60	18 или 19	20
61	18 или 19	20
62	18 или 19	20
63	18 или 19	20
64	18 или 19	20
65	18 или 19	20
66	18 или 19	20
67	18 или 19	20
68	18 или 19	20
69	18 или 19	20
70	18 или 19	20
71	18 или 19	20
72	18 или 19	20
73	18 или 19	20
74	18 или 19	20
75	18 или 19	20
76	18 или 19	20
77	18 или 19	20
78	18 или 19	20
79	18 или 19	20
80	18 или 19	20
81	18 или 19	20
82	18 или 19	20
83	18 или 19	20
84	18 или 19	20
85	18 или 19	20
86	18 или 19	20
87	18 или 19	20
88	18 или 19	20
89	18 или 19	20
90	18 или 19	20
91	18 или 19	20
92	18 или 19	20
93	18 или 19	20
94	18 или 19	20
95	18 или 19	20
96	18 или 19	20
97	18 или 19	20
98	18 или 19	20

H1	H2	H3
99	18 или 19	20
100	18 или 19	20
101	18 или 19	20
102	18 или 19	20
103	18 или 19	20
104	18 или 19	20
105	18 или 19	20
106	18 или 19	20
107	18 или 19	20
108	18 или 19	20
109	18 или 19	20
110	18 или 19	20
111	18 или 19	20
112	18 или 19	20
113	18 или 19	20
114	18 или 19	20
115	18 или 19	20
116	18 или 19	20
117	18 или 19	20
118	18 или 19	20
119	18 или 19	20
120	18 или 19	20
121	18 или 19	20
122	18 или 19	20
123	18 или 19	20
124	18 или 19	20
125	18 или 19	20
126	18 или 19	20
127	18 или 19	20
128	18 или 19	20
129	18 или 19	20
130	18 или 19	20
131	18 или 19	20
132	18 или 19	20
133	18 или 19	20
134	18 или 19	20
135	18 или 19	20

Фиг. 43А

H1	H2	H3
453	136	20
453	137	20
453	138	20
453	139	20
453	140	20
453	141	20
453	142	20
453	143	20
453	144	20
453	145	20
453	146	20
453	147	20
453	148	20
453	149	20
453	150	20
453	151	20
453	152	20
453	153	20
453	154	20
453	155	20
453	156	20
453	157	20
453	158	20
453	159	20
453	160	20
453	161	20
453	162	20
453	163	20
453	164	20
453	165	20
453	166	20

H1	H2	H3
453	167	20
453	168	20
453	169	20
453	170	20
453	171	20
453	172	20
453	173	20
453	174	20
453	175	20
453	176	20
453	177	20
453	178	20
453	179	20
453	180	20
453	181	20
453	182	20
453	183	20
453	184	20
453	185	20
453	186	20
453	187	20
453	188	20
453	189	20
453	190	20
453	191	20
453	192	20
453	193	20
453	194	20
453	195	20
453	196	20
453	197	20

H1	H2	H3
453	198	20
453	199	20
453	200	20
453	201	20
453	202	20
453	203	20
453	204	20
453	205	20
453	206	20
453	207	20
453	208	20
453	209	20
453	210	20
453	211	20
453	212	20
453	213	20
453	214	20
453	215	20
453	216	20
453	217	20
453	218	20
453	219	20
453	220	20
453	221	20
453	222	20
453	223	20
453	224	20
453	225	20
453	226	20

Фиг. 43В

040821

H1	H2	H3
453	18 или 19	227
453	18 или 19	228
453	18 или 19	229
453	18 или 19	230
453	18 или 19	231
453	18 или 19	232
453	18 или 19	233
453	18 или 19	234
453	18 или 19	235
453	18 или 19	236
453	18 или 19	237
453	18 или 19	238
453	18 или 19	239
453	18 или 19	240
453	18 или 19	241
453	18 или 19	242
453	18 или 19	243
453	18 или 19	244
453	18 или 19	245
453	18 или 19	246
453	18 или 19	247
453	18 или 19	248
453	18 или 19	249
453	18 или 19	250
453	18 или 19	251
453	18 или 19	252
453	18 или 19	253
453	18 или 19	254
453	18 или 19	255
453	18 или 19	256
453	18 или 19	257
453	18 или 19	258
453	18 или 19	259
453	18 или 19	260
453	18 или 19	261
453	18 или 19	262
453	18 или 19	263
453	18 или 19	264
453	18 или 19	265
453	18 или 19	266
453	18 или 19	267
453	18 или 19	268

