



УКРАЇНА

(19) **UA**
(51) МПК(11) **128814**(13) **C2****C07K 16/28** (2006.01)**C07K 16/46** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 37/06** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2019 09718**
(22) Дата подання заявки: **12.02.2018**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **31.10.2024**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **РА 2017 00097**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **10.02.2017**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **DK**
(41) Публікація відомостей про заявку: **27.04.2020, Бюл.№ 8**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **30.10.2024, Бюл.№ 44**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2018/053464, 12.02.2018**

(72) Винахідник(и):
**Бьорскенс Франк (NL),
Овердейк Марейс (NL),
Дікс Аннік М. (NL),
де Йонг Роб (NL),
Стрюмане Крістін (NL),
Схююрман Яніне (NL),
Паррен Пауль (NL)**
(73) Володілець (володільці):
**ГЕНМАБ Б.В.,
Uppsalaalaan 15, 3584 CT Utrecht, The
Netherlands (NL)**
(74) Представник:
**Петров Андрій Володимирович, реєстр.
№139**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
**WO 2014006217 A1, 09.01.2014
WO 2011122011 A2, 06.10.2011
WO 2005070963 A1, 04.10.2005
Monoclonal antibodies against epidermal growth factor receptor acquire an ability to kill tumor cells through complement activation by mutations that selectively facilitate the hexamerization of IgG on opsonized cells / A. Tammen et al. Journal of immunology. 2017. Vol. 198 (4). P. 1585-1594
Engineered antibodies with increased activity to recruit complement / E.E. Idusogie et al. Journal of immunology. 2001. Vol. 166 (4). P. 2571-2575**

(54) ПОЛІПЕПТИД ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Винахід стосується поліпептиду, який містить Fc-область імуноглобуліну й антигензв'язувальну ділянку. Також винахід стосується способу підвищення агоністичної активності поліпептиду, способу підвищення активності CDC поліпептиду, композиції.

UA 128814 C2

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід стосується поліпептидів, які містять Fc-область і які містять ділянки зв'язування, таких як антитіла, що мають щонайменше дві амінокислотні заміни в Fc-області в порівнянні з вихідним поліпептидом або антитілом.

5 Рівень техніки

Опосередковані Fc ефекторні функції моноклональних антитіл, наприклад комплемент-залежна цитотоксичність (CDC), антитілозалежна клітиново-опосередкована цитотоксичність (ADCC) і антитілозалежний клітинний фагоцитоз (ADCP), вносять свою частку у терапевтичному вікні, обумовленому ефективністю й токсичністю. CDC запускається при зв'язуванні C1q з Fc-областями антитіл. C1q є мультимерним білком, що складається із шести глобулярних з'єднувальних голів, прикріплених до ніжки.

10 Було показано, що гексамеризація IgG при зв'язуванні мішені на клітинній поверхні посилюється при точкових мутаціях в Fc-області. Гексамеризація опосередковується міжмолекулярними нековалентними взаємодіями Fc-Fc, а взаємодії Fc-Fc можуть посилюватися при точкових мутаціях у домені C_H3, включаючи E345R і E430G.

15 В WO 2013/004842 розкриті антитіла або поліпептиди, які містять варіанти Fc-області з модифікаціями однієї або декількох амінокислот, що приводять до модифікації таких ефекторних функцій, як комплемент-залежна цитотоксичність (CDC).

20 В WO 2014/108198 розкриті поліпептиди типу антитіл, які містять варіанти Fc-області з модифікаціями однієї або декількох амінокислот, що приводять до посилення комплемент-залежної цитотоксичності (CDC).

В WO2016/164480 розкриті антигензв'язувальні комплекси, які мають активність агоністів.

25 Посилення взаємодій Fc-Fc між антитілами може використовуватися для посилення ефекту зв'язування антитіл зі своєю мішенню на поверхні клітини. Однак одного лише посилення взаємодії Fc-Fc між Fc-областями не завжди достатньо для генерування досить сильного сигналу для активації сигнального шляху, наприклад, при зв'язуванні з рецептором.

30 Відповідно, метою даного винаходу є одержання такого поліпептиду або антитіла, які б містили Fc-область IgG людини й антигензв'язувальну ділянку, у якій будуть посилені взаємодії Fc-Fc і агоністична активність типу посилення активації рецептора-мішені при зв'язуванні у порівнянні з вихідним поліпептидом, причому вихідним поліпептидом є IgG людини того ж ізотипу й з такою ж антигензв'язувальною ділянкою, але без мутацій в Fc-області, тобто вихідний поліпептид або вихідне антитіло.

35 Іншою метою даного винаходу є одержання такого поліпептиду, який активує передачу сигналів, необов'язково індукує посилення передачі сигналів при зв'язуванні антигензв'язувальної ділянки поліпептиду, наприклад, антитіла, з відповідним антигеном у порівнянні з вихідним поліпептидом, причому вихідний поліпептид не має мутацій в Fc-області.

Наступною метою даного винаходу є одержання поліпептиду із властивостями посилення взаємодій Fc-Fc і посилення ефекторних функцій типу CDC. Ще однією метою даного винаходу є одержання поліпептиду із властивостями посилення взаємодій Fc-Fc і посилення зв'язування C1q у порівнянні з вихідним поліпептидом без будь-яких мутацій в Fc-області.

40 Сутність винаходу

45 Як тут описано, даний винахід стосується поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область і антигензв'язувальну ділянку, причому Fc-область має посилюючу Fc-Fc мутацію й мутацію із зв'язування C1q, утворюючи поліпептиди або антитіла з підвищеною активністю CDC і/або агоністичною активністю.

Не обмежуючись теорією, вважаємо, що запропоновані винаходом поліпептиди або антитіла здатні до стабільної з'єднувальної взаємодії між Fc-областями двох поліпептидів або молекул антитіл при зв'язуванні з мішенню на поверхні клітини, що призводить до посилення олігомеризації типу утворення гексамерів, тим самим забезпечуючи авідність поверхні. 50 Поліпептиди або антитіла запропоновані винаходом також мають підвищену Fc-ефекторну реакцію в порівнянні зі своїм вихідним поліпептидом або вихідним антитілом без мутацій в Fc-області, тобто вихідним поліпептидом або антитілом того ж ізотипу.

В одному аспекті даного винаходу передбачені поліпептиди або антитіла, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й антигензв'язувальну ділянку, причому Fc-область включає: а) щонайменше одну заміну, яка посилює Fc-Fc, у положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, і б) щонайменше одну заміну за зв'язуванням C1q, причому ці положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA 1969 May, 63(1): 78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 1991, NIH Publication No. 91-3242).

В одному аспекті винаходу передбачені поліпептиди або антитіла, які містять Fc-область імуноглобуліну й антигензв'язувальну ділянку, причому Fc-область включає: а) заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, і b) заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому ці положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

Заміна в положенні, що відповідає E430, E345, або заміна S440Y або S440W вважається заміною, яка посилює Fc-Fc відповідно до даного винаходу.

Заміна в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, вважається заміною за зв'язуванням C1q відповідно до даного винаходу.

Так, автори даного винаходу в першому аспекті винаходу виявили, що введення першої мутації, яка посилює взаємодію Fc-Fc, разом із другою мутацією, що посилює зв'язування C1q, забезпечує поліпептиди або антитіла з підвищеною агоністичною активністю й/або CDC.

В одному аспекті даного винаходу передбачені поліпептиди або антитіла, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й антигензв'язувальну ділянку, причому Fc-область включає: а) заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, і b) заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому ці положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

Так, автори винаходу виявили, що посилююча Fc-Fc мутація разом з однією або декількома замінами із зв'язування C1q в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, може забезпечити агоністичну активність.

Автори винаходу також виявили, що посилююча Fc-Fc мутація разом з однією або декількома замінами із зв'язування C1q в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, може забезпечити посилення опосередкованих Fc ефекторних функцій типу посилення CDC.

Комбінація посилюючої Fc-Fc мутації й заміни із зв'язування C1q у поліпептидах або антитілах також дає несподіваний ефект одержання поліпептидів або антитіл з агоністичними властивостями в порівнянні з вихідним поліпептидом або вихідним антитілом.

В одному втіленні даного винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W і S440Y.

В одному втіленні даного винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E430G, E430S, E430F і E430T.

В одному втіленні даного винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E345K, E345Q, E345R і E345Y.

В одному втіленні даного винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну E430G. В одному втіленні даного винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну E345K. В одному втіленні даного винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну S440Y.

В одному втіленні даного винаходу поліпептид або антитіло містить заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з K326, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу поліпептид або антитіло містить заміну в одному або декількох положеннях типу двох або трьох положень, обраних із групи, яка складається з K326A, K326W, E333S, E333A і P396L.

В одному втіленні даного винаходу поліпептид або антитіло містить заміну в одному або декількох положеннях типу двох або трьох положень, обраних із групи, яка складається з K326A, K326W, E333S, E333A, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу поліпептид або антитіло містить заміни K326W і E333S.

В іншому аспекті даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область IgG людини й антигензв'язувальну ділянку, який передбачає: а) введення заміни в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміни S440Y або S440W, і b) введення заміни в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому ці положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

В іншому аспекті даного винаходу запропонований спосіб підвищення активності CDC поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область IgG людини й антигензв'язувальну ділянку, який передбачає: а) введення заміни в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345,

або заміни S440Y або S440W, і b) введення заміни в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому ці положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

В іншому аспекті даного винаходу передбачені композиції, які містять щонайменше один з поміж описаних тут поліпептидів або антитіл.

В іншому аспекті даного винаходу передбачені поліпептиди, антитіла або композиції, які описані тут, для їх застосування як лікарських засобів.

В іншому аспекті даного винаходу передбачені поліпептиди, антитіла або композиції, які описані тут, для застосування їх при лікуванні раку, аутоімунних захворювань, запальних захворювань або інфекційних захворювань.

В іншому аспекті даного винаходу передбачений спосіб лікування осіб із захворюваннями, який передбачає введення їм ефективної кількості описаних тут поліпептидів, антитіл або композицій.

Ці й інші аспекти винаходу, зокрема різні застосування й терапевтичні застосування поліпептидів або антитіл, більш докладно описані нижче.

Короткий опис фігур

На Фіг. 1 представлений вплив E430G, K326A/E333A/P396L і K326A/E333A/P396L/E430G на ефективність антитіл IgG1-hDR5-01-G56T (A), IgG1-hDR-05 (B) і комбінації антитіл (C) на адгезовані ракові клітини ВхРС-3 підшлункової залози людини при визначенні методом 3-денного аналізу життєздатності (CellTiter-Glo). Представлені типові приклади із двох експериментів.

На Фіг. 2 представлена ефективність моновалентних антитіл проти DR5a із заміною K326A/E333A/P396L/E430G на адгезовані ракові клітини ВхРС-3 підшлункової залози (A) і COLO 205 товстої кишки (B) людини при визначенні методом 3-денного аналізу життєздатності (CellTiter-Glo). Як моновалентні антитіла проти DR5 одержували біспецифічне антитіло з одним DR5-специфічним плечем, отриманим з IgG1-hDR5-01-G56T, і одним неспецифічним плечем проти білка gp120 ВІЛ, отриманим з IgG1-b12, шляхом контрольованого обміну Fab-Плеча. Представлені типові приклади із трьох експериментів.

На Фіг. 3 представлений вплив E430G у комбінації з K326A/E333A/P396L або двома із замін 333A/P396L, K326A/E333A або K326A/P396L на ефективність антитіл проти DR5a типу IgG1-hDR5-01-G56T на адгезовані ракові клітини ВхРС-3 підшлункової залози (A) і COLO 205 товстої кишки (B) людини при визначенні методом 3-денного аналізу життєздатності (CellTiter-Glo) і на зв'язування C1q при визначенні методом ELISA (C). Представлені типові приклади із трьох експериментів.

На Фіг. 4 представлений вплив E430G у комбінації з K326A/E333A або K326W/E333S на зв'язування C1q з антитілом IgG1-CONA-C49W проти DR5 при визначенні методом ELISA (A) і на ефективність антитіла IgG1-hDR5-01-G56T проти DR5 на адгезовані ракові клітини ВхРС-3 підшлункової залози (B) і COLO 205 товстої кишки (B) людини при визначенні методом 3-денного аналізу життєздатності (CellTiter-Glo). Представлені типові приклади із трьох експериментів.

На Фіг. 5 представлений вплив E430G у комбінації із замінами із зв'язування C1q S267E/H268F/S324T або з варіантом 113F IgG1 химерного ізотипу IgG1/IgG3 на зв'язування C1q з антитілом IgG1-hDR5-01-G56T проти DR5 при визначенні методом ELISA (A) і на дію антитіла IgG1-hDR5-01-G56T проти DR5 на адгезовані ракові клітини підшлункової залози (B) і COLO 205 товстої кишки (C) людини при визначенні методом 3-денного аналізу життєздатності (CellTiter-Glo). Представлені типові приклади із трьох експериментів.

На Фіг. 6 представлено зведення за 3-денним аналізом життєздатності (CellTiter-Glo) на адгезованих ракових клітинах ВхРС-3 підшлункової залози людини при 10 мкг/мл варіантів IgG1-hDR5-01-G56T, які мають зазначені мутації. Представлені ефекти, ранжирувані за відсотком життєздатних клітин відносно IgG1-hDR5-01-G56T дикого типу (WT), який приймали за 100%. Значимі ефекти на життєздатність клітин у порівнянні з WT наведені як *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001 (однобічний метод ANOVA із критерієм множинних порівнянь Даннетта).

На Фіг. 7 представлений агоністичний вплив антитіл IgG1-CONA-C49W-K326A/E333A/P396L/E430G (A) і IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G (B) проти DR5 на суспензію клітин WIL2-S SF у безсывороточному середовищі в присутності або за відсутності 2,5 мкг/мл очищеного C1q людини при визначенні методом 24-годинного аналізу життєздатності. Відсоток життєздатних клітин представлений у вигляді відсотка негативних за ТО-PRO-3 клітин.

На Фіг. 8 представлений агоністичний вплив 2,5 мкг/мл варіантів антитіла IgG1-hDR5-01-G56T проти DR5 з посилюючою Fc-Fc заміною E430G у комбінації із замінами із зв'язування C1q

(A) і комбінації антитіл IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (B) на суспензію клітин WIL2-S SF у безсировоточному середовищі в присутності або за відсутності ряду концентрацій очищеного C1q людини при визначенні методом 24-годинного аналізу життєздатності. Відсоток життєздатних клітин представлений у вигляді відсотка негативних за TO-PRO-3 клітин. Представлені дані 4 різних експериментів, а планки похибок означають стандартне відхилення.

На Фіг. 9 представлена ефективність 2,5 мкг/мл агоністичного антитіла IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G (A) і комбінації антитіл IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (B) проти DR5 на суспензію клітин WIL2-S SF у безсировоточному середовищі з очищеним C1q людини й нейтралізуючим антитілом проти C1q або без них при визначенні методом 24-вартового аналізу життєздатності. Відсоток життєздатних клітин представлений у вигляді відсотка негативних за TO-PRO-3 клітин.

На Фіг. 10 представлена активація комплементу у фазі розчину при вимірюванні за осадженням C4d при інкубації зразків антитілу в NHS для варіантів антитіла IgG1-hDR5-01-G56T, що містять посилюючу Fc-Fc заміну 430G у комбінації із замінами із зв'язування C1q K326W/E333S, K326A/E333A або K326A/E333A/P396L. Як позитивний контроль для активації комплементу у фазі розчину визначали HAGG (агрегований при нагріванні γ-глобулін) і IgG1-CONA-RGY.

На Фіг. 11 представлений вплив введення замін K326W, E333S або K326W/E333S в IgG-CONA-C49W і IgG1-CONA-C49W-E430G на зв'язування C1q при визначенні методом ELISA (A, B), на зв'язування C1q з антитілами, які зв'язалися з DR 5-позитивними клітинами WIL2-S SF при визначенні методом проточної цитометрії (C, D), і на зниження життєздатності суспензії клітин WIL2-S SF при визначенні методом 3-денного аналізу життєздатності (CellTiter-Glo) (E, F, G). Стандартні відхилення розраховували із двох незалежних експериментів.

На Фіг. 12 представлений вплив введення замін K326W, E333S або K326W/E333S в IgG-CONA-C49W і IgG1-CONA-C49W-E430G (2,5 мкг/мл) на життєздатність суспензії клітин WIL2-S SF у безсировоточному середовищі в присутності ряду концентрацій очищеного C1q людини при визначенні методом 24-годинного аналізу життєздатності. Відсоток життєздатних клітин визначали методом CellTiter-Glo.

На Фіг. 13 представлений вплив додавання антитіла проти C1q на дію варіантів антитіла IgG1-CONA-C49W проти DR5 з посилюючими зв'язування C1q мутаціями й/або з посилюючими взаємодію Fc-Fc мутаціями при 24-годинному аналізі життєздатності на суспензії клітин WIL2-S SF у безсировоточному середовищі з додаванням очищеного C1q людини. Відсоток життєздатних клітин визначали методом CellTiter-Glo.

На Фіг. 14 представлений вплив додавання пептиду, який інгібує взаємодії Fc-Fc між варіантами антитіла IgG1-CONA-C49W проти DR5, опсонізованими в суспензії клітин WIL2-S SF, інкубованих у безсировоточному середовищі з додаванням очищеного C1q людини, при 24-годинному аналізі життєздатності. Відсоток життєздатних клітин визначали методом CellTiter-Glo. Як неспецифічний контрольний пептид використовували розупорядкований пептид WCDLEGVTWHACL.

На Фіг. 15 представлений вплив комбінації замін із зв'язування C1q K326W/E333S з посилюючими Fc-Fc мутаціями E345K, E345R або S440Y на агоністичну дію антитіла IgG1-CONA-C49W проти DR5 на адгезовані ракові клітини BxPC-3 підшлункової залози людини при визначенні методом 3-денного аналізу життєздатності (CellTiter-Glo).

На Фіг. 16 представлений вплив мутації E430G у комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями S267E/H268F/S324T або з варіантом 113F IgG1 химерного ізотипу IgG1/IgG3 при введенні в антитіло IgG1-CONA-C49W проти DR5 на життєздатність адгезованих ракових клітин BxPC-3 підшлункової залози людини при визначенні методом 3-денного аналізу життєздатності (CellTiter-Glo).

На Фіг. 17 представлений вплив функціонально моновалентного антитіла проти DR5 з мутаціями K326W/E333S/E430G на життєздатність суспензії клітин WIL2-S SF при визначенні методом 1-денного аналізу життєздатності (CellTiter-Glo). Функціонально моновалентне антитіло проти DR5 одержували у вигляді біспецифічного антитіла шляхом контрольованого обміну Fab-плеча IgG1-CONA-C49W-F405L-K326W/E333S/E430G (DR5-специфічне плече) і IgG1-b12-K409R-K326W/E333S/E430G (неспецифічне плече, спрямоване проти білка gp120 ВІЛ). RLU: відносні одиниці люмінесценції.

На Фіг. 18 представлений вплив введення замін K326W/E333S/E430G на агоністичну активність варіантів антитілу проти DR5 (IgG1-CONA-C49W і IgG3-CONA-C49W-R345H) ізотипу IgG1 і IgG3 при визначенні методом 1-денного аналізу життєздатності на клітинах WIL2-S SF (A)

і 3-денного аналізу життєздатності на клітинах BxPC-3 (B), HPAF-II (C) і HT-29 (D). Життєздатність визначали за допомогою набору CellTiter-Glo.

На Фіг. 19 представлений вплив уведення посилюючої гексамеризацію мутації E430G разом з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333T або K326W/E333S в антитіло IgG1-CONA-C49W проти DR5 на суспензію клітин WIL2-s при визначенні методом 24-годинного аналізу життєздатності (CellTiterGlo).

На Фіг. 20 представлена швидкість кліренсу 450 мкг антитіла, що вводиться в/в мишам SCID. (A) Визначали загальний IgG людини в зразках сироватки методом ELISA і наносили на графік залежності концентрації у часі. Кожна точка даних представляє середнє $\pm$ стандартне відхилення із трьох зразків. (B) Визначали кліренс до 21 дня після введення антитіла за формулою $D \times 1,000/AUC$, де D – введена доза, а AUC – площа під кривою концентрація-час. Представлено типовий приклад з 2 незалежних експериментів по ELISA.

На Фіг. 21 представлений вплив посилюючої Fc-Fc мутації E430G у комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями (K326A/E333A або K326W/E333S) на зв'язування варіантів антитіла IgG1-7D8 з FcRn людини при визначенні методом ELISA з фіксованим FcRnECDHis-B2M-BIO при pH 6,0 і 7,4. Як негативний контроль на зв'язування FcRn при pH 6,0 використовували IgG1-7D8-I235A/H310A/H435A (нокаут FcRn); а як контроль на посилення зв'язування FcRn при pH 7,4 використовували IgG1-7D8-M252Y/S254T/T256E.

На Фіг. 22 представлено аналіз ADCC із вивільнення хрому на клітинах WIL2-S SF як мішенях й PBMCs людини (3 донори) як ефektorних клітинах (співвідношення E:T = 100:1) у безсировоточному середовищі з додаванням очищеного C1q людини й без нього. За відсутності та у присутності C1q позначені хромом клітини WIL2-S SF інкубували за різних концентрацій антитіл для порівняння активності ADCC в IgG1-7D8-F405L-K326W/E333S/E430G з такою в IgG1-7D8-E430G і IgG1-7D8 дикого типу (WT). Як негативний контроль використовували неспецифічне антитіло IgG1-b12.

На Фіг. 23 представлений вплив K326W/E333S/E430G на агоністичну активність антитіл IgG1-hDR5-01-G56T IgG1-hDR5-05 проти DR5 на суспензії клітин WIL2-S SF при визначенні методом 24-годинного аналізу життєздатності (CellTiterGlo).

На Фіг. 24 представлений вплив комплементарної пари мутацій K439E, S440K в Fc на агоністичну активність націленої на два епітопа комбінації антитіл IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G проти DR5 на суспензії клітин WIL2-S SF при визначенні методом 24-годинного аналізу життєздатності (CellTiterGlo).

На Фіг. 25 представлені результати аналізу CDC на клітинах Wien 133 при тестуванні варіантів антитіла IgG1-Campath з посилюючими гексамеризацію мутаціями E430G або K248E/T437R і з посилюючими гексамеризацію мутаціями K248E/T437R у комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S. Клітини Wien 133 інкубували за різних концентрацій варіантів антитіл у присутності 20 % об'єднаної нормальної сироватки людини (NHS).

На Фіг. 26 представлений вплив комбінування посилюючої гексамеризацію мутації E430G і посилюючих зв'язування C1q мутацій K326W/E333S на дію антитіла IgG1-DR4-chCTB007 проти DR4 на адгезовані ракові клітини BxPC-3 підшлункової залози людини при визначенні методом 3-денного аналізу життєздатності (CellTiter-Glo).