H1	H2	H3
453	18 или 19	269
453	18 или 19	270
453	18 или 19	271
453	18 или 19	272

Фиг. 43С

L1	L2	L3
273	28	30, 31, или 519
274	28	30, 31, или 519
275	28	30, 31, или 519
276	28	30, 31, или 519
277	28	30, 31, или 519
278	28	30, 31, или 519
279	28	30, 31, или 519
280	28	30, 31, или 519
281	28	30, 31, или 519
282	28	30, 31, или 519
283	28	30, 31, или 519
284	28	30, 31, или 519
285	28	30, 31, или 519
286	28	30, 31, или 519
287	28	30, 31, или 519
288	28	30, 31, или 519
289	28	30, 31, или 519
290	28	30, 31, или 519
291	28	30, 31, или 519
292	28	30, 31, или 519
293	28	30, 31, или 519
294	28	30, 31, или 519
295	28	30, 31, или 519
296	28	30, 31, или 519
297	28	30, 31, или 519
298	28	30, 31, или 519
299	28	30, 31, или 519
300	28	30, 31, или 519
301	28	30, 31, или 519
302	28	30, 31, или 519
303	28	30, 31, или 519
304	28	30, 31, или 519
305	28	30, 31, или 519
306	28	30, 31, или 519
307	28	30, 31, или 519
308	28	30, 31, или 519
309	28	30, 31, или 519
310	28	30, 31, или 519
311	28	30, 31, или 519
312	28	30, 31, или 519

L1	L2	L3
313	28	30, 31, или 519
314	28	30, 31, или 519
315	28	30, 31, или 519
316	28	30, 31, или 519
317	28	30, 31, или 519
318	28	30, 31, или 519
319	28	30, 31, или 519
320	28	30, 31, или 519
321	28	30, 31, или 519
322	28	30, 31, или 519
323	28	30, 31, или 519
324	28	30, 31, или 519
325	28	30, 31, или 519
326	28	30, 31, или 519
327	28	30, 31, или 519
328	28	30, 31, или 519
329	28	30, 31, или 519

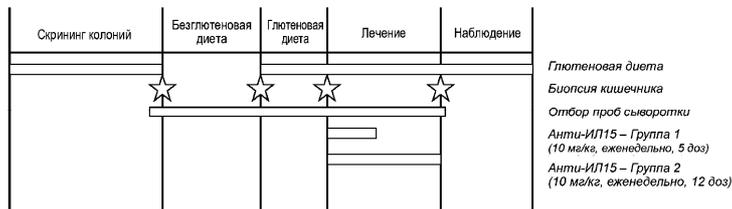
Фиг. 44А

L1	L2	L3	L1	L2	L3
26 или 27	330	30, 31, или 519	26 или 27	370	30, 31, или 519
26 или 27	331	30, 31, или 519	26 или 27	371	30, 31, или 519
26 или 27	332	30, 31, или 519	26 или 27	372	30, 31, или 519
26 или 27	333	30, 31, или 519	26 или 27	373	30, 31, или 519
26 или 27	334	30, 31, или 519	26 или 27	374	30, 31, или 519
26 или 27	335	30, 31, или 519	26 или 27	375	30, 31, или 519
26 или 27	336	30, 31, или 519	26 или 27	376	30, 31, или 519
26 или 27	337	30, 31, или 519	26 или 27	377	30, 31, или 519
26 или 27	338	30, 31, или 519	26 или 27	378	30, 31, или 519
26 или 27	339	30, 31, или 519	26 или 27	379	30, 31, или 519
26 или 27	340	30, 31, или 519	26 или 27	380	30, 31, или 519
26 или 27	341	30, 31, или 519	26 или 27	381	30, 31, или 519
26 или 27	342	30, 31, или 519	26 или 27	382	30, 31, или 519
26 или 27	343	30, 31, или 519	26 или 27	383	30, 31, или 519
26 или 27	344	30, 31, или 519	26 или 27	384	30, 31, или 519
26 или 27	345	30, 31, или 519	26 или 27	385	30, 31, или 519
26 или 27	346	30, 31, или 519	26 или 27	386	30, 31, или 519
26 или 27	347	30, 31, или 519	26 или 27	387	30, 31, или 519
26 или 27	348	30, 31, или 519	26 или 27	388	30, 31, или 519
26 или 27	349	30, 31, или 519	26 или 27	389	30, 31, или 519
26 или 27	350	30, 31, или 519	26 или 27	390	30, 31, или 519
26 или 27	351	30, 31, или 519			
26 или 27	352	30, 31, или 519			
26 или 27	353	30, 31, или 519			
26 или 27	354	30, 31, или 519			
26 или 27	355	30, 31, или 519			
26 или 27	356	30, 31, или 519			
26 или 27	357	30, 31, или 519			
26 или 27	358	30, 31, или 519			
26 или 27	359	30, 31, или 519			
26 или 27	360	30, 31, или 519			
26 или 27	361	30, 31, или 519			
26 или 27	362	30, 31, или 519			
26 или 27	363	30, 31, или 519			
26 или 27	364	30, 31, или 519			
26 или 27	365	30, 31, или 519			
26 или 27	366	30, 31, или 519			
26 или 27	367	30, 31, или 519			
26 или 27	368	30, 31, или 519			
26 или 27	369	30, 31, или 519			