На Фіг. 27 представлений аналіз CDC на В-лімфоцитах WIL2-S SF людини з варіантами антитіл проти FAS IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-APO1 (B) і IgG1-CD95-HFE7A (C) у присутності 20% нормальної сироватки людини. Клітини WIL2-S SF інкубували протягом 45 хв. за різних концентрацій варіантів антитіл у присутності 20 % об'єднаної нормальної сироватки людини (NHS). Як незв'язувальне контрольне антитіло використовували IgG1-b12.

На Фіг. 28 представлений 45-хвилинний аналіз життєздатності (CellTiter-Glo) на клітинах WIL2-S SF при інкубації з варіантами антитіл проти FAS IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-APO1 (B) і IgG1-CD95-HFE7A (C) у безсировоточному середовищі без C1q.

На Фіг. 29 представлений 24-годинний аналіз життєздатності (CellTiter-Glo) на клітинах WIL2-S SF з варіантами антитіл проти FAS IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-APO1 (B) і IgG1-CD95-HFE7A (C) у безсировоточному середовищі з використанням C1q як зшиваючого засобу.

На Фіг. 30 представлений 24-годинний аналіз життєздатності (CellTiter-Glo) на клітинах WIL2-S SF при інкубації з варіантами антитіл проти FAS IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-APO1 (B) і IgG1-CD95-HFE7A (C) у безсировоточному середовищі без C1q.

На Фіг. 31 представлена активність антитіл IgG1-CD134-SF2 (WT), IgG1-CD134-SF2-E345R, IgG1-CD134-SF2-E430G і IgG1-CD134-SF2-K326W/E333S/E430G при аналізі з репортером OX40 Jurkat. Клітини Jurkat Thaw-and-Use GloResponse NFkB-luc2/OX40 інкубували протягом 5 годин за різних концентрацій антитіл у присутності 8 % фетальної телячої сироватки. Реєстрували

сигнали OX40 по люмінесценції, детектованій після стимуляції OX40 антитілами проти OX40, які індукують експресію репортерного гена люциферази. RLU: відносні одиниці люмінесценції.

На Фіг. 32 представлений вплив посилюючої Fc-Fc мутації E430G у комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S в IgG1-CD40-SGN40 і IgG1-CD40-CP870893 на сигнали CD40. Клітини Jurkat Thaw-and-Use Gloresponse NFκB-luc2/CD40 інкубували протягом 5 годин за різних концентрацій антитіл у присутності 8 % фетальної телячої сироватки. Реєстрували сигнали CD40 з люмінесценції, детектованої після стимуляції CD40 антитілами проти CD40 або лігандами CD40, які індукують експресію репортерного гена люциферази. RLU: відносні одиниці люмінесценції.

На Фіг. 33 представлений вплив посилюючої Fc-Fc мутації E430G у комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S в IgG1-CD137-MOR7480 і IgG1-BMS-663513 на сигнали 4-1BB. Клітини Jurkat Thaw-and-Use Gloresponse NFκB-luc2/4-1BB інкубували протягом 5 годин за різних концентрацій антитіл у присутності 1% фетальної телячої сироватки. Реєстрували сигнали 4-1BB з люмінесценції, детектованої після стимуляції 4-1BB антитілами проти 4-1BB або лігандами 4-1BB з антитілом проти His, які індукують експресію репортерного гена люциферази. Як негативний контроль використовували IgG-b12-K326W/E333S/E430G. RLU: відносні одиниці люмінесценції.

На Фіг. 34 представлений вплив посилюючої Fc-Fc мутації E430G у комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S в IgG1-GITR-INCAGN01876 на сигнали GITR. Клітини Jurkat Thaw-and-Use Gloresponse NFκB-luc2/GITR інкубували протягом 5 годин за різних концентрацій антитіл у присутності 1 % фетальної телячої сироватки. Реєстрували сигнали GITR з люмінесценції, детектованої після стимуляції GITR антитілами проти GITR, які індукують експресію репортерного гена люциферази. RLU: відносні одиниці люмінесценції.

На Фіг. 35 представлений вплив посилюючої Fc-Fc мутації E430G у комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S в антитіл GITR-36E5 підкласів IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4 на сигнали GITR. Клітини Jurkat Thaw-and-Use Gloresponse NFκB-luc2/GITR інкубували протягом 6 годин з кінцевою концентрацією антитіл 111 нг/мл у присутності 1 % фетальної телячої сироватки. Реєстрували сигнали GITR з люмінесценції, детектованої після стимуляції GITR антитілами проти GITR, які індукують експресію репортерного гена люциферази. Як незв'язуючий контроль використовували антитіло IgG1-b12. RLU: відносні одиниці люмінесценції.

Розкриття сутності винаходу

При описі втілень винаходу для ясності буде застосовуватися специфічна термінологія. Однак винахід не повинний обмежуватися обраними при цьому специфічними термінами, і треба розуміти, що кожний конкретний термін включає всі технічні еквіваленти, які працюють аналогічним чином для досягнення аналогічної мети.

Визначення

Термін “вихідний поліпептид” або “вихідне антитіло” слід розуміти як поліпептид або антитіло, яке є ідентичним до поліпептиду або антитілу запропонованого винаходом, але при цьому вихідний поліпептид або вихідне антитіло не має посилюючої Fc-Fc мутації й посилюючої зв'язування C1q мутації відповідно до даного винаходу.

Термін “поліпептид, який містить Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування” у контексті даного винаходу відноситься до поліпептидів, що містять Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування, яка здатна зв'язуватися з будь-якою молекулою типу поліпептиду, який, наприклад, перебуває на клітині, бактерії або віріоні. Fc-область імуноглобуліну визначається як фрагмент антитіла, який звичайно утворюється після розщеплення антитіла папаїном (як відомо фахівцям у даній галузі), який включає дві області C_H2-C_H3 імуноглобуліну й сполучну ділянку, наприклад, шарнірну ділянку. Константний домен важкого ланцюга антитіла визначає ізотип антитіла, наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD або IgE. Fc-область опосередковує ефекторні функції антитіл разом з рецепторами на клітинній поверхні, які називаються Fc-рецепторами, і білками системи комплементу. Ділянка зв'язування може бути поліпептидною послідовністю типу білка, білкового ліганда, рецептора, антигензв'язувальної ділянки або ліганд-зв'язувальної ділянки, здатної зв'язуватися із клітиною, бактерією або віріоном. Якщо ділянка зв'язування, наприклад, є рецептором, то “поліпептид, який містить Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування” може бути отриманий у вигляді злитого білка Fc-області імуноглобуліну й даної ділянки зв'язування. Якщо ділянка зв'язування є антигензв'язувальною ділянкою, то “поліпептид, який містить Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування” може бути антитілом типу химерного, гуманізованого або людського антитіла або ж тільки важким ланцюгом антитіла або злиттям scFv-Fc. Поліпептид, який містить Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування, звичайно містить і сполучну ділянку,

наприклад, шарнірну ділянку, і дві області C_{H2} - C_{H3} важкого ланцюга імуноглобуліну, тому “поліпептид, який містить Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв’язування” може бути “поліпептидом, який містить як мінімум Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв’язування”. Термін “Fc-область імуноглобуліну” у контексті даного винаходу означає, що присутня сполучна ділянка, наприклад, шарнірна, залежно від підтипу антитіла, і області C_{H2} і C_{H3} імуноглобуліну, наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgM, або IgE людини. Джерело походження поліпептиду не обмежується людиною, а може бути будь-якого походження типу, наприклад, миші або яванського макака. Термін “Fc-область дикого типу” у контексті даного винаходу означає Fc-область імуноглобуліну з такою амінокислотною послідовністю, яка зустрічається в природі.

Термін “шарнірна ділянка” у даному винаході служить для позначення шарнірної ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну. Так, наприклад, шарнірна ділянка антитіла IgG1 людини відповідає амінокислотам 216-230 згідно нумерації EU.

Термін “область C_{H2} ” або “домен C_{H2} ” у даному винаході служить для позначення області C_{H2} важкого ланцюга імуноглобуліну. Так, наприклад, область C_{H2} антитіла IgG1 людини відповідає амінокислотам 231-340 згідно нумерації EU. Однак область C_{H2} також може бути кожним з інших підтипів, як описано тут.

Термін “область C_{H3} ” або “домен C_{H3} ” у даному винаході служить для позначення області C_{H3} важкого ланцюга імуноглобуліну. Так, наприклад, область C_{H3} антитіла IgG1 людини відповідає амінокислотам 341-447 згідно нумерації EU. Однак область C_{H3} також може бути кожним з інших підтипів, як описано тут.

Термін “імуноглобулін” відноситься до класу структурно споріднених глікопротеїнів поліпептидних ланцюгів, що складаються із двох пар: однієї пари легких (L) низькомолекулярних ланцюгів і однієї пари важких (H) ланцюгів, причому всі чотири потенційно зв’язані між собою дисульфідними містками. Структура імуноглобулінів добре вивчена, наприклад, див. *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Коротко, кожний важкий ланцюг зазвичай складається з варіабельної області важкого ланцюга (скорочено V_H) і константної області важкого ланцюга (C_H). Константна область важкого ланцюга зазвичай складається із трьох доменів: C_{H1} , C_{H2} і C_{H3} . Важкі ланцюги з’єднуються між собою дисульфідними зв’язками в так званій “шарнірній ділянці”. Кожний легкий ланцюг зазвичай складається з варіабельної області легкого ланцюга (скорочено V_L) і константної області легкого ланцюга (C_L). Константна область легкого ланцюга зазвичай складається з одного домена C_L . Области V_H і V_L можуть ще підрозділятися на ділянки гіперваріабельності (або гіперваріабельні ділянки, які можуть бути гіперваріабельними за послідовністю й/або за формою структурно визначених петель), які також називаються ділянками, що визначають комплементарність (CDR), які перемежуються з більш консервативними ділянками, які називаються каркасними ділянками (FR). Кожний V_H і V_L звичайно складається із трьох CDR і чотирьох FR, що розташовуються від N-кінця до C-кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (також див. Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). Якщо не зазначено інакшого або це не суперечить контексту, послідовності CDR ідентифікуються тут відповідно до правил IMGT за допомогою DomainGapAlign (Lefranc MP., *Nucleic Acids Research* 1999, 27:209-212; і Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P., *Nucleic Acids Res.*, 38, D301-307 (2010); а також див. [http-адреса в Інтернет: www.imgt.org/](http://www.imgt.org/). Якщо не зазначено іншого або це не суперечить контексту, положення амінокислот в Fc-області/ Fc-домени в даному винаході приводяться згідно нумерації EU (Edelman et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1969 May, 63(1):78-85; Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest*. 5th Edition – 1991 NIH Publication No. 91-3242).

Термін “антитіло” (Ab) у контексті даного винаходу відноситься до молекул імуноглобулінів, фрагментів молекул імуноглобулінів або похідним тих та інших, які мають здатність до специфічного зв’язування з антигеном. Антитіло згідно даного винаходу містять Fc-домен імуноглобуліну й антигензв’язувальну ділянку. Антитіло звичайно містить дві області C_{H2} - C_{H3} і сполучну ділянку, наприклад, шарнірну ділянку, наприклад, щонайменше Fc-домен. Таким чином, антитіло згідно даного винаходу може містити Fc-область і антигензв’язувальну ділянку. Варіабельні області важких і легких ланцюгів молекул імуноглобуліну містять зв’язувальний домен, який взаємодіє з антигеном. Константні або “Fc”-області антитіл можуть опосередковувати зв’язування імуноглобуліну із тканинами або факторами хазяїна, включаючи різні клітини імунної системи (наприклад ефекторні клітини) і компонента системи комплементу типу C1q, першого компонента в класичному шляху активації комплементу. Антитіла також можуть бути поліспецифічними типу біспецифічних антитіл або подібних молекул. Термін “біспецифічне антитіло” відноситься до антитіл, які мають специфічність щонайменше до двох різних, як правило таких, що неперекриваються епітопів. Такі епітопи можуть перебувати на

одній і тій же або на різних мішенях. Якщо епітопи перебувають на різних мішенях, такі мішені можуть бути на тих самих клітинах або на різних клітинах або типах клітин. Як вказано вище, якщо не зазначено інакшого або це явно не суперечить контексту, термін антитіло при цьому включає фрагменти антитіл, які містять щонайменше частину Fc-області й зберігають здатність до специфічного зв'язування з антигеном. Такі фрагменти можуть бути отримані будь-якими відомими методами типу методів ферментативного розщеплення, синтезу пептидів і рекомбінантної експресії. Було показано, що антигензв'язувальна функція антитіл може виконуватися фрагментами повнорозмірних антитіл. Приклади зв'язувальних фрагментів, які охоплюються терміном "Ab" або "антитіло", включають, без обмеження, моновалентні антитіла (описані в WO 2007/059782 від Genmab); антитіла з важких ланцюгів, які складаються тільки із двох важких ланцюгів, і які зустрічаються в природі, наприклад, у верблюдів (наприклад, Hamers-Casterman (1993) Nature 363: 446); ThioMabs (Roche, WO 2011/069104); сконструйовані шляхом обміну ниток домени (SEED або Seed-bodies), які є асиметричними й біспецифічними антитілоподібними молекулами (Merck, WO 2007/110205); Triomabs (Pharma/Fresenius Biotech, Lindhofer et al., 1995, J Immunol. 155:219; WO 2002/020039); FcΔAdp (Regeneron, WO 2010/151792), асиметричний каркас (Zymeworks/Merck, WO 2012/058768), mAb-Fv (Xencor, WO 2011/028952), Xmap (Xencor), імуноглобуліни з подвійними варіабельними доменами (Abbott, DVD-ig, U.S. Patent No. 7,612,181); антитіла з подвійними доменами й двома голівками (Unilever; Sanofi Aventis, WO 2010/0226923), ди-диатіла (ImClone/Eli Lilly), антитіла у форматі "knobs into holes" (Genentech, WO 98/50431); DuoBody (GenMab, WO 2011/131746); біспецифічні IgG1 і IgG2 (Pfizer/Rinat, WO 11/143545), DuetMab (MedImmune, US 2014/0348839), антитіла у форматі «electrostatic steering» (Amgen, EP 1870459 і WO 2009/089004; Chugai, US 2010/00155133; Oncomed, WO 2010/129304A); біспецифічні IgG1 і IgG2 (Rinat Neurosciences Corporation, WO 11/143545), CrossMAbs (Roche, WO 2011/117329), LUZ-Y (Genentech), bioclonic (Merus, WO 2013/157953), антитіла з подвійними доменами націлювання (GSK/Domantis), антитіла типу два в одному або Fabs подвійної дії, які розпізнають дві мішені (Genentech, Novimmune, Adimab), перехресно зшиті Mabs (Karmanos Cancer Center), ковалентно злиті mAbs (AIMM), CovX-bodies (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen Ilag), DutaMabs (Dutalys/Roche), iMabs (MedImmune), IgG-подібні біспецифічні (ImClone/Eli Lilly; Shen J. et al., J Immunol Methods, 2007, 318(1-2): 65-74), TIG-bodies, DIG-bodies і PIG-bodies (Pharmabacine), молекули з подвійною спорідненістю і перенацілюванням (Fc-DART або Ig-DART фірми Macrogenics, WO 2008/157379, WO 2010/080538), BEAT (Glenmark), Zybodies (Zyngenia), підходи із спільним легким ланцюгом (Crucell/Merus, US 7262028) або зі спільними важкими ланцюгами (κλBodies фірми NovImmune, WO 2012/023053), також злиті білки, що містять поліпептидну послідовність, злику з фрагментом антитіла, який містить Fc-область, типу злитих scFv, як від BsAb від ZymoGenetics/BMS, HERCULES від Biogen Idec (US 007951918), SCORPIONS від Emergent BioSolutions/Trubion і Zymogenetics/BMS, Ts2Ab (MedImmune/AZ (Dimasi N. et al., J Mol. Biol., 2009, 393(3): 672-92), злиття scFv від Genetech/Roche, злиті scFv фірми Novartis, злиті scFv від Immunomedics, злиті scFv від Changzhou Adam Biotech Inc. (CN 102250246), TvAb фірми Roche (WO 2012/025525, WO 2012/025530), mAb² фірми f-Star (WO 2008/003116) і подвійні злиття scFv. Також слід мати на увазі, що термін антитіло, якщо не зазначено іншого, включає й поліклональні антитіла, моноклональні антитіла (наприклад людські моноклональні антитіла), суміші антитіл (рекомбінантних поліклональних), наприклад, отримані за технологією фірм SympHogen і Merus (Oligoclomics), мультимерні Fc-білки, які описані в WO 2015/158867, злиті білки, описані в WO 2014/031646, і антитілоподібні поліпептиди типу химерних антитіл і гуманізованих антитіл. Отримані антитіла потенційно можуть мати будь-який ізотип.

Термін "повнорозмірне антитіло" у даному винаході відноситься до таких антитіл (наприклад, вихідних антитіл), які містять усі константні й варіабельні домени важких і легких ланцюгів, що відповідають тим, які звичайно зустрічаються в антитілах дикого типу цього ізотипу.

Термін "людське антитіло" у даному винаході охоплює такі антитіла, у яких варіабельні й константні області походять із послідовностей імуноглобуліну людини «зародкової лінії». Людські антитіла відповідно до винаходу можуть включати амінокислотні залишки, які не кодовані послідовностями імуноглобуліну людини «зародкової лінії» (наприклад, мутації, вставки або делеції, введені при випадковому або сайт-специфічному мутагенезі in vitro або при соматичних мутаціях in vivo). Однак термін "людське антитіло" у даному винаході не повинен охоплювати антитіла, у яких на каркасні послідовності людини були прищені послідовності CDR зародкової лінії, джерелом походження якої є інший вид ссавців, типу миші.

Термін "химерне антитіло" у даному винаході відноситься до таких антитіл, у яких обидва типи ланцюгів, тобто важкий ланцюг і легкий ланцюг, є химерними в результаті інженерії

антитіл. Химерним є такий ланцюг, який містить чужорідний варіабельний домен (джерелом походження якого є відмінний від людини вид, або ж синтетичний або отриманий з будь-якого виду, включаючи людину), з'єднаний з константною областю людського походження.

Термін “гуманізоване антитіло” у даному винаході відноситься до таких антитіл, у яких обидва типи ланцюгів є гуманізованими в результаті інженерії антитіл. Гуманізованим зазвичай є такий ланцюг, у якого ділянки (CDR) варіабельних доменів, які визначають комплементарність є чужорідними (джерелом походження яких є відмінний від людини вид, або ж які є синтетичними), тоді як інша частина ланцюга має людське походження. Оцінка гуманізації ґрунтується на отриманій амінокислотній послідовності, а не на методології як такий, що дозволяє використовувати інші методики, відмінні від пересадження.

Терміни “моноклональне антитіло”, “моноклональне Ab”, “композиція моноклонального антитіла”, “mAb” і подібні до них у даному винаході відноситься до препаратів молекул Ab одного молекулярного складу. Композиція моноклонального антитіла проявляє єдину специфічність зв'язування й спорідненість до певного епітопу. Відповідно, термін “моноклональне антитіло людини” відноситься до Abs, які проявляють єдину специфічність зв'язування, у яких варіабельні й константні області походять із гаметних послідовностей імунoglobуліну людини. Людські mAbs можуть вироблятися гібридомою, яка включає B-клітини, отримані від трансгенної або транскромосомної тварини, а не людини, типу трансгенної миші, у якої геном містить трансгенний репертуар важкого ланцюга й трансгенний репертуар легкого ланцюга людини, переналаштований на вироблення функціонального людського антитіла й злитий з іморталізованою клітиною.

Термін “ізотип” у даному винаході відноситься до класу імунoglobуліну (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE, або IgM) або їх алотипів, таких як IgG1m(za) і IgG1m(f), які кодуються генами константної області важкого ланцюга. Крім того, кожний ізотип важкого ланцюга може комбінуватися з легким ланцюгом каппа (κ) або лямбда (λ). Термін “змішаний ізотип” у даному винаході відноситься до Fc-області імунoglobуліну, отриманої при комбінуванні структурних особливостей одного ізотипу з аналогічною областю з іншого ізотипу, при цьому утворюється гібридний ізотип. Змішаний ізотип може містити Fc-область, послідовність якої складається із двох або декількох ізотипів, обраних з поміж IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE, або IgM, при цьому утворюються такі комбінації, наприклад, як IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4 або IgG1/IgA.

Термін “антигензв'язувальна ділянка”, “ділянка зв'язування антигену”, “зв'язувальна ділянка” або “антигензв'язувальний домен” у даному винаході відноситься до тієї області антитіла, яка здатна зв'язуватися з антигеном. Ця зв'язувальна ділянка зазвичай визначається доменами VH і VL антитіла, які можуть ще підрозділятися на ділянки гіперваріабельності (або гіперваріабельні ділянки, які можуть бути гіперваріабельними за послідовністю й/або за формою структурно визначених петель), які також називаються ділянками, що визначають комплементарність (CDR), які перемешовуються з більш консервативними ділянками, які називаються каркасними ділянками (FR). Антигеном може бути будь-яка молекула типу поліпептиду, яка перебуває, наприклад, на клітині, бактерії або віріоні.

Термін “мішень” у даному винаході відноситься до молекул, з якими зв'язується антигензв'язувальна ділянка антитіла. Мішень включає будь-які антигени, проти яких виробляються дані антитіла. Терміни “антиген” і “мішень” стосовно антитіл можуть застосовуватися як взаємозамінні й мати ті самі значення й цілі відносно будь-яких аспектів або втілень даного винаходу.

Термін “епітоп” означає білкову детермінанту, яка здатна специфічно зв'язуватися з варіабельним доменом антитіла. Епітопи зазвичай складаються з таких поверхневих груп молекул, як амінокислоти, бічні ланцюги сахаридів або їх комбінації, і зазвичай мають специфічні тривимірні структурні характеристики, а також специфічні характеристики заряду. Конформаційні й неконформаційні епітопи відрізняються тим, що зв'язок з першими, але не з останніми, втрачається в присутності денатуруючих розчинників. Епітоп може містити амінокислотні залишки, які безпосередньо брати участь у зв'язуванні (які також називають імунодомінантним компонентом епітопа), та інші амінокислотні залишки, які не беруть участь безпосередньо у зв'язуванні.

“Антитіло” або “варіант антитіла” або “варіант вихідного антитіла” у даному винаході означає молекулу антитіла, яка містить одну або кілька мутацій у порівнянні з “вихідним антитілом”. Різні терміни можуть застосовуватися як взаємозамінні й мають ті самі значення й цілі відносно будь-яких аспектів або втілень даного винаходу. Типові формати вихідних антитіл включають, без обмеження, антитіла дикого типу, повнорозмірні антитіла або Fc-вмісні фрагменти антитіл, біспецифічні антитіла, людські антитіла, гуманізовані антитіла, химерні антитіла або їх

комбінації. Аналогічним чином “поліпептид” або “варіант поліпептиду, що містить Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування” або “варіант вихідного поліпептиду, який включає Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування”, у даному винаході означає такий “поліпептид, який містить Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування”, який містить одну або кілька мутацій у порівнянні з “вихідним поліпептидом, що містить Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування”. Різні терміни можуть застосовуватися як взаємозамінні й мають ті самі значення й цілі відносно будь-яких аспектів або втілень даного винаходу. При амінокислотних замінах нативні амінокислоти можуть замінятися на інші амінокислоти, які зустрічаються в природі, або на похідні, які не зустрічаються в природі, амінокислот. Амінокислотні заміни можуть бути консервативними або не консервативними. У контексті даного винаходу консервативні заміни можуть визначатися як заміни в межах класів амінокислот, наведених в одній або декількох з наступних трьох таблиць.