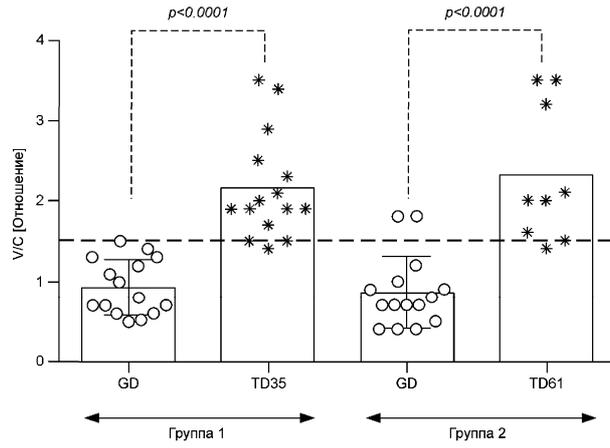
Фиг. 44В

L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
26 или 27	28	391	26 или 27	28	431	26 или 27	28	471
26 или 27	28	392	26 или 27	28	432	26 или 27	28	472
26 или 27	28	393	26 или 27	28	433	26 или 27	28	473
26 или 27	28	394	26 или 27	28	434	26 или 27	28	474
26 или 27	28	395	26 или 27	28	435			
26 или 27	28	396	26 или 27	28	436			
26 или 27	28	397	26 или 27	28	437			
26 или 27	28	398	26 или 27	28	438			
26 или 27	28	399	26 или 27	28	439			
26 или 27	28	400	26 или 27	28	440			
26 или 27	28	401	26 или 27	28	441			
26 или 27	28	402	26 или 27	28	442			
26 или 27	28	403	26 или 27	28	443			
26 или 27	28	404	26 или 27	28	444			
26 или 27	28	405	26 или 27	28	445			
26 или 27	28	406	26 или 27	28	446			
26 или 27	28	407	26 или 27	28	447			
26 или 27	28	408	26 или 27	28	448			
26 или 27	28	409	26 или 27	28	449			
26 или 27	28	410	26 или 27	28	450			
26 или 27	28	411	26 или 27	28	451			
26 или 27	28	412	26 или 27	28	452			
26 или 27	28	413	26 или 27	28	453			
26 или 27	28	414	26 или 27	28	454			
26 или 27	28	415	26 или 27	28	455			
26 или 27	28	416	26 или 27	28	456			
26 или 27	28	417	26 или 27	28	457			
26 или 27	28	418	26 или 27	28	458			
26 или 27	28	419	26 или 27	28	459			
26 или 27	28	420	26 или 27	28	460			
26 или 27	28	421	26 или 27	28	461			
26 или 27	28	422	26 или 27	28	462			
26 или 27	28	423	26 или 27	28	463			
26 или 27	28	424	26 или 27	28	464			
26 или 27	28	425	26 или 27	28	465			
26 или 27	28	426	26 или 27	28	466			
26 или 27	28	427	26 или 27	28	467			
26 или 27	28	428	26 или 27	28	468			
26 или 27	28	429	26 или 27	28	469			
26 или 27	28	430	26 или 27	28	470			

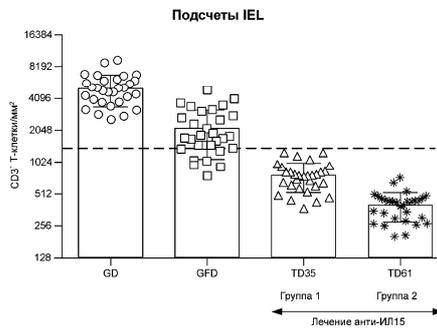
Фиг. 44С



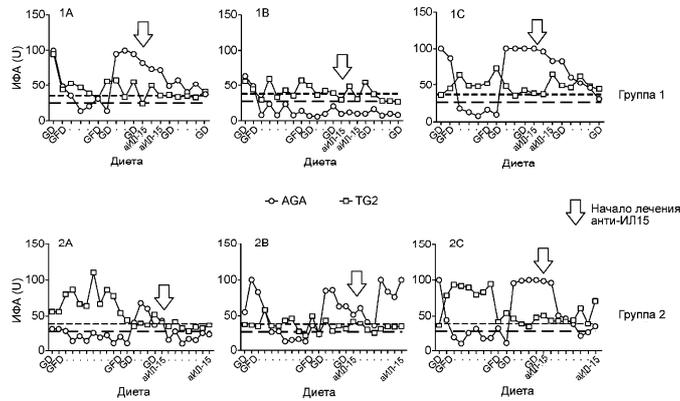
Фиг. 45А



Фиг. 45В



Фиг. 45С



Фиг. 45D