Класи амінокислотних залишків для консервативних замін

Кислі залишки	Asp (D) i Glu (E)
Основні залишки	Lys (K), Arg (R) i His (H)
Гідрофільні незаряджені залишки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) i Gln (Q)
Аліфатичні незаряджені залишки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) i Ile (I)
Неполярні незаряджені залишки	Cys (C), Met (M) i Pro (P)
Ароматичні залишки	Phe (F), Tyr (Y) i Trp (W)

Альтернативні класи консервативних замін амінокислотних залишків

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

Альтернативні фізичні й функціональні класифікації амінокислотних залишків

Залишки, які містять спиртові групи	S i T
Аліфатичні залишки	I, L, V i M
Циклоалкеніл-зв'язані залишки	F, H, W i Y
Гідрофобні залишки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W i Y
Негативно заряджені залишки	D i E
Полярні залишки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S i T
Позитивно заряджені залишки	H, K i R
Невеликі залишки	A, C, D, G, N, P, S, T i V
Дуже маленькі залишки	A, G i S
Залишки, які беруть участь у формуванні витків	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P i T
Гнучкі залишки	Q, T, K, S, G, N, D, E i R

У контексті даного винаходу заміни у варіантів позначаються так:

вихідна амінокислота – положення – амінокислота, яка її замінює;

використовується трибуквений код або однобуквений код, включаючи коди Хаа і Х для позначення амінокислотних залишків. Відповідно, позначення “E345R” або “Glu345Arg” означає, що варіант містить заміну глутамінової кислоти на аргінін у положенні амінокислоти у варіанта, яке відповідає положенню 345 амінокислоти у вихідного антитіла.

Якщо положення як таке відсутнє в антитілі, але варіант містить вставку амінокислоти, то це позначається, наприклад, так:

положення – амінокислота, яка її замінює, наприклад, “448E”.

Такі позначення особливо актуальні у зв'язку з модифікаціями в серії гомологічних поліпептидів або антитіл.

Точно так само, коли ідентичність замінюючого амінокислотного залишку не важлива:

вихідна амінокислота – положення, наприклад, “E345”.

Для модифікацій, при яких вихідна амінокислота й/або амінокислота, яка її заміняє, може містити більше однієї, але не всі амінокислоти, у контексті винаходу заміна глутамінової кислоти на аргінін, лізин або триптофан у положенні 345 може рівнозначно бути позначена як:

“Glu345Arg,Lys,Trp” або “E345R,K,W” або “E345R/K/W” або “E345 на R, K або W”.

Крім того, термін “заміна” охоплює заміни на будь-які з інших дев'ятнадцяти природних амінокислот або на інші амінокислоти типу неприродних амінокислот. Наприклад, заміна амінокислоти Е у положенні 345 включає кожну з наступних заміни: 345А, 345С, 345D, 345G, 345H, 345F, 345I, 345K, 345L, 345M, 345N, 345P, 345Q, 345R, 345S, 345T, 345V, 345W і 345Y. Це є еквівалентним до позначення 345Х, де Х означає будь-яку амінокислоту. Ці заміни також можуть бути позначені як E345A, E345C тощо, або ж E345A,C тощо, або ж E345A/C/ тощо. Те ж саме відноситься за аналогією до всіх наведених тут положень, конкретно охоплюючи будь-які з таких заміни.

У даному винаході термін “ефекторна клітина” відноситься до таких імунних клітин, які беруть участь в ефекторній фазі імунної відповіді, на відміну від фаз розпізнавання й активації імунної відповіді. Типові імунні клітини включають клітини мієлоїдного або лімфоїдного походження, наприклад, лімфоцити (наприклад В-клітини й Т-клітини, включаючи цитолітичні Т-клітини (CTL)), клітини-кілери, природні клітини-кілери, макрофаги, моноцити, еозинофіли, поліморфно-ядерні клітини, наприклад нейтрофіли, гранулоцити, гладкі клітини й базофіли. Деякі ефекторні клітини експресують Fc-рецептори (FcR) або рецептори комплементу й виконують специфічні імунні функції. У деяких втіленнях такі ефекторні клітини, наприклад, як клітини природних кілерів, здатні індукувати ADCC. Наприклад, моноцити, макрофаги, нейтрофіли, дендритні клітини й купферовські клітини, які експресують FcR, беруть участь у специфічному знищенні клітин мішені й презентації антигенів іншим компонентам імунної системи або у зв'язуванні із клітинами, які презентують антигени. У деяких втіленнях ADCC може ще більше посилюватися за умови класичної активації комплементу, що запускається антитілами, призводячи до відкладання активованих фрагментів C3 на клітинах мішені. Продуктами розщеплення C3 є ліганди рецепторів комплементу (CR) типу CR3, які експресуються на мієлоїдних клітинах. Розпізнавання фрагментів комплементу рецепторами CR на ефекторних клітинах може сприяти посиленню опосередкованої Fc-рецепторами ADCC. У деяких втіленнях класична активація комплементу, яка запускається антитілами, призводить до утворення фрагментів C3 на клітинах мішені. Ці продукти розщеплення C3 можуть безпосередньо сприяти комплемент-залежній клітинній цитотоксичності (CDCC). У деяких втіленнях ефекторні клітини можуть піддавати фагоцитозу антиген мішені, частки мішені або клітини мішені. Експресія певних FcR або рецепторів комплементу на ефекторних клітинах може регулюватися такими гуморальними факторами, як цитокіни. Наприклад, було виявлено, що експресія FcγRI підвищується γ-інтерфероном (IFN-γ) і/або G-CSF. Це посилення експресії підвищує цитотоксичну активність клітин, які несуть FcγRI, проти мішеней. Ефекторні клітини можуть піддавати фагоцитозу цільовий антиген або фагоцитувати або лізувати клітини мішені. У деяких втіленнях класична активація комплементу, що запускається антитілами, призводить до утворення фрагментів C3 на клітинах мішені. Ці продукти розщеплення C3 можуть безпосередньо спричиняти фагоцитоз у ефекторних клітин або опосередковано шляхом посилення спричиненого антитілами фагоцитозу.

Термін “Fc-ефекторні функції” у даному винаході служить для позначення таких функцій, які є наслідком зв'язування поліпептиду або антитіла зі своєю мішенню типу антигену на клітинній мембрані, причому Fc-ефекторні функції відносяться до Fc-області поліпептиду або антитіла. Приклади Fc-ефекторних функцій включають (i) зв'язування C1q, (ii) активацію комплементу, (iii) комплемент-залежну цитотоксичність (CDC), (iv) антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC), (v) зв'язування з Fcγ-рецептором, (vi) антитілозалежний клітинний фагоцитоз (ADCP), (vii) комплемент-залежну клітинну цитотоксичність (CDCC), (viii) посилення цитотоксичності комплементом, (ix) опосередковане антитілом зв'язування з рецептором комплементу опсонізованого антитіла, (x) опсонізацію й (xi) комбінації будь-яких з (i)-(x).

Термін “залежні від кластеризації функції” у даному винаході служить для позначення функцій, які є наслідком утворення комплексів антигену після олігомеризації поліпептидів або антитіл, зв'язаних зі своїми антигенами, необов'язково на клітинах, клітинних мембранах, на віріонах або на інших частках. Приклади залежних від кластеризації ефекторних функцій включають: (i) утворення олігомерів антитіл, (ii) стабільність олігомерів антитіл, (iii) утворення олігомерів антигену, (iv) стабільність олігомерів антигену, (v) індукцію апоптоза, (vi) модуляцію проліферації типу зниження, інгібування або стимуляції проліферації й (vii) комбінації будь-яких з (i)-(vi).

Термін “агоністичний” у даному винаході слід розуміти як стимуляцію або активацію рецептора на клітинній мембрані, що приводить до біологічної відповіді типу внутрішньоклітинної передачі сигналів. Такий агоністичний ефект може призвести до індукції апоптоза (запрограмованої смерті клітин) або активації імунних клітин або активації внутрішньоклітинного шляху.

Агоністична активність або підвищена агоністична активність може бути визначена методом аналізу життєздатності для антитіл, націлених на мішені, які експресують домен внутрішньоклітинної смерті, як описано в прикладі 2, згідно наступних стадій:

i) посіяти лінію клітин, які експресують мішень, відповідну до антитіла, наприклад, DR5 у полістироловому плоскодонному 96-комірковому планшеті протягом ночі при 37 °C,

ii) додати серійні розбавлення антитіла, наприклад, антитіла проти DR5 у діапазоні від 0,0003 до 20000 нг/мл і інкубувати протягом 3 днів при 37 °C,

iii) визначити життєздатність клітин шляхом визначення наявності АТФ, наприклад, методом люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo,

iv) розрахувати життєздатність клітин за наступною формулою: % життєздатних клітин = [(люмінесценція зразка з антитілом – люмінесценція зразка зі стауроспорином)/(люмінесценція зразка без антитіла – люмінесценція зразка зі стауроспорином)]×100.

Агоністична активність або підвищена агоністична активність може бути визначена репортерним методом для антитіл, націлених на мішені, які активують внутрішньоклітинний сигнальний шлях, як описано в прикладах 29, 30, 31 і 32, на наступних стадіях:

i) посіяти клітини Jurkat, стабільно трансфіковані мішенню, наприклад, OX40, 4-1BB, CD40 або GITR і які експресують репортерний ген люцифери низше від елемента відгуку NFAT, і інкубувати клітини в плоскодонному 96-комірковому планшеті протягом ночі при 37 °C,

ii) додати серійні розбавлення антитіла, наприклад, антитіла проти OX49, проти 4-1BB, проти CD40 або проти GITR у діапазоні, наприклад, від 19,5 до 5000 нг/мл, і інкубувати протягом 5 год.,

iii) додати субстрат люцифери світлячка (5'-фторлюциферин) до клітин і інкубувати протягом 5-10 хв.,

iv) визначити люмінесценцію на зчитувальному обладнанні Envision Multilable Plate reader.

Термін “вектор” у даному винаході служить для позначення молекул нуклеїнової кислоти, здатних індукувати транскрипцію сегмента нуклеїнової кислоти, вставленого у вектор. Одним з типів вектора є “плазмід”, яка має вигляд кільцевої дволанцюгової петлі ДНК. Іншим типом вектора є вірусний вектор, у якому сегмент нуклеїнової кислоти може бути вставлений у геном вірусу. Деякі вектори здатні до автономної реплікації в тих клітинах-хазяїнах, у які вони введені, наприклад, бактеріальні вектори з бактеріальним початком реплікації й епісомальні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад неепісомальні вектори ссавців) можуть вбудовуватися в геном клітини-хазяїна при введенні в клітини-хазяїни й при цьому реплікуватися разом з геномом хазяїна. Більше того, деякі вектори здатні направляти експресію генів, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори називаються тут “рекомбінантними експресійними векторами” (або просто “експресійними векторами”). Загалом, експресійні вектори, які можуть застосовуватися в методах рекомбінантної ДНК, найчастіше мають вигляд плазмід. У даному описі терміни “плазмід” і “вектор” можуть застосовуватися як взаємозамінні, тому що плазмід є формою вектора, яка найчастіше використовується. Однак даний винахід повинен охоплювати й інші форми експресійних векторів типу вірусних векторів (типу дефектних за реплікацією ретровірусів, аденовірусів і аденоасоційованих вірусів), які виконують еквівалентні функції.

Термін “рекомбінантні клітини-хазяїни” (або просто “клітини-хазяїни”) у даному винаході служить для позначення клітин, у які був уведений експресійний вектор. Слід розуміти, що такі терміни служать не тільки для позначення клітин певного суб'єкта, але також і потомства таких клітин. Оскільки в наступних поколіннях можуть відбуватися певні модифікації внаслідок мутацій або впливу навколишнього середовища, то таке потомство фактично може й не бути ідентичним до вихідних клітин, але все-таки входить у рамки терміна “клітини-хазяїни” у даному винаході. Рекомбінантні клітини-хазяїни включають, наприклад, трансфектоми типу клітин CHO, клітин HEK-293, клітин PER.C6, NS0 і лімфоцитарних клітин, а також прокаріотичні клітини типу E. coli та інші еукаріотичні організми типу рослинних клітин і грибів.

Термін “трансфектома” у даному винаході включає рекомбінантні еукаріотичні клітини-хазяїни, які експресують Ab або цільовий антиген, типу клітин CHO, клітин PER.C6, NS0, клітин HEK-293, рослинних клітин або грибів, включаючи дріжджові клітини.

Термін “препарат” відноситься до препаратів варіантів антитіл і сумішей різних варіантів антитіл, які можуть мати підвищену здатність до утворення олігомерів при взаємодії з антигеном, асоційованим із клітинами (наприклад, з антигеном, експресованим на поверхні

клітин), клітинними мембранами, віріонами або іншими структурами, що може приводити до посилення передачі сигналів і/або активації їх антигеном.

У даному винаході термін “спорідненість” означає силу зв'язування однієї молекули, наприклад, антитіла, з іншою, наприклад, мішенню або антигеном, на тому самому сайті, типу

5 моновалентного зв'язування індивідуального антигензв'язувального сайту антитіла з антигеном.
У даному винаході термін “авідність” відноситься до об'єднаної сили зв'язування за декількома сайтами між двома структурами типу між декількома антигензв'язувальними сайтами антитіл, які одночасно взаємодіють з мішенню, або, наприклад, між антитілом і C1q. Коли є більше ніж одна взаємодія при зв'язуванні, дві структури будуть дисоціювати тільки тоді,

10 коли дисоціюють усі сайти зв'язування, тому швидкість дисоціації буде меншою, ніж у окремих сайтів зв'язування, забезпечуючи тим самим більш ефективну загальну міцність зв'язування (авідність) у порівнянні з міцністю зв'язування індивідуальних сайтів зв'язування (спорідненість).
У даному винаході термін “олігомер” відноситься до молекул, які складаються із більш ніж

15 одного, але обмеженого числа мономерних ланок (наприклад, антитіл), на відміну від полімеру, який, принаймні в принципі, складається з необмеженої кількості мономерів. Типовими олігомерами є димери, тримери, тетрамери, пентамери й гексамери. Для позначення кількості мономерних ланок в олігомерах часто використовуються грецькі префікси, наприклад, тетрамер складається із чотирьох ланок, а гексамер складається із шести ланок.
20 Термін “олігомеризація” у даному винаході служить для позначення процесу, при якому мономерні перетворюються до кінцевого ступеня полімеризації. При цьому відзначається, що поліпептиди, антитіла й/або інші димерні білки, які містять ділянки зв'язування з мішенню відповідно до винаходу, можуть утворювати олігомери типу гексамерів за допомогою нековалентної асоціації Fc-областей після зв'язування з мішенню, наприклад, на поверхні

25 клітини.
Термін “кластеризація” у даному винаході служить для позначення олігомеризації антитіл, поліпептидів, антигенів або інших білків за допомогою нековалентних взаємодій.

Термін “посилення Fc-Fc” у даному винаході служить для позначення підвищення міцності зв'язування або стабілізації взаємодії між Fc-областями двох антитіл або поліпептидів, які

30 містять Fc-області, для того, щоб поліпептиди утворювали олігомери при зв'язуванні з мішенню.
Заміни, які посилюють Fc-Fc в даному винаході відносяться до заміни у наступних положеннях, що відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU: E430, E345 або S440, за умови, що заміни в положенні S440 представлені S440Y або S440W. Так, заміни, які посилюють Fc-Fc, в даному винаході відносяться до наступних заміни амінокислот: E430G, E345K, E430S, E430F,

35 E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W і S440Y. У кращому втіленні заміни, які посилюють Fc-Fc, представлені E430G або E345K.
Термін “зв'язування C1q” у даному винаході служить для позначення прямої взаємодії між C1q і поліпептидом або антитілом. Пряме зв'язування з C1q можна оцінити, наприклад, за допомогою іммобілізованого на штучній поверхні антитіла (як описано в прикладах 4, 5 і 6).
40 Мультивалентна взаємодія, що приводить до високої авідності зв'язування C1q з олігомером антитіла, можна оцінити за зв'язуванням із заданим антигеном на поверхні клітин або віріонів.

Зв'язування C1q з поліпептидом або антитілом може бути визначене методом ELISA у наступних стадіях: i) покрити 96-комірковий планшет Microtiter ELISA за допомогою 1 мкг/мл поліпептиду або антитіла в 100 мкл PBS при 4 °C протягом ночі, ii) інкубувати планшет із серійними розбавленнями C1q по 100 мкл на комірку в діапазоні кінцевих концентрацій C1q 30-0,01 мкг/мл при 3-разових розбавленнях протягом 1 год. при 37 °C, iii) інкубувати планшет із кролячим антитілом проти C1q людини по 100 мкл на комірку протягом 1 год. за кімнатної температури, iv) інкубувати планшет з антитілом свині проти кролячого IgG-HRP по 100 мкл на комірку протягом 1 год. за кімнатної температури, v) інкубувати планшет із субстратом при 1

50 мг/мл 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти) по 100 мкл на комірку протягом 15 хв. за кімнатної температури, vi) зупинити реакцію додаванням 2% щавлевої кислоти по 100 мкл на комірку. Виміряти поглинання при 405 нм на зчитувальному обладнанні BioTek EL808 Microplate reader.
Термін “заміна із зв'язування C1q” у даному винаході служить для позначення таких заміни у поліпептидах, які містять Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування антигену, які посилюють пряму взаємодію з C1q. Посилення зв'язування C1q, наприклад, може привести до зниження EC₅₀ у взаємодії між C1q і поліпептидом, які містять Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування антигену, при вимірюванні відповідно до методу визначення зв'язування C1q, описаного вище.

У даному винаході термін “активація комплементу” відноситься до активації класичного шляху комплементу, яка запускається зв'язуванням великого макромолекулярного комплексу за назвою C1 з комплексами антитіло-антиген на поверхні. C1 є комплексом, який складається з 6 білків, які розпізнають C1q і гетеротетрамера серинових протеаз C1r2C1s2. C1 – це перший білковий комплекс на ранніх стадіях класичного каскаду комплементу, який включає ряд реакцій розщеплення, починаючи з розщеплення C4 на C4a і C4b і C2 на C2a і C2b. C4b відкладається й разом з C2a утворює ферментативно активну конвертазу, яка називається C3-конвертазою, яка розщеплює компонент комплементу C3 на C3b і C3a, який утворює C5-конвертазу. Ця C5-конвертаза розщеплює C5 в C5a і C5b, а останній компонент відкладається на мембрані й у свою чергу запускає пізні стадії активації комплементу, при яких кінцеві компоненти комплементу C5b, C6, C7, C8 і C9 збираються в комплекс мембранної атаки (MAC). Каскад комплементу приводить до утворення пор у клітинній мембрані, що викликає лізис клітини, також відомий як комплемент-залежна цитотоксичність (CDC). Активацію комплементу можна оцінити за ефективністю C1q, методами аналізу кінетики CDC (як описано в WO 2013/004842, WO 2014/ 108198) або методом клітинного відкладання C3b і C4b, описаним в Beurskens et al., April 1, 2012, vol. 188 no. 7, 3532-3541.

Термін “комплемент-залежна цитотоксичність” (“CDC”) у даному винаході служить для позначення процесу опосередкованої антитілами активації комплементу, що приводить до лізису клітин або віріонів при зв'язуванні антитіла зі своєю мішенню на клітинах або віріонах у результаті утворення пор у мембрані при складанні MAC.

Термін “антитілозалежна клітинна цитотоксичність” (“ADCC”) у даному винаході служить для позначення механізму знищення покритих антитілами клітин мішені або віріонів клітинами, які експресують Fc-рецептори, які розпізнають константну область антитіл, що зв'язалися. Термін “антитілозалежний клітинний фагоцитоз” (“ADCP”) у даному винаході служить для позначення механізму елімінації покритих антитілами клітин мішені або віріонів шляхом інтерналізації їх фагоцитами. Покриті антитілами інтерналізовані клітини мішені або віріони утримуються в пухирцях, які називаються фагосомами, які потім зливаються з однією або декількома лізосомами з утворенням фаголізосом. ADCP можна оцінити методом аналізу цитотоксичності *in vitro* з макрофагами як ефektorних клітин по відеомікроскопії, як описано в van Bij et al., Journal of Hepatology, Volume 53, Issue 4, October 2010, Pages 677-685.

Термін “комплемент-залежна клітинна цитотоксичність” (“CDCC”) у даному винаході служить для позначення механізму знищення клітин мішені або віріонів клітинами, які експресують рецептори комплементу, які розпізнають продукти розщеплення комплементу-3 (C3), ковалентно пов'язані із клітинами мішені або віріонами в результаті опосередкованої антитілами активації комплементу. CDCC можна оцінити в такий же спосіб, як описано для ADCC.

Термін “період напівжиття в плазмі” у даному винаході позначає час, необхідний для зниження концентрації поліпептиду в плазмі крові наполовину від його початкової концентрації під час елімінації (після фази розподілу). Для антитіл фаза розподілу зазвичай становить 1-3 дні, протягом яких концентрація в плазмі крові зменшується приблизно на 50% внаслідок перерозподілу між плазмою й тканинами. Період напівжиття в плазмі може бути визначений методами, добре відомими в даній галузі.

Термін “швидкість кліренсу із плазми” у даному винаході є кількісною мірою швидкості, з якого поліпептид видаляється із крові при введенні в живий організм. Швидкість кліренсу із плазми може бути розрахована як доза/AUC (мг/день/кг), причому значення AUC (площа під кривою) визначається за кривою концентрація-час.

Термін “кон'югат антитіло-лікарський засіб” у даному винаході означає антитіло або поліпептид, який містить Fc, що і який має специфічність щонайменше до одного типу злоякісних клітин, лікарський засіб і лінкер, що зв'язує лікарський засіб, наприклад, з антитілом. Лінкер розщеплюється або не розщеплюється в присутності злоякісних клітин, а кон'югат антитіло-лікарський засіб знищує злоякісні клітини.

Термін “захоплення кон'югата антитіло-лікарський засіб” у даному винаході означає процес, при якому кон'югати антитіло-лікарський засіб зв'язуються з мішенню на клітинах з наступним захопленням/поглинанням через клітинну мембрану й тим самим надходять у клітини. Захоплення кон'югата антитіло-лікарський засіб можна оцінити методом “аналізу опосередкованої антитілами інтерналізації й знищення клітин при ADC проти TF *in vitro*”, як описано в WO 2011/157741.

Термін “апоптоз” у даному винаході означає процес запрограмованої смерті клітин (PCD), який може відбуватися в клітинах. Біохімічні події приводять до характерних змін (морфології) і загибелі клітин. Ці зміни включають блебінг, зморщування клітин, фрагментацію ядра,

конденсацію хроматину й фрагментацію хромосомної ДНК. Зв'язування антитіл з певними рецепторами може викликати апоптоз.

Термін "запрограмована смерть клітин" або "PCD" у даному винаході означає загибель клітин у будь-якому вигляді, опосередковану внутрішньоклітинною програмою. Існують різні форми PCD, причому загальним у різних типів PCD є те, що вони запускаються активними клітинними процесами, які можуть бути перервані шляхом втручання у внутрішньоклітинну передачу сигналів. В одному конкретному втіленні прояв будь-якої форми PCD у клітинах або тканині можна визначити за фарбуванням клітин або тканини кон'югованим анексином V, що корелює з наявністю фосфатиділсерину.

Термін "анексин V" у даному винаході відноситься до білка із групи анексинів, який зв'язується з фосфатиділсерином (PS) на поверхні клітини.

Термін "FcRn" у даному винаході служить для позначення неонатального Fc-рецептора, який є рецептором Fc. Уперше він був виявлений у гризунів як унікальний рецептор, здатний транспортувати IgG з материнського молока через епітелій кишечника новонароджених гризунів у кровоток немовлят. Подальші дослідження виявили аналогічний рецептор у людей. Однак у людей він перебуває в плаценті, допомагаючи полегшити транспортування материнського IgG до зростаючого плода, а також було показано, що він відіграє роль у моніторингу відновлення IgG. FcRn зв'язує IgG при кислому pH 6,0-6,5, але не при нейтральному або більш високому pH. Тому FcRn може зв'язувати IgG із просвіту кишечника (усередині кишечника) при помірно кислому pH і забезпечувати ефективний односпрямований транспорт до базолатеральної сторони (всередину організму), де значення pH становить від нейтрального до лужного (pH 7,0-7,5). Цей рецептор також відіграє роль у збереженні IgG у дорослих внаслідок його знаходження на шляху ендоцитоза в ендотеліальних клітинах. Рецептори FcRn у кислих ендосомах зв'язуються з IgG, інтерналізованим за допомогою піноцитоза, повертаючи його на поверхню клітини й вивільняючи при лужному значенні pH крові, тим самим запобігаючи його деградації в лізосомах. Цей механізм може пояснити більший період напівжиття IgG у крові в порівнянні з іншими ізотипами.

Термін "білок A" у даному винаході служить для позначення поверхневого білка MSCRAMM в 56 кДа, спочатку виявленого в клітинній стінці бактерій *Staphylococcus aureus*. Він кодується геном *sra*, а його регуляція контролюється топологією ДНК, клітинною осмолярністю й двокомпонентною системою, яка називається *ArlS-ArlR*. Він знайшов застосування в біохімічних дослідженнях завдяки своїй здатності до зв'язування імуноглобулінів. Він складається з 5 гомологічних Ig-зв'язувальних доменів, які складаються в трьохспіральному пучку. Кожний домен здатний зв'язувати білки багатьох видів ссавців, особливо IgG. Він зв'язує Fc-область важкого ланцюга більшості імуноглобулінів (перекриваючи консервативний сайт зв'язування рецепторів FcRn), а також взаємодіє з областю Fab у родини VH3 людини. За допомогою цих взаємодій у сироватці молекули IgG зв'язують бактерії через свою Fc-область, а не тільки через свої Fab-області, за якими бактерії порушують опсонізацію, активацію комплементу й фагоцитоз.

Термін "білок G" у даному винаході служить для позначення білка, який зв'язує імуноглобулін, і який експресується в стрептококових бактеріях групи C і G і дуже схожий на білок A, але з іншою специфічністю. Це білок клітинної поверхні в 65 кДа (білок G типу G148) і в 58 кДа (білок G типу C40, який знайшов застосування при очищенні антитіл завдяки його зв'язуванню з Fc-областю).

Конкретні втілення винаходу

Як описано тут, неочікувано заміни амінокислот в Fc-області поліпептидів або антитіл дають поліпептиди або антитіла з поліпшеними ефекторними функціями, наприклад, щодо CDC і/або агоністичної активності. Автори винаходу виявили, що при введенні мутацій, які посилюють взаємодії Fc-Fc, типу заміни в положенні, обраному із групи, яка складається з: E430, E345 і S440, разом із заміною за зв'язуванням C1q, Fc-ефекторні функції поліпептиду або антитіла можуть бути поліпшені. Крім того, автори винаходу також виявили, що комбінація посилюючої Fc-Fc мутації й заміни із зв'язування C1q, може давати поліпептиди типу антитіл з агоністичними властивостями або поліпшеними агоністичними властивостями.

В одному аспекті даного винаходу передбачені поліпептиди або антитіла, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й ділянку зв'язування антигену, причому Fc-область містить: а) щонайменше одну посилюючу Fc-Fc заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345 і S440, за умови, що мутація в S440 представлена S440Y або S440W, і б) щонайменше одну заміну із зв'язування C1q, при цьому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1969 May, 63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 1991 NIH Publication No. 91-3242)

В одному аспекті винаходу передбачені поліпептиди або антитіла, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й ділянку зв'язування антигену, причому Fc-область містить: а) заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, і b) заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

Заміна в положенні, що відповідає E430, E345, або заміна S440Y або S440W, відповідно до даного винаходу, вважається заміною, яка посилює Fc-Fc.

Заміна в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, відповідно до даного винаходу, вважається заміною за зв'язуванням C1q.

Мутація в одному з наступних положень: E430, E345 або S440 за умови, що мутація в S440 представлена S440Y або S440W, дає ефект посилення взаємодій Fc-Fc і олігомеризації в поліпептиду або антитіла. Посилення олігомеризації відбувається при зв'язуванні антигензв'язувальної ділянки поліпептиду або антитіла з відповідним цільовим антигеном. При посиленні олігомеризації утворюються такі, наприклад, олігомери, як гексамери. Утворення олігомерних структур типу гексамерів веде до посилення Fc-ефекторних функцій, наприклад, CDC за рахунок підвищення авідності зв'язування C1q у поліпептиду. Комбінація посилюючої Fc-Fc мутації із заміною за зв'язуванням C1q типу однієї або декількох замін у положенні, обраному із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, дає поліпептид або антитіло з поліпшеними ефекторними функціями. Комбінація посилюючої Fc-Fc заміни й заміни із зв'язування C1q також веде до утворення поліпептиду або антитіла з агоністичною активністю. В одному втіленні поліпептид або антитіло може мати підвищену агоністичну активність в порівнянні з вихідним поліпептидом або вихідним антитілом.

Поліпептиди або антитіла згідно даного винаходу становлять особливий інтерес при активації внутрішньоклітинного сигнального шляху за допомогою зв'язування з рецептором на клітинній поверхні.

В одному втіленні відповідно до винаходу підвищення або посилення Fc-ефекторної функції або активності поліпептиду або антитіла, що містить посилюючу Fc-Fc заміну й заміну із зв'язування C1q, слід розуміти так, що поліпептид або антитіло порівнюють із вихідним поліпептидом або вихідним антитілом, тобто вихідний поліпептид або вихідне антитіло відповідно до винаходу не містить замін, але в іншому вони є ідентичними.

Даним винаходом передбачені нові терапевтичні засоби на основі поліпептидів або антитіл з поліпшеними властивостями типу CDC і агоністичної активності. Так, запропоновані винаходом поліпептиди або антитіла мають поліпшені властивості, типу CDC, що залежать від Fc-області, а також вони мають поліпшені властивості типу агоністичної активності, які залежать від ділянки зв'язування антигену.

В одному аспекті даного винаходу передбачені поліпептиди або антитіла, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й ділянку зв'язування антигену, причому Fc-область містить: а) заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, і b) заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше одну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни у дві або трьох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни із зв'язування C1q, обрані з однієї із груп, які складаються із:

- i) двох замін із зв'язування C1q у положеннях K326, E333,
- ii) трьох замін із зв'язування C1q у положеннях K326, E333 і P396, і
- iii) трьох замін із зв'язування C1q у положеннях S267, H268 і S324.

В одному втіленні винаходу одна або кілька замін із зв'язування C1q перебувають у положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, за умови, що заміна в положенні G236 не представлена G236F, G236R, G236Y.

В одному втіленні винаходу одна або кілька замін із зв'язування C1q перебувають у положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332,

E333 і P396, за умови, що заміна в положенні S267 не представлена S267H, S267I, S267K, S267G.

В одному втіленні винаходу одна або кілька заміни із зв'язування C1q перебувають у положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, за умови, що заміна в положенні H268 не представлена H268K, H268D, H268E.

В одному втіленні винаходу щонайменше одна посилююча Fc-Fc заміна обрана із групи, яка складається з E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W і S440Y.

В одному втіленні винаходу щонайменше одна посилююча Fc-Fc заміна обрана із групи, яка складається з E430G, E430S, E430F і E430T.

В одному втіленні винаходу щонайменше одна посилююча Fc-Fc заміна обрана із групи, яка складається з E345K, E345Q, E345R і E345Y.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну E430G. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну E345K. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну E345R. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну S440Y.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E430G, E430S, E430F і E430T, і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E430G, E430S, E430F і E430T, і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи K326, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу Fc-область містить заміну E430G і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E345K, E345Q, E345R і E345Y, і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи: G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E345K, E345Q, E345R і E345Y, і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи: K326, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу Fc-область містить заміну E345K і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу Fc-область містить заміну E345R і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з S440Y і S440W, і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з S440Y і S440W, і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи K326, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу Fc-область містить заміну S440Y і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

Отже, передбачені втілення, які забезпечують посилення зв'язування C1q і/або агоністичних властивостей поліпептидів або антитіл при зв'язуванні антигену на клітинній поверхні. В одному втіленні винаходу поліпептиди або антитіла мають поліпшені агоністичні властивості. В одному втіленні винаходу поліпептиди або антитіла включають Fc-область, яка містить перший важкий ланцюг і другий важкий ланцюг, при цьому одна з вищенаведених заміни може перебувати в першому і/або другому важкому ланцюзі.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з K326, E333 і P396. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни типу двох або трьох заміни в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з K326, E333 і P396. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях K326 і E333. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях K326 і P396. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях P396 і E333. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях K326, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну в положенні E430 і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з K326, E333 і P396. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну в положенні E430 і заміну в одному або декількох положеннях типу двох або трьох положень, обраних із групи, яка складається з K326, E333 і P396. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить

- x. S267E, H268F,
- xi. S267E, S324T,
- xii. H268F, S324T,
- xiii. S267E, H268F, S324T, i
- xiv. S324, I332.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну в положенні E430 і щонайменше одну заміну, обрану з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. K326A,
- ii. E333A,
- iii. E333T,
- iv. P396L,
- v. E333S,
- vi. K326W, E333S,
- vii. K326W, E333T,
- viii. K326A, E333A,
- ix. K326A, K333A, P396L,
- x. S267E, H268F,
- xi. S267E, S324T,
- xii. H268F, S324T,
- xiii. S267E, H268F, S324T, i
- xiv. S324, I332.

Отже, передбачені втілення, у яких одна заміна перебуває в положенні E430. В одному втіленні заміна в положенні E430 обрана із групи, яка складається з: E430G, E430S, E430F, E430T.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну E430G і заміну, обрану з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. K326A,
- ii. E333A,
- iii. E333T,
- iv. P396L,
- v. E333S,
- vi. K326W, E333S,
- vii. K326W, E333T,
- viii. K326A, E333A,
- ix. K326A, K333A, P396L,
- x. S267E, H268F,
- xi. S267E, S324T,
- xii. H268F, S324T,
- xiii. S267E, H268F, S324T, i
- xiv. S324, I332.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K326A, E333A і P396L.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430S, K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430S, K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430S, K333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430S, K326A, E333A і P396L.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430F, K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430F, K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430F, K333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430F, K326A, E333A і P396L.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430T, K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430T, K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430T, K333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430T, K326A, E333A і P396L.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну в положенні E345 і щонайменше одну заміну, обрану з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. K326A,
- ii. E333A,

- iii. E333T,
- iv. P396L,
- v. E333S,
- vi. K326W, E333S,
- vii. K326W, E333T,
- viii. K326A, E333A,
- ix. K326A, K333A, P396L,
- x. S267E, H268F,
- xi. S267E, S324T,
- xii. H268F, S324T,
- xiii. S267E, H268F, S324T, i
- xiv. S324, I332.

Отже, передбачені втілення, у яких одна заміна перебуває в положенні E345. В одному втіленні заміна в положенні E345 обрана із групи, яка складається з: E345K, E345Q, E345R, E345Y.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну E345K і щонайменше одну заміну, обрану з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. K326A,
- ii. E333A,
- iii. E333T,
- iv. P396L,
- v. E333S,
- vi. K326W, E333S,
- vii. K326W, E333T,
- viii. K326A, E333A,
- ix. K326A, K333A, P396L,
- x. S267E, H268F,
- xi. S267E, S324T,
- xii. H268F, S324T,
- xiii. S267E, H268F, S324T, i
- xiv. S324, I332.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345K, K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345K, K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345K, K326A, E333A і P396L.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну E345R і щонайменше одну заміну, обрану з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. K326A,
- ii. E333A,
- iii. E333T,
- iv. P396L,
- v. E333S,
- vi. K326W, E333S,
- vii. K326W, E333T,
- viii. K326A, E333A,
- ix. K326A, K333A, P396L,
- x. S267E, H268F,
- xi. S267E, S324T,
- xii. H268F, S324T,
- xiii. S267E, H268F, S324T, i
- xiv. S324, I332.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K326A, E333A і P396L.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345Q, K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345Q, K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345Q, K333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345Q, K326A, E333A і P396L.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345Y, K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345Y, K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345Y, K333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345Y, K326A, E333A і P396L.

5 В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну S440Y або S440W і щонайменше одну заміну, обрану з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. K326A,
- ii. E333A,
- iii. E333T,
- 10 iv. P396L,
- v. E333S,
- vi. K326W, E333S,
- vii. K326W, E333T,
- viii. K326A, E333A,
- 15 ix. K326A, K333A, P396L,
- x. S267E, H268F,
- xi. S267E, S324T,
- xii. H268F, S324T,
- xiii. S267E, H268F, S324T, і
- 20 xiv. S324, I332.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну S440Y і щонайменше одну заміну, обрану з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. K326A,
- ii. E333A,
- 25 iii. E333T,
- iv. P396L,
- v. E333S,
- vi. K326W, E333S,
- vii. K326W, E333T,
- 30 viii. K326A, E333A,
- ix. K326A, K333A, P396L,
- x. S267E, H268F,
- xi. S267E, S324T,
- xii. H268F, S324T,
- 35 xiii. S267E, H268F, S324T, і
- xiv. S324, I332.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440Y, K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440Y, K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440Y, K333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440Y, K326A, E333A і P396L.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440W, K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440W, K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440W, K333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440W, K326A, E333A і P396L.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло додатково містить одну або кілька замін, обраних із групи, яка складається з G236A, I332E, S239D і I332E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло додатково містить щонайменше дві заміни, обрані із групи, яка складається з:

- 50 i. G236A, I332E, і
- ii. S239D, I332E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить: а) щонайменше одну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, і b) заміни, обрані з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- 55 i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- ii. H268F, S324T, S239D, I332E,
- iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, і
- iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну в положенні E430 і заміни, обрані з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- ii. H268F, S324T, S239D, I332E,
- iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, i
- iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну E430G і заміни, обрані з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- ii. H268F, S324T, S239D, I332E,
- iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, i
- iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну в положенні E345 і заміни, обрані з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- ii. H268F, S324T, S239D, I332E,
- iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, i
- iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну E345K і заміни, обрані з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- ii. H268F, S324T, S239D, I332E,
- iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, i
- iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну E345R і заміни, обрані з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- ii. H268F, S324T, S239D, I332E,
- iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, i
- iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну S440Y або S440W і заміни, обрані з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- ii. H268F, S324T, S239D, I332E,
- iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, i
- iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну S440Y і заміни, обрані з однієї з поміж наступних груп, які складаються із:

- i. H268F, S324T, G236A, I332E,
- ii. H268F, S324T, S239D, I332E,
- iii. S267E, H268F, S324T, G236A, I332E, i
- iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить одну або кілька додаткових замін. Так, в одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло відповідно до будь-якого описаного тут аспекту або втілення містить одну або кілька додаткових замін в Fc-області.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить додаткову заміну, яка відповідає положенню K439, або, якщо Fc-область не містить заміни в положенні S440, то додаткова заміна може перебувати в положенні S440.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить додаткову заміну в поліпептиді або антитілі, яка відповідає положенню K439 або S440, за умови, що заміна в S440 не представлена S440Y або S440W.

Поліпептиди або антитіла, які містять посилюючу Fc-Fc заміну й заміну із зв'язування C1q відповідно до даного винаходу й додаткову заміну в положенні S440 типу S440K, не утворюють олігомерів з поліпептидами або антитілами, які містять заміну в положенні S440 типу S440K. Поліпептиди або антитіла, які містять посилюючу Fc-Fc заміну й заміну із зв'язування C1q відповідно до даного винаходу й додаткову заміну в положенні K439 типу K439E, не утворюють олігомерів з поліпептидами або антитілами, які містять мутацію в положенні K439 типу K439E. В одному втіленні додаткова заміна обрана з поміж S440K або K439E.

В одному втіленні даного винаходу Fc-область містить додаткову заміну, яка є заміною, яка інгібує гексамеризацію, і відповідає K439E або S440K в IgG1 людини згідно нумерації EU. Так, в одному втіленні даного винаходу Fc-область містить посилюючу Fc-Fc заміну типу E430G і заміну K439E, яка інгібує гексамеризацію. В одному втіленні даного винаходу Fc-область

містить посилюючу Fc-Fc заміну типу E345K і заміну K439E, яка інгібує гексамеризацію. В одному втіленні даного винаходу Fc-область містить посилюючу Fc-Fc заміну типу E430G і заміну S440K, яка інгібує гексамеризацію. В одному втіленні даного винаходу Fc-область містить посилюючу Fc-Fc заміну типу E345K і заміну S440K, яка інгібує гексамеризацію. Отже, передбачені втілення, які забезпечують виняткову гексамеризацію між комбінаціями антитіл, які містять заміну K439E, і антитіл, які містять заміну S440K. Тобто інгібуючі заміни K439E і S440K можна розглядати як комплементарні заміни. Комбінації антитіл із двома різними комплементарними замінами, які інгібують гексамеризацію, можуть становити особливий інтерес у композиціях, які містять щонайменше два антитіла з різною специфічністю.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить: а) заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345 і S440, за умови, що заміна в S440 не представлена S440Y або S440W, і b) заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, і c) заміну K439E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить: а) заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430 і E345, і b) заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, і c) заміну S440K.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K326W, E333S і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K326A, E333A і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K333A, P396L і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K326A, E333A, P396L і K439E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345K, K326W, E333S і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345K, K326A, E333A і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345K, K333A, P396L і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345K, K326A, E333A, P396L і K439E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K326W, E333S і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K326A, E333A і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K333A, P396L і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K326A, E333A, P396L і K439E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440Y, K326W, E333S і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440Y, K326A, E333A і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440Y, K333A, P396L і K439E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S440Y, K326A, E333A, P396L і K439E.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить: а) заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430 і E345, і b) заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, і c) заміну S440K.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K326W, E333S і S440K. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K326A, E333A і S440S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K333A, P396L і S440S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E430G, K326A, E333A, P396L і S440K.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345K, K326W, E333S і S440K. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345K, K326A, E333A і S440K. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345K, K333A, P396L і S440K. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345K, K326A, E333A, P396L і S440K.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K326W, E333S і S440K. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K326A, E333A і S440S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K333A, P396L і S440K. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E345R, K326A, E333A, P396L і S440K.

Запропоновані винаходом поліпептид або антитіло містить щонайменше одну посилюючу Fc-Fc заміну й одну або кілька заміни із зв'язування C1q, але, як описано вище, також може містити додаткові заміни для введення додаткових функцій у поліпептид або антитіло. В одному втіленні поліпептид або антитіло містить не більше 10 заміни, наприклад дев'ять заміни,

наприклад вісім замін, наприклад сім замін, наприклад шість замін, наприклад п'ять замін, наприклад чотири заміни, наприклад три заміни або ж дві заміни.

Отже, передбачені втілення, які дозволяють запропонованим винаходом поліпептидам або антитілам мати додаткові заміни, які вводять додаткові ознаки в поліпептид або антитіло. Крім того, додаткові заміни також допускають зміни Fc-області в положеннях, які не беруть участі у взаємодії Fc-Fc, а також у положеннях, не задіяних в Fc-ефекторній функції. Крім того, додаткові заміни можуть бути зв'язані й з алельними варіаціями.

В одному втіленні винаходу Fc-ефекторна функція поліпептиду або антитіла підвищується щонайменше на 20 % у порівнянні з вихідним поліпептидом або вихідним антитілом, які є ідентичними до даного антитіла за винятком того, що воно не містить посилюючої Fc-Fc заміни й заміни із зв'язування C1q в Fc-області.

В одному втіленні винаходу Fc-ефекторна функція поліпептиду або антитіла підвищується щонайменше на 40 %, на 50 % або на 60 % у порівнянні з вихідним поліпептидом або вихідним антитілом, яке є ідентичним до даного антитіла за винятком того, що воно не містить посилюючої Fc-Fc заміни й заміни із зв'язування C1q в Fc-області.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло має підвищену Fc-ефекторну функцію.

В одному втіленні винаходу Fc-ефекторна функція обрана з наступної групи: комплемент-залежна цитотоксичність (CDC), комплемент-залежна клітинна цитотоксичність, активація комплементу, антитілозалежна клітинна цитотоксичність (ADCC), антитілозалежний клітинний фагоцитоз, зв'язування C1q і зв'язування FcγR. В одному втіленні Fc-ефекторна функція є сигналізацією FcγRIIIa. Тобто друга мутація відповідно до винаходу здатна зменшити щонайменше одну Fc-ефекторну функцію.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло має агоністичну активність. Тобто поліпептид або антитіло має агоністичну активність в порівнянні з вихідним поліпептидом або вихідним антитілом.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло має підвищену агоністичну активність. Тобто поліпептид або антитіло має підвищену агоністичну активність в порівнянні з вихідним поліпептидом або вихідним антитілом. В одному втіленні поліпептид або антитіло має підвищену агоністичну активність в порівнянні з поліпептидом або антитілом, що містять таку ж посилюючу Fc-Fc мутацію, але яке не має мутації по C1q.

Агоністична активність рецепторів TNFR-SF вимагає екзогенного зшивання для проявлення агоністичної активності. Її можна виміряти непрямим методом, наприклад, на клітинах HEK293, які містять керований NF-κB секретований репортерний ген (наприклад, ген pMetLuc-Reporter, Clontech, який експресує люциферазу), які стабільно трансфіковані рецептором TNFR-SF, який представляє інтерес. Перехресна зшивка рецептора веде до активації промотору й секреції, наприклад, білка люциферази в середовищі. У потрібні моменти часу можна виміряти активність люциферази для аналізу, відбираючи зразок середовища й додаючи субстрат. Активність люциферази, яка є мірою агоністичної активності, можна визначати на люмінометрі. Див. приклад для OX40 в Zhang et al., J Biol Chem., 2016 Dec 30, 291(53): 27134-27146.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло має підвищену агоністичну активність. Тобто поліпептид або антитіло має підвищену агоністичну активність в порівнянні з вихідним поліпептидом або вихідним антитілом.

В одному втіленні винаходу поліпептид є антитілом, моноспецифічним антитілом, біспецифічним антитілом або мультиспецифічним антитілом. В одному втіленні поліпептид є моноспецифічним поліпептидом, біспецифічним поліпептидом або мультиспецифічним поліпептидом.

Запропоновані винаходом поліпептиди не обмежуються антитілами, які містять природний, наприклад, людський Fc-домен, але вони також можуть бути антитілами, які містять інші мутації, відмінні від мутацій відповідно до даного винаходу, наприклад, мутації, що зачіпають глікозильовані або такі, що дозволяють антитілу ставати біспецифічним антитілом. Терміном "природне антитіло" позначаються будь-які антитіла, які не містять генетично введених мутацій. При цьому антитіло, яке містить природні модифікації, наприклад, різні алотипи, у контексті даного винаходу слід вважати "природним антитілом" й таким чином вихідним антитілом. Такі антитіла відповідно до даного винаходу можуть служити матрицею як мінімум для двох замін й тому вони представляють антитіла запропоновані винаходом. Прикладом вихідного антитіла, яке містить інакші заміни, ніж запропоновані винаходом заміни, є біспецифічне антитіло, описане в WO 2011/131746 (Genmab), де використовувалися відновлювальні умови для активації обміну половинок молекул двох антитіл, які містять IgG 4-подібні ділянки CH3, одержуючи тим самим біспецифічні антитіла без супутнього утворення агрегатів. Інші приклади вихідних антитіл включають, без обмеження, біспецифічні антитіла типу

гетеродимерних: Triomabs (Fresenius); біспецифічні IgG1 і IgG2 (Rinat Neurosciences Corporation); Fc Δ Adp (Regeneron); knobs-into-holes(Genentech); electrostatic steering (Amgen, Chugai, Oncomed); SEEDbody (Merck); асиметричні каркаси (Zymeworks); mAb-Fv (Xencor); і LUZ-Y (Genentech). Інші типові формати вихідних антитіл включають, без обмеження, антитіла дикого типу, повнорозмірні антитіла або Fc-вмісні фрагменти антитіл, людські антитіла, гуманізовані антитіла, химерні антитіла або будь-які їхні комбінації.

В одному втіленні поліпептид або антитіло містить Fc-область, яка містить заміну R435H.

В одному втіленні даного винаходу передбачені поліпептиди або антитіла, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й ділянку зв'язування антигену, причому Fc-область містить: а) заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, і б) заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333, P396, і с) заміну R435H, при цьому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

Поліпептид або антитіло може бути будь-яким людським антитілом будь-якого ізотипу, наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM або IgA, необов'язково повнорозмірним людським антитілом типу повнорозмірного антитіла IgG1 людини.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло є антитілом IgG1 людини, наприклад, алотипа IgG1m(za) або IgG1m(f).

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить Fc-область ізотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM, IgA людини або змішаного ізотипу. Тобто Fc-область запропонованого винаходом поліпептиду або антитіла містить щонайменше першу й другу мутацію, уведену в Fc-область відповідного ізотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM, IgA людини або змішаного ізотипу. В одному втіленні винаходу Fc-область має змішаний ізотип, обраний з наступної групи: IgG1/IgG2, IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4 і IgG3/IgG4. При змішаному ізотипі Fc-область складається з амінокислотної послідовності більше ніж одного ізотипу.

В одному втіленні винаходу Fc-область представлена ізотипом IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 людини або змішаним ізотипом.

В одному втіленні винаходу Fc-область представлена IgG людини.

У кращому втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить Fc-область, яка представлена ізотипом IgG1 людини.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить Fc-область, яка представлена алотипом IgG1m(f), IgG1m(a), IgG1m(z), IgG1m(x) або змішаним алотипом.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить Fc-область, наведену в SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 89, 168, 169 або 170, причому Fc-область містить заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345 і S440, за умови, що заміна в S440 представлена S440Y або S440W, і заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, при цьому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить Fc-область, наведену в SEQ ID NO: 77, 78 або 90, причому Fc-область містить заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, при цьому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить Fc-область, наведену в SEQ ID NO: 80, 82, 83, 84, 87 або 88.

В одному втіленні винаходу поліпептид є людським антитілом, гуманізованим антитілом або химерним антитілом.

Мультиспецифічні антитіла

Запропоновані винаходом поліпептиди або антитіла не обмежуються антитілами, які містять природний, наприклад, людський Fc-домен, але вони також можуть включати антитіла, які містять інші мутації, відмінні від мутацій запропонованих даним винаходом, наприклад, мутації, які стосуються глікозилювання або, які дозволяють антитілу ставати мультиспецифічним антитілом або біспецифічним антитілом. Терміном "природне антитіло" позначаються будь-які антитіла, які не містять генетично введених мутацій. При цьому антитіло, яке містить природні модифікації, наприклад, різні алотипи, слід розглядати як "природне антитіло" у контексті даного винаходу й таким чином як вихідне антитіло. Такі антитіла можуть служити матрицею як мінімум для двох запропонованих даним винаходом замін й тому вони є запропонованими винаходом антитілами. Прикладом вихідного антитіла, яке містить інакші заміни, ніж заміни запропоновані даним винаходом, є біспецифічне антитіло, описане в WO 2011/131746 (Genmab), де використовувалися відновлювальні умови для активації обміну половинок молекул двох антитіл, які містять IgG 4-подібні ділянки CH3, одержуючи тим самим

біспецифічні антитіла без супутнього утворення агрегатів. Інші приклади вихідних антитіл включають, без обмеження, біспецифічні антитіла типу гетеродимерних: Triomabs (Fresenius); біспецифічні IgG1 і IgG2 (Rinat Neurosciences Corporation); Fc(Adp (Regeneron); knobs-into-holes (Genentech); electrostatic steering (Amgen, Chugai, Oncomed); Seedbody (Merck); асиметричні каркаси (Zymeworks); mAb-Fv (Xencor); і LUZ-Y (Genentech). Інші типові формати вихідних антитіл включають, без обмеження, антитіла дикого типу, повнорозмірні антитіла або Fc-вмісні фрагменти антитіл, людські антитіла, гуманізовані антитіла, химерні антитіла або будь-які їхні комбінації.

Слід розуміти, що в описаному нижче аспекті мультиспецифічних антитіл можуть використовуватися будь-які втілення даного винаходу, описані тут. Так, в одному втіленні відповідно до даного винаходу варіанти є антитілами, обраними з поміж моноспецифічних антитіл, біспецифічних антитіл або мультиспецифічних антитіл. В одному конкретному втіленні біспецифічні антитіла мають формат, описаний в WO 2011/131746.

Біспецифічні антитіла відповідно до даного винаходу не обмежуються певним форматом і можуть бути будь-якими з описаних тут.

В іншому аспекті винаходу передбачені поліпептиди або антитіла, які є біспецифічним поліпептидом або антитілом, що містить перший важкий ланцюг імуноглобуліну й першу ділянку зв'язування антигену, і другий поліпептид або антитіло, що містить другий важкий ланцюг імуноглобуліну й другу ділянку зв'язування антигену, причому перша і друга ділянки зв'язування антигену зв'язують різні епітопи на тому самому або на різних антигенах, причому перший й/або другий важкий ланцюг містить:

а) заміну в положенні, обраному із групи, що відповідає E430, E345 і S440, за умови, що заміна в S440 представлена S440Y або S440W,

б) одну або кілька замін у положенні, обраному із групи, яка складається з G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396,

с) причому перший важкий ланцюг містить додаткову заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з: K409, T366, L368, K370, D399, F405 і Y407;

а другий важкий ланцюг містить додаткову заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з F405, T366, L368, K370, D399, Y407 і K409, при цьому додаткова мутація в першому поліпептиді відрізняється від додаткової мутації в другому поліпептиді.

В одному аспекті даного винаходу передбачені поліпептиди або антитіла, які включають Fc-область IgG людини, яка містить перший важкий ланцюг і першу ділянку зв'язування антигену, другий важкий ланцюг і другу ділянку зв'язування антигену, причому перший і другий важкий ланцюг містить: а) заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345 і S440, за умови, що заміна в S440 представлена S440Y або S440W, і б) заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, і с) додаткову заміну в положенні F405 або K409; причому додаткові заміни різні в першому важкому ланцюзі й другому важкому ланцюзі, таким чином, що якщо перший важкий ланцюг містить заміну в положенні F405, то другий важкий ланцюг містить заміну в K409 і навпаки.

Отже, передбачені втілення, у яких перший важкий ланцюг і другий важкий ланцюг не є ідентичними, тому що (с) додаткова мутація перебуває не в тому самому положенні в першому й другому важкому ланцюзі.

Слід розуміти, що в описаному нижче аспекті мультиспецифічних антитіл можуть використовуватися будь-які втілення даного винаходу, описані тут. Так, в одному втіленні варіанти відповідно до даного винаходу є антитілами, обраними з поміж моноспецифічних антитіл, біспецифічних антитіл або мультиспецифічних антитіл. В одному конкретному втіленні біспецифічні антитіла мають формат, описаний в WO 2011/131746.

В одному конкретному втіленні даного винаходу перший важкий ланцюг містить додаткову заміну, яка відповідає K409 типу K409R; а другий важкий ланцюг містить додаткову заміну, яка відповідає F405 типу F405L.

В одному втіленні даного винаходу перший й/або другий важкий ланцюг містить:

а) заміну, яка відповідає положенню E430,

б) заміну в одному або декількох положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396,

с) причому перший важкий ланцюг містить додаткову заміну, яка відповідає K409R; а другий важкий ланцюг містить додаткову заміну, яка відповідає F405L.

В одному втіленні даного винаходу перший й/або другий важкий ланцюг містить:

а) заміну, яка відповідає положенню E345,

- [illegible]

Мішені й способи застосування

Поліпептиди або антитіла запропоновані даним винаходом можуть зв'язувати мішені, які активують шляхи передачі сигналів. В одному втіленні такою мішенню є мішень, яка активує, інгібує, модулює й/або регулює шлях передачі сигналів. Прикладами мішеней, які можуть бути найбільш придатними як мішені відповідно до даного винаходу, є рецептори на клітинній поверхні й ліганди.

Рецептори на клітинній поверхні включають, наприклад, рецептори, що належать до таких родин рецепторів, як родина рецепторів гемопоетичних факторів, родина рецепторів цитокінів, родина тирозинкіназних рецепторів, родина серин/треонінкіназних рецепторів, родина рецепторів TNF, родина пов'язаних з G-білком рецепторів, родина рецепторів GPI, родина тирозинфосфатазних рецепторів, родина факторів адгезії й родина гормональних рецепторів. Є різні посилення, що стосуються рецепторів, що належать до цих родин рецепторів, та їх характеристик, які включають, наприклад, Cooke B.A., King R.J.B., van der Molen H.J., ed. *New Comprehensive Biochemistry*, Vol. 18B "Hormones and their Actions Part II" pp. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., New York, USA; Patthy L. (1990) *Cell*, 61: 13-14; Ullrich A. et al. (1990) *Cell*, 61: 203-212; Massagui J. (1992) *Cell*, 69: 1067-1070; Miyajima A. et al. (1992) *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 295-331; Taga T. and Kishimoto T. (1992) *FASEB J.*, 7: 3387-3396; Fantl W.I. et al. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 453-481; Smith C.A. et al. (1994) *Cell*, 76: 959-962; Flower D.R. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1422: 207-234; i M. Miyasaka, ed., *Cell Technology, supplementary volume, Handbook series, "Handbook for Adhesion Factors"* (1994) (Shujunsha, Tokyo, Japan).

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить ділянку зв'язування антигену, причому ділянка зв'язування антигену зв'язується із представником суперродини рецепторів фактора некрозу пухлин (TNFR-SF) або суперродини пов'язаних з G-білком рецепторів (GPCR).

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло зв'язується з рецептором на клітинній поверхні, включаючи, наприклад, рецептори гормонів і рецептори цитокінів. Типові рецептори цитокінів включають, наприклад, рецептори гемопоетичних факторів, рецептори лімфокінів, рецептори факторів росту, рецептори факторів, які контролюють диференціювання тощо. Приклади рецепторів цитокінів: рецептор еритропоетина (EPO), рецептор тромбопоетина (TPO), рецептор колонієстимулюючого фактора гранулоцитів (G-CSF), рецептор колонієстимулюючого фактора макрофагів (M-CSF), рецептор колонієстимулюючого фактора гранулоцитів-макрофагів (GM-CSF), рецептор фактора некрозу пухлин (TNF), рецептор інтерлейкіну-1 (IL-1), рецептор інтерлейкіну-2 (IL-2), рецептор інтерлейкіну-3 (IL-3), рецептор інтерлейкіну-4 (IL-4), рецептор інтерлейкіну-5 (IL-5), рецептор інтерлейкіну-6 (IL-6), рецептор інтерлейкіну-7 (IL-7), рецептор інтерлейкіну-9 (IL-9), рецептор інтерлейкіну-10 (IL-10), рецептор інтерлейкіну-11 (IL-11), рецептор інтерлейкіну-12 (IL-12), рецептор інтерлейкіну-13 (IL-13), рецептор інтерлейкіну-15 (IL-15), рецептор α -інтерферону (IFN- α), рецептор β -інтерферону (IFN- β), рецептор γ -інтерферону (IFN- γ), рецептор гормону росту (GH), рецептор інсуліну, рецептор фактора проліферації стовбурних клітин крові (SCF), рецептор фактора росту судинного епідерміса (VEGF), рецептор фактора росту епідермальних клітин (EGF), рецептор фактора росту нервів (NGF), рецептор фактора росту фібробластів (FGF), рецептор тромбоцитарного фактора росту (PDGF), рецептор β -трансформуючого фактора росту (TGF- β), рецептор фактора, який інгібує міграцію лейкоцитів (LIF), рецептор циліарного нейротрофічного фактора (CNTF), рецептор онкостатина M (OSM) і рецептори родини Notch.

Суперродина рецепторів фактора некрозу пухлин (TNFRSF) є групою рецепторів, що характеризуються здатністю до зв'язування лігандів суперродини фактора некрозу пухлин (TNFSF) через позаклітинний багатий на цистеїн домен. Рецептори TNF утворюють тривимірні комплекси в плазматичній мембрані. TNFRSF включає наступні 29 білків: TNFR1 (Uniprot P19438), FAS (Uniprot P25445), DR3 (Uniprot Q93038), DR4 (Uniprot O00220), DR5 (Uniprot O14763), DR6 (Uniprot O75509), NGFR (Uniprot P08138), EDAR (Uniprot Q9UNE0), DcR1 (Uniprot O14798), DcR2 (Uniprot Q9UBN6), DcR3 (Uniprot O95407), OPG (Uniprot O00300), TROY (Uniprot Q9NS68), XEDAR (Uniprot Q9HAV5), LTbR (Uniprot P36941), HVEM (Uniprot Q92956), TWEAKR (Uniprot Q9NP84), CD120b (Uniprot P20333), OX40 (Uniprot P43489), CD40 (Uniprot P25942), CD27 (Uniprot P26842), CD30 (Uniprot P28908), 4-1BB (Uniprot Q07011), RANK (Uniprot Q9Y6Q6), TACI (Uniprot O14836), BlySR (Uniprot Q96RJ3), BCMA (Uniprot Q02223), GITR (Uniprot Q9Y5U5), RELT (Uniprot Q969Z4).

Деякі TNFRSF беруть участь в апоптозі й містять внутрішньоклітинний домен смерті, наприклад FAS, DR4, DR5, TNFR1, DR6, DR3, EDAR і NGFR. Інші TNFRSF залучені в інші шляхи передачі сигналів типу проліферації, виживання й диференціювання, наприклад DcR1, DcR2, DcR3, OPG, TROY, XEDAR, LTbR, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB,

RANK, TACI, BlySR, BCMA, GITR, RELT. Рецептори TNF експресуються в самих різних тканинах ссавців, зокрема в лейкоцитах.

В одному втіленні винаходу ділянка зв'язування антигену зв'язується із представником TNFR-SF, обраним із групи, яка складається з: FAS, DR4, DR5, TNFR1, DR6, DR3, EDAR, NGFR, OX40, CD40, CD30, CD27, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, RELT і GITR.

В одному втіленні винаходу ділянка зв'язування антигену зв'язується із представником TNFR-SF. В одному втіленні винаходу ділянка зв'язування антигену зв'язується з таким представником TNFR-SF, який не містить внутрішньоклітинного домена смерті. В одному втіленні винаходу TNFR-SF обраний із групи: OX40, CD40, CD30, CD27, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, RELT и GITR. В одному втіленні винаходу TNFR-SF обраний із групи: FAS, DR4, DR4, TNFR1, DR6, DR3, EDAR і NGFR.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з OX40, причому Fc-область IgG1 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміни K326W і E333S.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з CD40, причому Fc-область IgG1 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміни K326W і E333S.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з CD137, причому Fc-область IgG1 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміни K326W і E333S.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з GITR, причому Fc-область IgG містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміни K326W і E333S.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з GITR, причому Fc-область IgG1 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміни K326W і E333S.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з GITR, причому Fc-область IgG2 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміни K326W і E333S.

Запропоновані винаходом поліпептид або антитіло може зв'язуватися з будь-якою мішенню, а приклади таких мішеней або антигенів по винаходу можуть бути спрямовано проти: TNFR1, FAS, DR3, DR4, DR5, DR6, NGFR, EDAR, Dcr1, Dcr2, Dcr3, OPG, TROY, XEDAR, Ltbr, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, GITR, RELT.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з FAS, причому Fc-область IgG1 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміни K326W і E333S.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з DR5, причому Fc-область IgG1 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміни K326A і E333A.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з DR5, причому Fc-область IgG1 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміни K326A і E333T.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з DR5, причому Fc-область IgG1 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміну K326A.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з DR5, причому Fc-область IgG1 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміну E333A.

В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з DR5, причому Fc-область IgG1 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміни K326W і E333S.

5 В одному втіленні винаходу антитіло містить ділянку зв'язування антигену, який зв'язується з CD20, причому Fc-область IgG1 містить:

- a. заміну E430G і
- b. заміни K326W і E333S.

10 В одному втіленні винаходу ділянка зв'язування антигену зв'язується із представником суперродини фактора некрозу пухлин (TNF-SF).

В одному втіленні винаходу ділянка зв'язування антигену зв'язується із представником TNF-SF, обраним із групи, яка складається з: β -лімфотоксина (TNF-C), OX40L, CD154, FasL, CD70, CD153, RANKL, APRIL і BAFF.

15 В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло зв'язується з рецептором на клітинній поверхні, включаючи, наприклад, рецептори гормонів і рецептори цитокінів. Типові рецептори цитокінів включають, наприклад, рецептори гемопоетичних факторів, рецептори лімфокінів, рецептори факторів росту, рецептори факторів, які контролюють диференціювання тощо. Приклади рецепторів цитокінів: рецептор еритропоетина (EPO), рецептор тромбопоетина (TPO), рецептор колонієстимулюючого фактора гранулоцитів (G-CSF), рецептор колонієстимулюючого фактора макрофагів (M-CSF), рецептор колонієстимулюючого фактора гранулоцитів-макрофагів (GM-CSF), рецептор фактора некрозу пухлин (TNF), рецептор інтерлейкіну-1 (IL-1), рецептор інтерлейкіну-2 (IL-2), рецептор інтерлейкіну-3 (IL-3), рецептор інтерлейкіну-4 (IL-4), рецептор інтерлейкіну-5 (IL-5), рецептор інтерлейкіну-6 (IL-6), рецептор інтерлейкіну-7 (IL-7), рецептор інтерлейкіну-9 (IL-9), рецептор інтерлейкіну-10 (IL-10), рецептор інтерлейкіну-11 (IL-11), рецептор інтерлейкіну-12 (IL-12), рецептор інтерлейкіну-13 (IL-13), рецептор інтерлейкіну-15 (IL-15), рецептор α -інтерферону (IFN- α), рецептор β -інтерферону (IFN- β), рецептор γ -інтерферону (IFN- γ), рецептор гормону росту (GH), рецептор інсуліну, рецептор фактора проліферації стовбурних клітин крові (SCF), рецептор фактора росту судинного епідерміса (VEGF), рецептор фактора росту епідермальних клітин (EGF), рецептор фактора росту нервів (NGF), рецептор фактора росту фіброblastів (FGF), рецептор тромбоцитарного фактора росту (PDGF), рецептор β -трансформуючого фактора росту (TGF- β), рецептор фактора, який інгібує міграцію лейкоцитів (LIF), рецептор циліарного нейротрофічного фактора (CNTF), рецептор онкостатина M (OSM) і рецептори родини Notch.

30 В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло зв'язується з рецептором на клітинній поверхні, обраним із групи, яка складається з: CTLA-4, PD1, TIM-3, LAG-3, ICOS, CD28 і PDL-1.

Запропоновані винаходом поліпептид або антитіло може зв'язуватися з будь-якою мішенню, а приклади таких мішеней або антигенів описані вище.

Способи підвищення агоністичної активності поліпептидів або антитіл

40 Передбачається, що описані нижче втілення з посиланням на поліпептиди або антитіла відносяться до поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування антигену, причому поліпептиди або антитіла також можуть бути мультиспецифічними поліпептидами або антитілами, які містять першу Fc-область імуноглобуліну й першу ділянку зв'язування антигену, і другий поліпептид або антитіло, що містить другу Fc-область імуноглобуліну й другу ділянку зв'язування антигену.

45 В одному аспекті даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептидів або антитіл шляхом введення посилюючої Fc-Fc заміни й заміни із зв'язування C1q.

В одному аспекті даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й ділянку зв'язування антигену, який передбачає: а) введення щонайменше однієї заміни в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміни S440Y або S440W, і б) введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

55 Введення а) щонайменше однієї запропонованої винаходом заміни в одне з наступних положень E430, E345 або S440 дає ефект посилення взаємодій Fc-Fc у поліпептидів або антитіл. Введення б) однієї або декількох запропонованих винаходом замін в одне з наступних положень G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396 дає ефект підвищення агоністичної активності в поліпептидів або антитіл.

В іншому аспекті даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й ділянку зв'язування антигену, причому Fc-область містить а) щонайменше одну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, а спосіб включає б) введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й ділянку зв'язування антигену, причому Fc-область містить а) щонайменше одну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, а спосіб включає б) введення щонайменше двох замін у положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

Підвищення агоністичної активності запропонованих винаходом поліпептидів або антитіл слід розуміти як підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла в порівнянні з вихідним поліпептидом або антитілом, або ж підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла також може означати те, що поліпептид або антитіло порівнюють із поліпептидом або антитілом, які містять посилюючу Fc-Fc мутацію, але не мутацію із зв'язування C1q. Таким чином, слід розуміти, що поліпептид або антитіло можна порівнювати з вихідним поліпептидом або вихідним антитілом, що містять ідентичну ділянку зв'язування антигену й Fc-область без посилюючої Fc-Fc заміни й без заміни із зв'язування C1q, або ж поліпептид або антитіло можна порівнювати з поліпептидом або антитілом, що містять ідентичну ділянку зв'язування антигену й Fc-область із посилюючої Fc-Fc заміною, але без заміни із зв'язування C1q.

В одному втіленні винаходу одна або кілька замін перебувають у положенні, обраному із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, за умови, що заміна в положенні G236 не представлена G236F, G236R, G236Y.

В одному втіленні винаходу одна або кілька замін перебувають у положенні, обраному із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, за умови, що заміна в положенні S267 не представлена S267H, S267I, S267K, S267G.

В одному втіленні винаходу одна або кілька замін перебувають у положенні, обраному із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, за умови, що заміна в положенні H268 не представлена H268K, H268D, H268E.

В одному втіленні винаходу щонайменше одна заміна обрана із групи, яка складається з E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W і S440Y. Таким чином, передбачені втілення, у яких заміна посилює взаємодії Fc-Fc.

В одному втіленні винаходу щонайменше одна заміна обрана із групи, яка складається з E430G, E430S, E430F, E430T.

В одному втіленні винаходу щонайменше одна заміна обрана із групи, яка складається з E345K, E345Q, E345R, E345Y.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну E430G. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну E345K. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну E345R. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну S440Y.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E430G, E430S, E430F і E430T, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E430G, E430S, E430F і E430T, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E430G, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E430G, причому спосіб передбачає

введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E430G, причому спосіб передбачає введення замін з однієї із груп, які складаються із:

- i) K326W і E333S,
- ii) K326W і E333T,
- iii) K326A і E333A,
- iv) K326A, E333A і P396L,
- v) K326W,
- vi) E333S,
- vii) E333T.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E345K, E345Q, E345R і E345Y, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E345K, E345Q, E345R і E345Y, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345K, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345K, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345K, причому спосіб передбачає введення замін з однієї із груп, які складаються із:

- i) K326W і E333S,
- ii) K326W і E333T,
- iii) K326A і E333A,
- iv) K326A, E333A і P396L,
- v) K326W,
- vi) E333S,
- vii) E333T.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345R, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345R, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345R, причому спосіб передбачає введення замін з однієї із груп, які складаються із:

- i) K326W і E333S,
- ii) K326W і E333T,
- iii) K326A і E333A,
- iv) K326A, E333A і P396L,
- v) K326W,
- vi) E333S,
- vii) E333T.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи,

яка складається з S440Y і S440W, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміни у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з S440Y і S440W, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміни у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну S440Y, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміни у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну S440Y, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміни у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну S440Y, причому спосіб передбачає введення заміни з однієї із груп, які складаються із:

- i) K326W і E333S,
- ii) K326W і E333T,
- iii) K326A і E333A,
- iv) K326A, E333A і P396L,
- v) K326W,
- vi) E333S,
- vii) E333T.

Отже, передбачені втілення, які сприяють посиленню агоністичних властивостей поліпептидів або антитіл при зв'язуванні антигену клітинної поверхні. В одному втіленні поліпептиди або антитіла мають підвищені агоністичні властивості. В одному втіленні поліпептиди або антитіла містять Fc-область, яка містить перший важкий ланцюг і другий важкий ланцюг, причому одна з вищенаведених заміни може перебувати в першому і/або другому важкому ланцюзі.

В одному втіленні винаходу одна або кілька заміни перебувають у положенні, обраному із групи, яка складається з K326, E333 і P396. В одному втіленні винаходу одна або кілька заміни типу двох або трьох заміни перебувають у положеннях, обраних із групи, яка складається з K326, E333 і P396. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях K326 і E333. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях K326 і P396. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях P396 і E333. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях K326, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить одну або кілька, як то дві або три заміни, обрані із групи, яка складається з K326A, K326W, E333S, E333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну K326A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну K326W. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни K326W і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни K326W і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни K326A і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни K326A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни E333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни K326A, E333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни K326S, E333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни K326W, E333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни K326W, E333S і P396L.

В одному втіленні винаходу одна або кілька заміни перебувають у положенні, обраному із групи, яка складається з S267, H268 і S324. В одному втіленні винаходу одна або кілька заміни типу двох або трьох заміни перебувають у положеннях, обраних із групи, яка складається з S267, H268 і S324. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях

S267 і H268. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях S267 і S324. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях H268 і S324. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях S267, H268 і S324.

5 В одному втіленні винаходу одна або кілька замін перебувають у положенні, обраному із групи, яка складається з S267E, H268F і S324T. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить одну або кілька, як то дві або три заміни, обрані із групи, яка складається з S267E, H268F і S324T. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну S267E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну H268F. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну S324T. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S267E і H268F. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S267E і S324T. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни H268F і S324T. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S267E, H268F і S324T.

15 В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб, у якому Fc-область містить одну або кілька додаткових замін.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб, у якому Fc-область містить додаткову заміну в наступних положеннях IgG1 людини згідно нумерації EU: S440 або K439. В одному втіленні винаходу Fc-область містить додаткову заміну, яка відповідає одному з наступних положень: S440 або K439, за умови, що додаткова заміна не перебуває в положенні S440, якщо в S440 перебуває поліпшуюча Fc-Fc заміна. Поліпептиди або антитіла, які містять посилюючу Fc-Fc заміну й заміну із зв'язування C1q відповідно до даного винаходу й додаткову заміну в положенні S440 типу S440K, не утворюють олігомерів з поліпептидами або антитілами, які містять мутацію в положенні S440 типу S440K. Поліпептиди або антитіла, які містять посилюючу Fc-Fc заміну й заміну із зв'язування C1q відповідно до даного винаходу й додаткову заміну в положенні K439 типу K439E, не утворюють олігомерів з поліпептидами або антитілами, які містять мутацію в положенні K439 типу K439E. Таким чином, передбачений спосіб, який сприяє утворенню олігомерів між поліпептидами або антитілами, у яких перший поліпептид або антитіло містить заміну K439E, а другий поліпептид або антитіло містить заміну S440K. Так, за певних структур першого й другого поліпептидів можуть обов'язково формуватися олігомери типу, наприклад, гексамерів. Це може представляти інтерес у таких способах, у яких поліпептиди зв'язують різні мішені або епітопи, а при комбінуванні цих різних мішеней або епітопів повинні утворюватися олігомери.

35 В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб, у якому додаткова заміна обрана з S440K або K439E.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення агоністичної активності, у якому агоністична активність підвищується щонайменше на 20% у порівнянні з вихідним поліпептидом або вихідним антитілом, яке ідентичне до даного поліпептиду або антитіла або ж поліпептиду або антитіла з ідентичною посилюючою Fc-Fc заміною, але без заміни із зв'язування C1q. В іншому втіленні винаходу поліпептид або антитіло має підвищену агоністичну активність щонайменше на 30%, на 40%, на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90% або на 95% у порівнянні з вихідним поліпептидом або вихідним антитілом або ж з поліпептидом або антитілом з ідентичною посилюючою Fc-Fc заміною, але без заміни із зв'язування C1q.

Способи підвищення активності CDC

45 В одному аспекті даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC поліпептидів або антитіл шляхом введення посилюючої Fc-Fc заміни й заміни із зв'язування C1q.

В одному аспекті даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й ділянку зв'язування антигену, який передбачає: а) введення щонайменше однієї заміни в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміни S440Y або S440W, і b) введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

55 Введення а) щонайменше однієї запропонованої винаходом заміни в одне з наступних положень E430, E345 або S440 дає ефект посилення взаємодій Fc-Fc поліпептидів або антитіл. Введення b) однієї або декількох запропонованих винаходом замін в одне з наступних положень G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396 дає ефект підвищення активності CDC поліпептидів або антитіл.

В іншому аспекті даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й ділянку зв'язування антигену, причому Fc-область містить а) щонайменше одну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, а спосіб передбачає б) введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну людини й ділянку зв'язування антигену, причому Fc-область містить а) щонайменше одну заміну в положенні, обраному із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, а спосіб передбачає б) введення щонайменше двох замін у положеннях, обраних із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, причому положення відповідають IgG1 людини згідно нумерації EU.

Підвищення агоністичної активності запропонованих винаходом поліпептидів або антитіл слід розуміти як підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла в порівнянні з вихідним поліпептидом або антитілом, або ж підвищення агоністичної активності поліпептиду або антитіла також може означати те, що поліпептид або антитіло порівнюють із поліпептидом або антитілом, які містять посилюючу Fc-Fc мутацію, але не мутацію із зв'язування C1q. Таким чином, слід розуміти, що поліпептид або антитіло можна порівнювати з вихідним поліпептидом або вихідним антитілом, що містять ідентичну ділянку зв'язування антигену й Fc-область без посилюючої Fc-Fc заміни й без заміни із зв'язування C1q, або ж поліпептид або антитіло можна порівнювати з поліпептидом або антитілом, що містять ідентичну ділянку зв'язування антигену й Fc-область із посилюючої Fc-Fc заміною, але без заміни із зв'язування C1q.

В одному втіленні винаходу одна або кілька замін перебувають у положенні, обраному із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, за умови, що заміна в положенні G236 не представлена G236F, G236R, G236Y.

В одному втіленні винаходу одна або кілька замін перебувають у положенні, обраному із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, за умови, що заміна в положенні S267 не представлена S267H, S267I, S267K, S267G.

В одному втіленні винаходу одна або кілька замін перебувають у положенні, обраному із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, за умови, що заміна в положенні H268 не представлена H268K, H268D, H268E.

В одному втіленні винаходу щонайменше одна заміна обрана із групи, яка складається з E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W і S440Y. Таким чином, передбачені втілення, у яких заміна посилює взаємодії Fc-Fc.

В одному втіленні винаходу щонайменше одна заміна обрана із групи, яка складається з E430G, E430S, E430F, E430T.

В одному втіленні винаходу щонайменше одна заміна обрана із групи, яка складається з E345K, E345Q, E345R, E345Y.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну E430G. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну E345K. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну E345R. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить щонайменше заміну S440Y.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E430G, E430S, E430F і E430T, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E430G, E430S, E430F і E430T, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E430G, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох замін у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E430G, причому спосіб передбачає

введення однієї або декількох заміну у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E430G, причому спосіб передбачає введення заміну з однієї із груп, які складаються із:

- i) K326W і E333S,
- ii) K326W і E333T,
- iii) K326A і E333A,
- iv) K326A, E333A і P396L,
- v) K326W,
- vi) E333S,
- vii) E333T.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E345K, E345Q, E345R і E345Y, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміну у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з E345K, E345Q, E345R і E345Y, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміну у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345K, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміну у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345K, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміну у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345K, причому спосіб передбачає введення заміну з однієї із груп, які складаються із:

- i) K326W і E333S,
- ii) K326W і E333T,
- iii) K326A і E333A,
- iv) K326A, E333A і P396L,
- v) K326W,
- vi) E333S,
- vii) E333T.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345R, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміну у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345R, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміну у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну E345R, причому спосіб передбачає введення заміну з однієї із груп, які складаються із:

- i) K326W і E333S,
- ii) K326W і E333T,
- iii) K326A і E333A,
- iv) K326A, E333A і P396L,
- v) K326W,
- vi) E333S,
- vii) E333T.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи,

яка складається з S440Y і S440W, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміन у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить щонайменше одну заміну, обрану із групи, яка складається з S440Y і S440W, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміин у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну S440Y, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміин у положеннях, обраних із групи G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну S440Y, причому спосіб передбачає введення однієї або декількох заміин у положеннях, обраних із групи K326A, K326W, E333A, E333S, E333T і P396L.

В одному втіленні даного винаходу передбачений спосіб підвищення активності CDC у поліпептиду або антитіла, у якого Fc-область містить заміну S440Y, причому спосіб передбачає введення заміин з однієї із груп, які складаються із:

- i) K326W і E333S,
- ii) K326W і E333T,
- iii) K326A і E333A,
- iv) K326A, E333A і P396L,
- v) K326W,
- vi) E333S,
- vii) E333T.

Отже, передбачені втілення, які сприяють посиленню активності CDC поліпептидів або антитіл при зв'язуванні антигену клітинної поверхні. В одному втіленні поліпептиди або антитіла мають підвищену активність CDC. В одному втіленні поліпептиди або антитіла містять Fc-область, яка містить перший важкий ланцюг і другий важкий ланцюг, причому одна з вищенаведених заміин може перебувати в першому і/або другому важкому ланцюзі.

В одному втіленні винаходу одна або кілька заміин перебувають у положенні, обраному із групи, яка складається з K326, E333 і P396. В одному втіленні винаходу одна або кілька заміин типу двох або трьох заміин перебувають у положеннях, обраних із групи, яка складається з K326, E333 і P396. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини в положеннях K326 і E333. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини в положеннях K326 і P396. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини в положеннях P396 і E333. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини в положеннях K326, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить одну або кілька, як то дві або три заміини, обрані із групи, яка складається з K326A, K326W, E333S, E333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну K326A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну K326W. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини K326W і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини K326W і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини K326A і E333A. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини K326A і E333S. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини K326A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини E333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини K326A, E333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини K326S, E333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини K326W, E333A і P396L. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини K326W, E333S і P396L.

В одному втіленні винаходу одна або кілька заміин перебувають у положенні, обраному із групи, яка складається з S267, H268 і S324. В одному втіленні винаходу одна або кілька заміин типу двох або трьох заміин перебувають у положеннях, обраних із групи, яка складається з S267, H268 і S324. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини в положеннях S267 і H268. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміини в положеннях

S267 і S324. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях H268 і S324. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни в положеннях S267, H268 і S324.

В одному втіленні винаходу одна або кілька заміни перебувають у положенні, обраному із групи, яка складається з S267E, H268F і S324T. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить одну або кілька, як то дві або три заміни, обрані із групи, яка складається з S267E, H268F і S324T. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну S267E. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну H268F. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміну S324T. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S267E і H268F. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S267E і S324T. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни H268F і S324T. В одному втіленні винаходу поліпептид або антитіло містить заміни S267E, H268F і S324T.

Композиції

Передбачається, що описані нижче втілення з посиланням на поліпептиди або антитіла відносяться до поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування антигену, причому поліпептиди або антитіла також можуть бути мультиспецифічними поліпептидами або антитілами, які містять першу Fc-область імуноглобуліну й першу ділянку зв'язування антигену, і другий поліпептид або антитіло, що містить другу Fc-область імуноглобуліну і другу ділянку зв'язування антигену.

Винаходом також передбачені композиції, які містять описані тут поліпептиди або антитіла і їх варіанти. Конкретні аспекти й втілення будуть описані нижче. Крім того, такі поліпептиди або антитіла можуть бути отримані відповідно до будь-якого описаного тут способу.

В одному аспекті даного винаходу передбачені композиції, які містять щонайменше один описаний тут поліпептид або антитіло.

В одному втіленні даного винаходу композиції містять один або кілька поліпептидів або антитіл відповідно до будь-якого описаного тут аспекту або втілення.

В одному втіленні даного винаходу композиції містять перший поліпептид або антитіло й другий поліпептид або антитіло, як описано тут у будь-якому аспекті або втіленні.

В одному аспекті композиція містить перший і другий поліпептид або антитіло, причому перший і другий поліпептид або антитіло містить Fc-область, яка включає:

(i) щонайменше одну заміну, яка посилює Fc-Fc мутацію; і

(ii) одну або кілька заміни, які є замінами із зв'язування C1q; і

(iii) додаткову мутацію, яка запобігає олігомеризації між Fc-областями з ідентичними додатковими мутаціями, причому перший і другий поліпептид або антитіло не містять однакових додаткових мутацій.

В одному втіленні даного винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло й другий поліпептид або антитіло, причому перший і другий поліпептид або антитіло містить i) щонайменше одну або кілька заміни, обраних із групи, яка складається з: E430, E345, або заміну S440Y або S440W, і ii) одну або кілька заміни у положенні, обраному із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, і iii) додаткову мутацію, причому перший і другий поліпептид або антитіло не містять однакових додаткових мутацій. Таким чином, композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, що містить другу Fc-область.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, що містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

(i) щонайменше одну або кілька заміни, обраних із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W; і

(ii) одну або кілька заміни у положенні, обраному із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396; і

(iii) додаткову заміну в положенні K439 або S440 за умови, що якщо додаткова заміна припадає на S440, то заміна згідно (i) не припадає на S440, за умови, що перша й друга Fc-області не містять додаткової заміни згідно (iii) у тому самому амінокислотному положенні,

(iv) причому заміни відповідають положенням амінокислот в IgG1 людини згідно нумерації EU.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, що містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-

області містять (i) першу мутацію, (ii) другу мутацію, (iii) додаткову мутацію, причому мутації відповідають наступним положенням амінокислот в IgG1 людини згідно нумерації EU:

(i) щонайменше одну або кілька замін, обраних із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W; i

5 (ii) одну або кілька замін у положенні, обраному із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396; i

(iii) додаткову заміну в положенні K439 в першій Fc-області й додаткову заміну в положенні S440 у другій Fc-області або навпаки, за умови, що якщо додаткова заміна перебуває в положенні S440, то перша заміна не припадає на S440;

10 (iv) причому заміни відповідають положенням амінокислот в IgG1 людини згідно нумерації EU.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-

15 області містять:

(i) щонайменше одну або кілька замін, обраних із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W; i

(ii) одну або кілька замін у положенні, обраному із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396; i

20 (iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області;

(iv) причому заміни відповідають положенням амінокислот в IgG1 людини згідно нумерації EU.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-

25 області містять:

(i) щонайменше одну або кілька замін, обраних із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W; i

30 (ii) одну або кілька замін у положенні, обраному із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396; i

(iii) додаткову заміну S440K у першій Fc-області й додаткову заміну K439E у другій Fc-області;

35 (iv) причому заміни відповідають положенням амінокислот в IgG1 людини згідно нумерації EU.

Таким чином, передбачені втілення, у яких і перший, і другий поліпептид або антитіло має підвищену агоністичну активність й/або активність CDC, або ж тільки перший або другий поліпептид має підвищену агоністичну активність й/або активністю CDC.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-

40 області містять:

(i) заміну в положенні амінокислоти, що відповідає E430; i

45 (ii) одну або кілька замін у положенні, обраному із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396; i

(iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-

50 області містять:

(i) заміну в положенні амінокислоти, що відповідає E345; i

(ii) одну або кілька замін у положенні, обраному із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396; i

55 (iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-

60 області містять:

(i) заміну E430G; i

(ii) одну або кілька замін, обраних із групи, яка складається з K326W, K326A, E333S, E333A, P396L, S267E, H268F, S324T, G263A, S324E, I332E i S239D; i

5 (iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

10 (i) заміну E430G; i

(ii) одну або кілька замін, обраних із групи, яка складається з K326W, K326A, E333S, E333A i P396L; i

(iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

15 В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

(i) заміну E430G; i

20 (ii) щонайменше дві заміни, обрані із групи, яка складається з K326W, K326A, E333S, E333A i P396L; i

(iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

25 В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

(i) заміну E430G; i

(ii) заміни K326W i E333S; i

30 (iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

35 (i) заміну E345K; i

(ii) одну або кілька замін, обраних із групи, яка складається з K326W, K326A, E333S, E333A, P396L, S267E, H268F, S324T, G263A, S324E, I332E i S239D; i

40 (iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

45 (i) заміну E345K; i

(ii) одну або кілька замін, обраних із групи, яка складається з K326W, K326A, E333S, E333A i P396L; i

(iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

50 В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

(i) заміну E345K; i

55 (ii) щонайменше дві заміни, обрані із групи, яка складається з K326W, K326A, E333S, E333A i P396L; i

(iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

60 В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке

містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

- (i) заміну E345K; i
- (ii) заміни K326W i E333S; i
- 5 (iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

- (i) заміну E345R; i
- (ii) одну або кілька заміни, обраних із групи, яка складається з K326W, K326A, E333S, E333A, P396L, S267E, H268F, S324T, G263A, S324E, I332E i S239D; i
- 10 (iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

- 20 (i) заміну E345R; i
- (ii) одну або кілька заміни, обраних із групи, яка складається з K326W, K326A, E333S, E333A i P396L; i
- (iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

- (i) заміну E345R; i
- 30 (ii) щонайменше дві заміни, обрані із групи, яка складається з K326W, K326A, E333S, E333A i P396L; i
- (iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

- (i) заміну E345R; i
- (ii) заміни K326W i E333S; i
- 40 (iii) додаткову заміну K439E у першій Fc-області й додаткову заміну S440K у другій Fc-області або навпаки.

В іншому втіленні винаходу композиція містить перший і другий поліпептид або антитіло, причому перший і другий поліпептид або антитіло містять Fc-область, яка включає:

- (i) щонайменше одну заміну, яка є мутацією, що посилює Fc-Fc;
- 45 (ii) додаткову мутацію, яка запобігає олігомеризації між Fc-областями з ідентичними додатковими мутаціями, причому перший і другий поліпептид або антитіло не містять однакових додаткових мутацій;

(iii) а або перша, або друга Fc-область містить одну або кілька заміни, які є замінами із зв'язування C1q. Таким чином, у деяких втіленнях тільки перший або другий поліпептид або антитіло містить другу мутацію, яка знижує Fc-ефекторні функції.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша й друга Fc-області містять:

- 55 (i) щонайменше одну або кілька заміни, обраних із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W;
- (ii) додаткову мутацію K439E або S440K, причому перша й друга Fc-область не містять однакових додаткових заміни, а якщо щонайменше одна заміна представлена S440Y або S440W, то додаткова мутація не представлена S440K;

(iii) а або перша, або друга Fc-область містить одну або кілька замінів у положенні, обраному із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша Fc-область містить (i) щонайменше одну або кілька замінів, обраних із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, ii) одну або кілька замінів у положенні, обраному із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, і iii) додаткову мутацію K439E; а друга Fc-область містить (i) щонайменше одну або кілька замінів, обраних із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, і ii) додаткову мутацію S440K. Таким чином, передбачені втілення, у яких тільки перший поліпептид або антитіло має підвищену агоністичну активність й/або підвищену активність CDC.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша Fc-область містить (i) щонайменше одну або кілька замінів, обраних із групи, яка складається з E430, E345, ii) одну або кілька замінів у положенні, обраному із групи, яка складається з G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 і P396, і iii) додаткову мутацію S440K; а друга Fc-область містить (i) щонайменше одну або кілька замінів, обраних із групи, яка складається з E430, E345, або заміну S440Y або S440W, і ii) додаткову мутацію K439E. Таким чином, передбачені втілення, у яких тільки перший поліпептид або антитіло має підвищену агоністичну активність й/або підвищеною активністю CDC.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша Fc-область містить (i) заміну E430G і ii) одну або кілька замінів, обраних із групи, яка складається з K326W, K326A, E333S, E333A і P396L, і iii) додаткову заміну K439E; а друга Fc-область містить (i) заміну E430G і ii) додаткову заміну S440K.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, яке має першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша Fc-область містить (i) заміну E430G і ii) одну або кілька замінів, обраних із групи, яка складається з K326W, K326A, E333S, E333A і P396L, і iii) додаткову заміну S440K; а друга Fc-область містить (i) заміну E430G і ii) додаткову заміну K439E.

В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша Fc-область містить (i) заміну E430G, ii) заміни K326W і E333S і iii) додаткову заміну S440K; а друга Fc-область містить (i) заміну E430G і ii) додаткову заміну K439E. В одному втіленні винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло, що містить першу ділянку зв'язування антигену й першу Fc-область, і другий поліпептид або антитіло, яке містить другу ділянку зв'язування антигену й другу Fc-область, причому перша Fc-область містить (i) заміну E430G, ii) заміни K326W і E333S і iii) додаткову заміну K439E; а друга Fc-область містить (i) заміну E430G і ii) додаткову заміну S440K.

В одному втіленні даного винаходу композиція містить поліпептид або антитіло, здатне зв'язуватися із представником суперродини рецепторів фактора некрозу пухлин (TNFR-SF) або суперродини сполучених з G-Білком рецепторів (GPCR)

В одному втіленні даного винаходу композиція містить поліпептид або антитіло, здатне зв'язуватися із представником TNFR-SF, обраним із групи, яка складається з TNFR1, FAS, DR3, DR4, DR5, DR6, NGFR, EDAR, Dcr1, Dcr2, Dcr3, OPG, TROY, XEDAR, Ltbr, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, GITR і RELT.

В одному втіленні даного винаходу композиція містить поліпептид або антитіло, здатне зв'язуватися із представником TNFR-SF із внутрішньоклітинним доменом смерті, обраним з наступної групи, яка складається з TNFR1, FAS, DR3, DR4, DR5, DR6, NGFR і EDAR.

В одному втіленні даного винаходу композиція містить поліпептид або антитіло, здатне зв'язуватися із представником TNFR-SF без внутрішньоклітинного домена смерті, обраного з наступної групи, яка складається з Dcr1, Dcr2, Dcr3, OPG, TROY, XEDAR, Ltbr, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, GITR, RELT.

В одному втіленні даного винаходу композиція містить поліпептид або антитіло, здатне зв'язуватися із представником TNFR-SF, що належать до групи імуноактиваторів, що складається з OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, GITR і RELT.

В одному втіленні даного винаходу композиція містить поліпептид або антитіло, причому перший поліпептид і другий поліпептид зв'язуються з різними епітопами на одному або декількох представниках TNFR-SF без внутрішньоклітинного домена смерті, обраних з наступної групи, яка складається з OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, GITR і RELT.

В одному втіленні даного винаходу композиція містить поліпептид або антитіло, причому перший поліпептид зв'язується з одним представником TNFR-SF без внутрішньоклітинного домена смерті, обраного з наступної групи, яка складається з OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, GITR і RELT, і не блокує зв'язування другого антитіла, що зв'язується з одним представником TNFR-SF без внутрішньоклітинного домена смерті, обраного з наступної групи, яка складається з OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, GITR і RELT.

В одному втіленні даного винаходу композиція містить перший поліпептид або антитіло й другий поліпептид або антитіло, які присутні в композиції в молярному співвідношенні від 1:49 до 49:1, наприклад у молярному співвідношенні 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, у співвідношенні 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1.

В одному втіленні даного винаходу композиція містить перший поліпептид і другий поліпептид і/або будь-який додатковий поліпептид, які присутні в композиції в еквімолярному співвідношенні.

В одному втіленні даного винаходу композиція відповідно до будь-якого аспекту або втілення є фармацевтичною композицією.

Терапевтичні застосування

Поліпептиди, антитіла, біспецифічні антитіла або композиції, які відповідають кожному з аспектів або втілень даного винаходу можуть застосовуватися як лікарські засоби, тобто для терапевтичного застосування.

В одному аспекті даного винаходу передбачені поліпептиди, антитіла або композиції, які відповідають кожному з наведених тут аспектів або втілень для застосування їх як лікарських засобів.

В іншому аспекті даного винаходу передбачені поліпептиди, антитіла або композиції, які відповідають кожному з наведених тут аспектів або втілень для застосування їх при лікуванні раку, аутоімунних захворювань, запальних захворювань або інфекційних захворювань.

В іншому аспекті даного винаходу передбачений спосіб лікування осіб із захворюваннями, який передбачає введення їм ефективної кількості поліпептиду, антитіла або композиції які відповідають кожному з наведених тут аспектів або втілень.

В одному втіленні захворювання вибирають із групи ракових, аутоімунних захворювань, запальних захворювань і інфекційних захворювань.

В одному втіленні спосіб відповідно до кожного з наведених тут аспектів або втілень також передбачає введення додаткового терапевтичного засобу.

В одному втіленні додатковим терапевтичним засобом є один або кілька протиракових засобів, обраних із групи, яка складається з хіміотерапевтичних засобів (включаючи, без обмеження, паклітаксель, темозоломід, цисплатин, карбоплатин, оксаліплатин, іринотекан, доксорубіцин, гемцитабін, 5-фторурацил, пеметрексед), інгібітори кіназ (включаючи, без обмеження, сорафеніб, сунітиніб або еверолімус), засоби, які модулюють апоптоз (включаючи, без обмеження, рекомбінантний TRAIL людини або біринапант), інгібітори RAS, інгібітори протеасом (включаючи, без обмеження, бортезоміб), інгібітори гістондеацетилази (включаючи, без обмеження, вориностат), нутрицевтики, цитокіни (включаючи, без обмеження, IFN- γ), антитіла або міметики антитіл (включаючи, без обмеження, антитіла проти EGFR, проти IGF-1R, проти VEGF, проти CD20, проти CD38, проти HER2, проти PD-1, проти PD-L1, проти CTLA4, проти CD40, проти CD137, проти GITR і міметики антитіл), кон'югати типу антитіло-лікарський засіб.

Набори

Передбачається, що описані нижче втілення з посиланням на поліпептиди або антитіла відносяться до поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування антигену, причому поліпептиди або антитіла також можуть бути мультиспецифічними поліпептидами або антитілами, які містять першу Fc-область

імуноглобуліну й першу ділянку зв'язування антигену, і другий поліпептид або антитіло, що містить другу Fc-область імуноглобуліну і другу ділянку зв'язування антигену.

Винаходом також передбачені набори для одночасного, роздільного або послідовного застосування в терапії, які включають описані тут поліпептиди або антитіла. Крім того, такі варіанти можуть бути отримані кожним з описаних тут способів.

В одному аспекті даного винаходу передбачені набори, які включають поліпептиди, антитіла або композиції відповідно до кожного з описаних тут аспектів або втілень, причому дані поліпептиди, антитіла або композиції перебувають в одному або декількох контейнерах типу флаконів.

В одному втіленні даного винаходу набір містить поліпептид, антитіло або композицію відповідно до кожного з описаних тут аспектів або втілень для одночасного, роздільного або послідовного застосування в терапії.

В іншому аспекті даного винаходу передбачене застосування поліпептидів, антитіл, композицій або наборів відповідно до кожного з описаних тут втілень для застосування в способах діагностики.

В іншому аспекті даного винаходу передбачені способи діагностики, які включають введення поліпептидів, антитіл, композицій або наборів відповідно до кожного з описаних тут втілень щонайменше в одну частину організму людини або інших ссавців.

В іншому аспекті даного винаходу передбачене застосування поліпептидів, антитіл, композицій або наборів відповідно до кожного з описаних тут втілень при візуалізації щонайменше частини організму людини або інших ссавців.

В іншому аспекті даного винаходу передбачені способи візуалізації щонайменше частини організму людини або інших ссавців, що включають введення варіантів, композицій або наборів відповідно до кожного з описаних тут втілень.

Інші застосування

Передбачається, що описані нижче втілення з посиланням на поліпептиди або антитіла відносяться до поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування антигену, причому поліпептиди або антитіла також можуть бути мультиспецифічними поліпептидами або антитілами, які містять першу Fc-область імуноглобуліну й першу ділянку зв'язування антигену, і другий поліпептид або антитіло, що містить другу Fc-область імуноглобуліну і другу ділянку зв'язування антигену.

У наступному аспекті винаходу передбачені поліпептиди й антитіла запропоновані винаходом, як описано вище, для застосування їх як лікарських засобів, зокрема, для застосування їх як лікарських засобів для лікування захворювань або розладів. Приклади таких захворювань і розладів включають, без обмеження, ракові, аутоімунні захворювання, запальні захворювання, інфекційні захворювання, бактеріальні, вірусні або грибкові інфекції.

В іншому аспекті даного винаходу передбачені поліпептиди, антитіла, біспецифічні антитіла, композиції й набори, описані тут, для лікування таких захворювань, як рак.

В іншому аспекті даного винаходу передбачені способи лікування захворювань у людей, які передбачають введення описаних тут варіантів, композицій або наборів.

В іншому аспекті даного винаходу передбачені способи лікування рака в людей, які передбачають введення варіантів, композицій або наборів.

“Лікування” означає введення ефективної кількості терапевтично активної сполуки запропонованої даним винаходом з метою ослаблення, полегшення, припинення або усунення (лікування) симптомів або захворювань.

“Ефективна кількість” або “терапевтично ефективна кількість” означає кількість, яка за необхідних доз і тривалості є ефективною для досягнення необхідного терапевтичного результату. Терапевтично ефективна кількість антитіла може варіюватися залежно від таких факторів, як захворювання, вік, стать й вага індивіда й здатність антитіла викликати необхідну реакцію в індивіда. Терапевтично ефективна кількість також означає кількість, в якій будь-які токсичні або шкідливі ефекти антитіла або частини антитіла переважаються терапевтично корисними ефектами.

Дозування

Передбачається, що описані нижче втілення з посиланням на поліпептиди або антитіла відносяться до поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування антигену, причому поліпептиди або антитіла також можуть бути мультиспецифічними поліпептидами або антитілами, які містять першу Fc-область імуноглобуліну й першу ділянку зв'язування антигену, і другий поліпептид або антитіло, що містить другу Fc-область імуноглобуліну і другу ділянку зв'язування антигену.

Ефективні дози й схеми дозування для антитіл залежать від захворювання або стану, які підлягають лікуванню й можуть бути визначені фахівцями в даній галузі. Типовий необмежувальний діапазон для терапевтично ефективної кількості антитіл запропонованих даним винаходом становить від 0,1 до 100 мг/кг, наприклад від 0,1 до 50 мг/кг, наприклад, від 0,1 до 20 мг/кг, наприклад від 0,1 до 10 мг/кг, наприклад, близько 0,5, приблизно 0,3, приблизно 1, приблизно 3, приблизно 5 або 8 мг/кг.

Поліпептиди або антитіла запропоновані даним винаходом також можна вводити при комбінованій терапії, тобто в комбінації з іншими терапевтичними засобами, придатними для лікування відповідного захворювання або стану. Відповідно, в одному втіленні лікарські засоби, які містять антитіла призначаються в комбінації з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами типу цитотоксичних, хіміотерапевтичних або антиангіогенних засобів. Таке комбіноване введення може бути одночасним, роздільним або послідовним.

У наступному втіленні даного винаходу передбачені способи лікування або профілактики захворювань типу рака, які передбачають введення особам, які цього потребують терапевтично ефективною кількістю варіанта або фармацевтичної композиції запропонованої даним винаходом в комбінації із променевою терапією й/або хірургією.

Способи одержання

Передбачається, що описані нижче втілення з посиланням на поліпептиди або антитіла відносяться до поліпептидів або антитіл, які містять Fc-область імуноглобуліну й ділянку зв'язування антигену, причому поліпептиди або антитіла також можуть бути мультиспецифічними поліпептидами або антитілами, які містять першу Fc-область імуноглобуліну й першу ділянку зв'язування антигену, і другий поліпептид або антитіло, що містить другу Fc-область імуноглобуліну і другу ділянку зв'язування антигену.

Винаходом також передбачені виділені нуклеїнові кислоти й вектори, які кодують варіанти згідно з кожним з описаних вище аспектів, а також вектори й системи експресії, які кодують ці варіанти. Придатні конструкції з нуклеїнових кислот, вектори й системи експресії антитіл і їх варіантів відомі в даній галузі й описані в прикладах. У тих втіленнях, у яких варіанти містять не тільки важкий ланцюг (або її Fc-вмісний фрагмент), але також і легкий ланцюг, послідовності нуклеотидів, які кодують частини важких і легких ланцюгів, можуть перебувати в тих самих або в різних нуклеїнових кислотах або векторах.

Винаходом також передбачений спосіб одержання в клітинах-хазяїнах поліпептидів або антитіл відповідно до кожного з описаних вище аспектів, причому поліпептиди або антитіла містять щонайменше Fc-область важкого ланцюга, а даний спосіб передбачає наступні стадії:

- а) одержання нуклеотидної конструкції, яка кодує Fc-область даного варіанта,
- б) експресування даної нуклеотидної конструкції в клітинах-хазяїнах і
- с) виділення даного варіанта антитіл із клітинної культури даних клітин-хазяїнів.

У деяких втіленнях антитіло є антитілом з важкого ланцюга. Однак у більшості втілень антитіло також містить і легкий ланцюг, тому дані клітини-хазяїни також експресують конструкцію, яка кодує легкий ланцюг, у тому ж або в іншому векторі.

Клітини-хазяїни, придатні для рекомбінантної експресії антитіл, добре відомі в даній галузі й включають клітини CHO, HEK-293, Expi293, PER-C6, NS/0 і Sp2/0. В одному втіленні такі клітини-хазяїни є клітини, які здатні до Asn-зв'язаного глікозилювання білків, наприклад, еукаріотичні клітини типу клітин ссавців, наприклад, клітини людини. В іншому втіленні такі клітини-хазяїни є не людськими клітинами, які піддаються генетичній інженерії для вироблення глікопротеїну з глікозилюванням типу людського або людського. Приклади таких клітин є: генетично модифіковані *Pichia pastoris* (Hamilton et al., Science 301 (2003) 1244-1246; Potgieter et al., J. Biotechnology 139 (2009) 318-325) і генетично модифіковані *Lemna minor* (Cox et al., Nature Biotechnology 12 (2006) 1591-1597).

В одному втіленні клітини-хазяїни є такими клітинами, які не здатні ефективно видаляти C-кінцеві залишки лізину K447 з важких ланцюгів антитіл. Наприклад, у табл. 2 з Liu et al. (2008) J Pharm Sci. 97: 2426 (включене тут як посилання) перерахований цілий ряд таких систем одержання антитіл, наприклад, Sp2/0, NS/0 або трансгенні молочні залози (кози), у яких відбувається тільки часткове видалення C-кінцевих лізінів. В одному втіленні клітини-хазяїни є клітинами зі зміненим механізмом глікозилювання. Такі клітини були описані в даній галузі й можуть застосовуватися як клітини-хазяїни, у яких можна експресувати запропоновані винаходом варіанти й при цьому одержувати антитіла зі зміненим глікозилюванням. Наприклад, див. Shields R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1; а також EP 1176195; WO 03/035835; і WO 99/54342. Відомі й інші методи одержання інженерних глікоформ, включаючи, без обмеження, методи, описані в Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng. 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al.,

2003, J Biol Chem. 278:3466-3473), US 6602684, WO 00/61739A1; WO 01/292246A1; WO 02/311140A1; WO 02/30954A1; технологію Potelligent™ (Biowa, Inc., Princeton, N.J.); технологію інженерії глікозилювання Glycomab™ (GLYCART Biotechnology AG, Zurich, Switzerland); US 2003/0115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49.

5 Винаходом також передбачені антитіла, отримані або які можуть бути отримані описаним вище запропонованим винаходом способом.

У наступному аспекті винаходу передбачені клітини-хазяїни, здатні виробляти запропоновані винаходом поліпептиди або антитіла. В одному втіленні клітини-хазяїни трансформовані або трансфіковані запропонованою винаходом нуклеотидною конструкцією.

10 Далі даний винахід розкривається на наступних прикладах, які не слід розглядати як додаткові обмеження.

Таблиця 1

SEQ ID NO:	Назва	Послідовність	Клон
SEQ ID NO: 1	VH hDR5-01-G56T CDR1	GFNIKDTF	hDR5-01-G56T
SEQ ID NO: 2	VH hDR5-01-G56T CDR2	IDPANTNT	
SEQ ID NO: 3	VH hDR5-01-G56T CDR3	VRGLYTYFFDY	
SEQ ID NO: 4	VH hDR5-01-G56T	EVQLQQSGAEVVKPGA SVKLSCKASGFNIKDTF IHWVKQAPGQGLEWIG RIDPANTNTKYDPKFQG KATITTTDTSSNTAYMELS SLRSEDTAVYYCVRGLY TYFFDYWGQGTLLTVSS	
SEQ ID NO: 5	HC hDR5-01-G56T	EVQLQQSGAEVVKPGAS VKLSCKASGFNIKDTFIHW VKQAPGQGLEWIGRIDPA NTNTKYDPKFQGGKATITTTDT SSNTAYMELSSLRSEDTAVY YCVRLYTYFFDYWGQGTLLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 6	VL hDR5-01 CDR1	QSIENN	
	VL hDR5-01 CDR2	FAS	
SEQ ID NO: 7	VL hDR5-01 CDR3	QQGNSWPYT	
SEQ ID NO: 8	VL hDR5-01	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSIENNLHWYQQKPGQA PRLLIKFASQSITGIPARFSGSG SGTEFTLTISLQSEDAVYYC QQGNSWPYTFGQGTKLEIK	

SEQ ID NO: 9	LC hDR5-01	EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRASQSSISNNLHWYQQKPG QAPRLLIKFAQSITGIPARFS GSGSGTEFTLTISSLQSEDF VYYCQQGNSWPYTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 10	VH hDR5-05 CDR1	GFNIKDTH	hDR5-05
SEQ ID NO: 11	VH hDR5-05 CDR2	IDPANGNT	
SEQ ID NO: 12	VH hDR5-05 CDR3	ARWGTNVYFAY	
SEQ ID NO: 13	VH hDR5-05	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGFNIKDTHMHWVRQA PGQRLEWIGRIDPANGNTEY DQKFQGRVTITVDTASASTAY MELSSLRSEDTAVYYCARW GTNVYFAYWGQGTLLTVSS	
SEQ ID NO: 14	HC hDR5-05	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGFNIKDTHMHWVR QAPGQRLEWIGRIDPANGN TEYDQKFQGRVTITVDTAS TAYMELSSLRSEDTAVYYCA RWGTNVYFAYWGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 15	VL hDR5-05 CDR1	SSVSY	
	VL hDR5-05 CDR2	RTS	
SEQ ID NO: 16	VL hDR5-05 CDR3	QQYHSYPPT	
SEQ ID NO: 17	VL hDR5-05	DIQLTQSPSSLSASVGDVR TITCSASSSVSYMYWYQQ KPGKAPKPWIYRTSNLASG VPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQYHSYPP TFGGGTKVEIK	

SEQ ID NO: 18	LC hDR5-05	DIQLTQSPSSLSASVGDRV TITCSASSSVSYMYWYQQK PGKAPKPWIYRTSNLASGV PSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQQYHSYPP TFGGGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	
SEQ ID NO: 19	VH CONA-C49W- CDR1	GGSISSGDYF	IgG1-CONA-C49W
SEQ ID NO: 20	VH CONA-C49W- CDR2	IHNSGTT	
SEQ ID NO: 21	VH CONA-C49W- CDR3	ARDRGGDYYYGMDV	
SEQ ID NO: 22	VH CONA-C49W- C49W	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGGSISSGDYFW SWIRQLPGKGLEWIGHIHN SGTTYYNPSLKSRTISVD TSKKQFSLRLSSVTAADTA VYYCARDRGGDYYYGMD VWGQGTITVTVSS	
SEQ ID NO: 23	HC CONA-C49W	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGGSISSGDYFWS WIRQLPGKGLEWIGHIHN GTTYYNPSLKSRTISVDT KKQFSLRLSSVTAADTA VYYCARDRGGDYYYGMDV WGQGTITVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQK SLSLSPGK	
SEQ ID NO: 24	VL CONA-C49W- CDR1	QGISRSY	
	VL CONA-C49W- CDR2	GAS	
SEQ ID NO: 25	VL CONA-C49W- CDR3	QQFGSSPWT	

SEQ ID NO: 26	VL CONA-C49W	EIVLTQSPGTLSLSPGER ATLSCRASQGISRSYLAW YQQKPGQAPSLLIYGASS RATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQ FGSSPWTFGQGTKVEIK	
SEQ ID NO:27	LC CONA-C49W	EIVLTQSPGTLSLSPGER ATLSCRASQGISRSYLAW YQQKPGQAPSLLIYGASS RATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQ QFGSSPWTFGQGTKVEIK EIVLTQSPGTLSLSPGER ATLSCRASQGISRSYLAW YQQKPGQAPSLLIYGASS RATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQ QFGSSPWTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLNNFYP REAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTY SLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	
SEQ ID NO: 28	VH 7D8 CDR1	GFTFHDYA	7D8
SEQ ID NO: 29	VH 7D8 CDR2	ISWNSGTI	
SEQ ID NO: 30	VH 7D8 CDR3	AKDIQYGNYYYGMDV	
SEQ ID NO: 31	VH 7D8	EVQLVESGGGLVQPD RSLRLSCAASGFTFH DYAMHWVRQAPGKG LEWVSTISWNSGTIG YADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAE DTALYYCAKDIQYGN YYYGMDVWGQGTITVSS	

SEQ ID NO: 32	HC 7D8	EVQLVESGGGLVQPD RSLRLSCAASGFTFHD YAMHWVRQAPGKGL EWVSTISWNSGTIGY ADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAE DTALYYCAKDIQYG NYYYGMDVWGQGT TVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 33	VL 7D8 CDR1	QSVSSY	
	VL 7D8 CDR2	DAS	
SEQ ID NO: 34	VL 7D8 CDR3	QQRSNWPIT	
SEQ ID NO: 35	VL 7D8	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGGT DFTLTISLEPEDFAVYY CQQRSNWPITFGQGT RLEIK	
SEQ ID NO: 36	LC 7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGGT DFTLTISLEPEDFAVY YCQQRSNWPITFGQGT RLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	
SEQ ID NO: 37	VH 11B8 CDR1	GFTFSYHA	11B8
SEQ ID NO: 38	VH 11B8CDR2	IGTGGVT	
SEQ ID NO: 39	VH 11B8CDR3	ARDYYGAGSFYDGLYGMDV	

SEQ ID NO: 40	VH 11B8	EVQLVQSGGGLVHPGG SLRLSCTGSGFTFSYHA MHWVRQAPGKGLEWV SIIGTGGVTYYADSVKG RFTISRDNVKNLSLYLQ MNSLRAEDMAVYYC ARDYYGAGSFYDGLY GMDVWGQGTTTVTVSS	
SEQ ID NO: 41	HC 11B8	EVQLVQSGGGLVHPG GSLRLSCTGSGFTFS YHAMHWVRQAPGKG LEWVSIIGTGGVTYYA DSVKGRFTISRDNVK NSLYLQMNSLRAED MAVYYCARDYYGAG SFYDGLYGMDVWGQ GTTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVD KRVEPKSCDKHTTCP PCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 42	VL 11B8CDR1	QSVSSY	
	VL 11B8 CDR2	DAS	
SEQ ID NO: 43	VL 11B8 CDR3	QQRSDWPLT	
SEQ ID NO: 44	VL 11B8	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQ RSDWPLTFGGGGTKVEIK	

SEQ ID NO: 45	LC 11B8	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLT SSLEPEDFAVYYCQQRSD WPLTFGGGKTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 46	VH ALEM CDR1	GFTFTDFY	алемтузу маб
SEQ ID NO: 47	VH ALEM CDR2	IRDKAKGYTT	
SEQ ID NO: 48	VH ALEM CDR3	AREGHTAAPFDY	
SEQ ID NO: 49	VH ALEM	QVQLQESGPGLVRPSQ TSLTCTVSGFTFTDFYM NWVRQPPGRGLEWIGFI RDKAKGYTTEYNPSVKG RVTMLVDTSKNQFSLRLS SVTAADTAVYYCAREGHT AAPFDYWGGQSLVTVSS	
SEQ ID NO: 50	HC ALEM	QVQLQESGPGLVRPSQTL SLTCTVSGFTFTDFYMNW VRQPPGRGLEWIGFIRDKA KGYTTEYNPSVKGRVTML VDTSKNQFSLRLSSVTAAD TAVYYCAREGHTAAPFDY WGQGS�VTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRV KSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 51	VL ALEM CDR1	QNIDKY	
	VL ALEM CDR2	NTN	
SEQ ID NO: 52	VL ALEM CDR3	LQHISRPT	
SEQ ID NO: 53	VL ALEM	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQNIDKYLNW YQQKPGKAPKLLIYNTNN LQTGVPSRFSGSGSGTD FTFTISLQPEDATYYCL QHISRPTFGQGTKVEIK	

SEQ ID NO: 54	LC ALEM	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCKASQNIDKYLNWYQ QKPGKAPKLLIYNTNNLQT GVPSRFSGSGSGTDFTFT ISSLPEDIAITYYCLQHISR PRTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSPVT KSFNRGEC	
SEQ ID NO: 55	VH 2F8 CDR1	GFTFSTYG	2F8
SEQ ID NO: 56	VH 2F8 CDR2	IWDDGSYK	
SEQ ID NO: 57	VH 2F8 CDR3	ARDGITMVRGVMKDYFDY	
SEQ ID NO: 58	VH 2F8	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFSTYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIW DDGSYKYYGDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDGITMVRG VMKDYFDYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO: 59	HC 2F8	QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSTYGMHW VRQAPGKGLEWVAVIWDD GSYKYYGDSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDGITMVRGVMKDY FDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPS CDKTHCTCPPELLEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRT EVTQVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 60	VL 2F8 CDR1	QDISSA	
	VL 2F8 CDR2	DAS	
SEQ ID NO: 61	VL 2F8 CDR3	QQFNSYPLT	
SEQ ID NO: 62	VL 2F8	AIQLTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDISSALVWY QQKPGKAPKLLIYDASSLE SGVPSRFSGSESGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQF NSYPLTFGGGTKVEIK	

SEQ ID NO: 63	LC 2F8	AIQLTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDISSALVWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLES GVPSRFSGSESGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFNS YPLTFGGGKTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPRKAVQWK VDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 64	VH b12 CDR1	GYRFSNFV	b12
SEQ ID NO: 65	VH b12 CDR2	INPYNGNK	
SEQ ID NO: 66	VH b12 CDR3	ARVGPYSWDDSPQD NYYMDV	
SEQ ID NO: 67	VH b12	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCQASGYRFSNFVIH WVRQAPGQRFWMGWI NPYNGNKEFSAKFQDRV TFTADTSANTAYMELRSL RSADTAVYYCARVGPYS WDDSPQDNYYMDVWGK GTTVIVSS	
SEQ ID NO: 68	HC b12	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCQASGYRFSNFVIHW VRQAPGQRFWMGWIN PYNGNKEFSAKFQDRV FTADTSANTAYMELRSL RSADTAVYYCARVGPY SWDDSPQDNYYMDVW GKGTTVIVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFPYPSDI AVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 69	VL b12 CDR1	HSIRSRR	
	VL b12 CDR2	GVS	
SEQ ID NO: 70	VL b12 CDR3	QVYGASSYT	

SEQ ID NO: 71	VL b12	EIVLTQSPGTLSSLSPGERA TFSCRSSHHSIRSRRAVWY QHKGPGQAPRLVIHGVS RASGISDRFSGSGSGTD FTLTITRVEPEDFALYYC QVYGASSYTFGQGTKLERK	
SEQ ID NO: 72	LC b12	EIVLTQSPGTLSSLSPGER ATFSCRSSHHSIRSRRAVW YQHKPGQAPRLVIHGVS NRASGISDRFSGSGSGT DFTLTITRVEPEDFALYY CQVYGASSYTFGQGTK LERKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCCLNN FYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	
SEQ ID NO: 73	Fc IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPPKPD TLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 74	Fc IgG1m(z)	ASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSL SLSPGK	
SEQ ID NO: 75	Fc IgG1m(a)	ASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKPVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVME ALHNHYTQKSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 76	Fc IgG1m(x)	ASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKPVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFS CSVMHEGLHNHYTQ KSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 77	Fc IgG1m(f)-E430G	ASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPV LDSDGDSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCS VMHGALHNHYTQKSL SLSPGK	

SEQ ID NO: 78	Fc IgG1m(f)-E345K	ASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISK AKGQPRKPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 79	Fc IgG1m(f)- K326A/E333A/ P396L	ASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNALPA PIAKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPL VLDSGDSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 80	Fc IgG1m(f)- K326A/E333A/ P396L/E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNAALPAPIAK TISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPLV LDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCVS MHGALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 81	Fc IgG1m(f)-K326A/ E333A	ASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNAALPAPIAKTISK AKGQPREPQVYTLT PSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 82	Fc IgG1m(f)-K326A/ E333A/E430G	ASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYK CKVSNAAALPAPIAKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCS VMHGALHNHYTQKSL SLSPGK	
SEQ ID NO: 83	Fc IgG1m(f)- K326A/P396L/ E430G	ASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNAAAL PAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNY KTTPLVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHGALHNHYT QKSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 84	Fc IgG1m(f)-E333A/ P396L/ E430G	ASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALP APIAKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENN YKTTPLVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHGALHN HYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 85	Fc IgG1m(f)-I253D/ K322A	ASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMD SRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCAVSN KALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 86	Fc IgG1m(f)-K326W/ E333S	ASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEY KCKVSNWALPAPISK TISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHGALHN HYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 87	Fc IgG1m(f)-K326W/ E333S/ E430G	ASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTVP SSLGTQTYICNVNHHK PSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEY KCKVSNWALPAPISK TISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHGALHNHY TQKSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 88	Fc IgG1m(f)-S267E/ H268F/ S324T/ E430G	ASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDV EFEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV TNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVF SCSVMHGALHNHYT QKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 89	Fc IgG113F [Fc IgG1(f)m- K274Q/N276K/ Y300F/A339T/ N384S/K392N/ V397M/V422I]	ASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHE DPEVQFKWYVDG VEVHNAKTKPREE QYNSTFRVSVLT VLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEK TISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDI AVEWESSGQPENNY NTTPPMLDSGSFF LYSKLTVDKSRWQQ GNIFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 90	Fc IgG113F-E430G	ASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFKWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTFRVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK TKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES SGQPENNYNTTPML DSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNIFSCSV HGHVHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 91	VH BMS-663513 CDR1	GGSFSGYY	BMS-663513
SEQ ID NO: 92	VH BMS-663513 CDR2	INHGGYV	
SEQ ID NO: 93	VH BMS-663513 CDR3	ARDYGPNGYDWYFDL	
SEQ ID NO: 94	VH BMS-663513	QVQLQQWGAGLLKPS ETLSLTCAVYGGSFSG YYWSWIRQSPEKGLE WIGGINHGGYVTYNPS LESRTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYC ARDYGPNGYDWYFDL WGRGTLTVSS	
SEQ ID NO: 95	VL BMS-663513 CDR1	QSVSSY	
	VL BMS-663513 CDR2	DAS	
SEQ ID NO: 96	VL BMS-663513 CDR3	QQRSNWPPALT	
SEQ ID NO: 97	VL BMS-663513	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAHYQQKPGQAPR LLIYDASNRATGIPAR FSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYCQQRS NWPPALTFGGGTKVEIK	
SEQ ID NO: 98	VH CD134-SF2 CDR1	GYTFKDYT	CD134-SF2
SEQ ID NO: 99	VH CD134-SF2 CDR2	IYPNNGGS	
SEQ ID NO: 100	VH CD134-SF2 CDR3	ARMGYHGPHLDFDV	

SEQ ID NO: 101	VH CD134-SF2	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGYTFKDY TMHWVRQAPGQGLEW IGGIYPNNGGSTYNQN FKDRVTLTADKSTSTA YMESSLRSEDTAVYY CARMGYHGPHLDFDV WGQGTTTVTVSS	
SEQ ID NO: 102	VL CD134-SF2 CDR1	QDVGAA	
	VL CD134-SF2 CDR2	WAS	
SEQ ID NO: 103	VL CD134-SF2 CDR3	QQYINYPLT	
SEQ ID NO: 104	VL CD134-SF2	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITITCKASQD VGA AVAWYQQKPG KAPKLLIWASTRH TGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDF ATYYCQQYINYPLT FGGGTKVEIK	
SEQ ID NO: 105	VH CD137- MOR7480 CDR1	GYSFSTYW	CD137-MOR7480
SEQ ID NO: 106	VH CD137- MOR7480 CDR2	IYPGDSYT	
SEQ ID NO: 107	VH CD137- MOR7480 CDR3	ARGYGIFDY	
SEQ ID NO: 108	VH CD137- MOR7480	EVQLVQSGAEVKK PGESLRISCKGSGY SFSTYWISWVRQM PGKGLEWMGKIYP GDSYTNYSFQ QVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMY YCARGYGIFDYWG QGTLTVTVSS	
SEQ ID NO: 109	VL CD137- MOR7480 CDR1	NIGDQY	
	VL CD137- MOR7480 CDR2	QDK	
SEQ ID NO: 110	VL CD137- MOR7480 CDR3	ATYTGFGSLAV	
SEQ ID NO: 111	VL CD137- MOR7480	SYELTQPPSVSVSP GQTASITCSGDNIG DQYAHWYQQKPG QSPVLVIYQDKNRP SGIPERFSGNSGN TATLTISGTQAMDEA DYCATYTGFGSLAV FGGGTKLTVL	
SEQ ID NO: 112	VH CD40- CP870893 CDR1	GYTFTGY	CD40-CP870893
SEQ ID NO: 113	VH CD40- CP870893 CDR2	INPDSSGT	
SEQ ID NO: 114	VH CD40- CP870893 CDR3	ARDQPLGYCTNG VCSYFDY	

SEQ ID NO: 115	VH CD40-CP870893	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYT FTGYMHWRQAP QGQLEWMGWINPD SGGTNYAQKFQGRV TMTRDTSISTAYMEL NRLRSDDTAVYYCAR DQPLGYCTNGVCSYF DYWGQGTSLTVSS	
SEQ ID NO: 116	VL CD40-CP870893 CDR1	QGIYSW	
	VL CD40-CP870893 CDR2	TAS	
SEQ ID NO: 117	VL CD40-CP870893 CDR3	QQANIFPLT	
SEQ ID NO: 118	VL CD40-CP870893	DIQMTQSPSSVSASV GDRVITICRASQGIY SWLAWYQQKPGKAP NLLIYTASTLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQA NIFPLTFGGGTKVEIK	
SEQ ID NO: 119	VH CD40-SGN40 CDR1	GYSFTGY	CD40-SGN40
SEQ ID NO: 120	VH CD40-SGN40 CDR2	VIPNAGGT	
SEQ ID NO: 121	VH CD40-SGN40 CDR3	AREGIYW	
SEQ ID NO: 122	VH CD40-SGN40	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGYSFT GYYIHWVRQAPGKG LEWVARVIPNAGGTS YNQKFGRFTLSVD NSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARE GIYWWGQGTSLTVSS	
SEQ ID NO: 123	VL CD40-SGN40 CDR1	QSLVHSNGNTF	
	VL CD40-SGN40 CDR2	TVS	
SEQ ID NO: 124	VL CD40-SGN40 CDR3	SQTTHVPWT	
SEQ ID NO: 125	VL CD40-SGN40	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRSSQSLVHSNGN TFLHWYQQKPGKAPKLL IYTVSNRFSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPE DFATYFCSQTTHVPWT FGQGTKVEIK	
SEQ ID NO: 126	VH CD95-APO1 CDR1	GFTFNTNA	CD95-APO1
SEQ ID NO: 127	VH CD95-APO1 CDR2	IRSKSNNYAT	
SEQ ID NO: 128	VH CD95-APO1 CDR3	VTDGY	

SEQ ID NO: 129	VH CD95-APO1	EVQLVETGGGLVQPKG SLKLSCAASGFTFNTN AMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKSNNYATYYA ESVKDRFTISRDDSQS MLYLQMNNLKAEDTA MYYCVTDGYYWGQG TTLTVSS	
SEQ ID NO: 130	VL CD95-APO1 CDR1	ESVEYYGTSL	
	VL CD95-APO1 CDR2	VAS	
SEQ ID NO: 131	VL CD95-APO1 CDR3	QQSTKVPWT	
SEQ ID NO: 132	VL CD95-APO1	DIVLTQSPASLAVSLGQ RATISCRASESVEYYG TSLMQWYQQKPGQPP KLLIYVASNVESGVPA RFSGSGSGTDFSLNIH PVEEDDIAMYFCQQS TKVPWTFGGGTKLEIK	
SEQ ID NO: 133	VH CD95-HFE7A CDR1	GYTFTSYW	CD95-HFE7A
SEQ ID NO: 134	VH CD95-HFE7A CDR2	IDPSDSYT	
SEQ ID NO: 135	VH CD95-HFE7A CDR3	ARNRDYSNNWYFDV	
SEQ ID NO: 136	VH CD95-HFE7A	QVQLQQPGAELVKPG ASVKLSCKASGYTFT SYWMQWVKQRPGQ GLEWIGEIDPSDSYTN YNQKFKGKATLTVD SSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARNRDYSN NWYFDVWGTGTTVTVSS	
SEQ ID NO: 137	VL CD95-HFE7A CDR1	QSVDDYDGDSY	
	VL CD95-HFE7A CDR2	AAS	
SEQ ID NO: 138	VL CD95-HFE7A CDR3	QQSNEDPRT	
SEQ ID NO: 139	VL CD95-HFE7A	DIVLTQSPASLAVSLGQ RATISCKASQSDYDGD SYMNWYQQKPGQPPK LLIYAASNLESGIPARFS GSGSGTDFTLNIHPVEE EDAATYYCQQSNEDP RTFGGGGTKLEIK	
SEQ ID NO: 140	VH DR4-chCTB007 CDR1	GFNIKDTY	DR4-chCTB007
SEQ ID NO: 141	VH DR4-chCTB007 CDR2	IDPANGNT	
SEQ ID NO: 142	VH DR4-chCTB007 CDR3	AYYYYVSNWFTY	

SEQ ID NO: 143	VH DR4-chCTB007	EVQLQQSGAELVKPGA SVKLSCTASGFNIKDTY MHWVKQRPEQGLEWI GRIDPANGNTKYDPKF QGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDTAIVYYC AYYYVSNWFTYWGQ GTLVTVSA	
SEQ ID NO: 144	VL DR4-chCTB007 CDR1	ENIYSN	
	VL DR4-chCTB007 CDR2	AAT	
SEQ ID NO: 145	VL DR4-chCTB007 CDR3	QHFWGTWT	
SEQ ID NO: 146	VL DR4-chCTB007	DIQMTQSPASLSVSVG ETVTITCRASENIYSNL EWYQQKQKGKSPQLLV YAATNLADGVPSRFS GSGSGTQYSLKINSLO SEDFGSYYCQHFWG TWTFGGGKLEIK	
SEQ ID NO: 147	VH FAS-E09 CDR1	GASISANSYY	FAS-E09
SEQ ID NO: 148	VH FAS-E09 CDR2	IAYRGNSNSGST	
SEQ ID NO: 149	VH FAS-E09 CDR3	ARRQLDDGTGYQW AAFDV	
SEQ ID NO: 150	VH FAS-E09	QLQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVSGASIS ANSYYGVWVRQSPG KGLEWVGSIAAYRGNS NSGSTYYNPSLKSRA TVSVDTSKNQVSLRL TSVTAADTALYYCAR RQLLDDGTGYQWAA FDVWGQGTMTVSS	
SEQ ID NO: 151	VL FAS-E09 CDR1	SFNIGRYP	
	VL FAS-E09 CDR2	YNN	
SEQ ID NO: 152	VL FAS-E09 CDR3	STWDDTLKGWV	
SEQ ID NO: 153	VL FAS-E09	QSVLTQPPSVSEAPRQ TVTISCSGNSFNIGRYP VNWYQQLPKGKAPKLLIY YNNLRFSGVSDRFSGS KSGTSASLAIRDLLSED EADYYCSTWDDTLKG WVFGGGTKVTVL	
SEQ ID NO: 154	VH GITR-36E5 CDR1	GFTFSSYA	GITR-36E5
SEQ ID NO: 155	VH GITR-36E5 CDR2	ISSGGTT	
SEQ ID NO: 156	VH GITR-36E5 CDR3	ARVGGYYDSMDY	
SEQ ID NO: 157	VH GITR-36E5	EVNLVESGGGLVKPG GSLKVSCAASGFTFSS YAMSWVRQTPEKRLE WVASISSGGTTYYPD SVKGRFTISRDNARNI LYLQMSSLRSEDAM YYCARVGGYYDSMDY WGQGISVTDSS	

SEQ ID NO: 158	VL G1TR-36E5 CDR1	ESVDNYGVSF	
	VL G1TR-36E5 CDR2	AAS	
SEQ ID NO: 159	VL G1TR-36E5 CDR3	QQTKEVTWT	
SEQ ID NO: 160	VL G1TR-36E5	DIVLTQSPASLAVSLG QRATISCRASESVDN YGVSFMNWFQQKPG QPPKLLIYAASNQGS GVPARFSGSGSGTDF SLNIHPMEEDDTAMY FCQQTKEVTWTFGGG TKLEIK	
SEQ ID NO: 161	VH G1TR- INCAGNO1876 CDR1	GYTFTDYA	G1TR-INCAGNO 1876
SEQ ID NO: 162	VH G1TR- INCAGNO1876 CDR2	IRTYSGDV	
SEQ ID NO: 163	VH G1TR- INCAGNO1876 CDR3	AKSGTVRGFAY	
SEQ ID NO: 164	VH G1TR- INCAGNO1876	QVQLLQSGTELVRPGV SVKISCKGSGYTFTDY AMYWVKQSHAKSLEW IGVIRTYSGDVTYNQK FKDKATMTVDKSSSI AYMELARLSSEDSAIY YCAKSGTVRGFAYW GQGTLLTVSS	
SEQ ID NO: 165	VL G1TR- INCAGNO1876 CDR1	QSLNLSGNQKNY	
	VL G1TR- INCAGNO1876 CDR2	WAS	
SEQ ID NO: 166	VL G1TR- INCAGNO1876 CDR3	QNDYSYPYT	
SEQ ID NO: 167	VL G1TR- INCAGNO1876	DIVMTQSPSSLTVTA GEKVIMSCKSSQSLL NSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKLLIWAST RESGVPDRFTGSGS GTDFTLTISSVQAED LAVYHCQNDYSYPYT FGGGTKLEIK	

SEQ ID NO: 168	Fc IgG2	ASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS NFGTQTYTCNVDHK PSNTKVDKTKVERKC CVECPCPAPPVAG PSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQ FNSTFRVVSVLTVVH QDWLNGKEYKCKVS NKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	IgG2 человека
SEQ ID NO: 169	Fc IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSR STSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYT CNVNHKPSNTKVDKRV ELKTPLGDTTHTCPRCP EPKSCDTPPPCPRCPEP KSCDTPPPCPRCPEPKS CDTPPPCPRCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVQFKWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTF RVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIE KTISKTKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWE SSGQPENNYNTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNIFSCSVM HEALHNRFTQKSLSLSPGK	IgG3 человека

SEQ ID NO: 170	Fc IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPC PSCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEQ DPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHLEAH NHYTQKSLSLSLGK	IgG4 человека
SEQ ID NO: 171	FcRnECDHis BAP	AESHLSELLYHLLTAV SSPAPGTPAFWVS GWLGPQQYLSYNS LRGEAEPCGAWWW ENQVSWYWEKETT DLRIKEKLFLEAFKA LGGKGPYTLQGLLG CELGPDNTSVPTAK FALNGEEFMNFDLK QGTWGGDWPEALA ISQRWQQQDKAAN KELTFLLFSCPHRL REHLERGRGNLEW KEPPSMRLKARPS SPGFSVLTCSAFSF YPPELQLRFLRNG LAAGTGQGDGPN SDGSFHASSSLTV KSGDEHHYCCIVQ HAGLAQPLRVELE SPAKSSPGSSSHH HHHHHPGGGLNDIF EAQKIEWHE	FcRn человека
SEQ ID NO: 172	B2M	IQRTPKIQVYSRHP AENGKSNFLNCYV SGFHPSDIEVDLLK NGERIEKVEHSDLS FSKDWSFYLLYYTE FTPTEKDEYACRVN HVTLSQPKIVKWDRDM	B2M

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Створення, одержання й очищення антитіл

5 Експресійні конструкції для антитіл

Для експресії антитіл одержували послідовності варіабельної області важкого ланцюга (V_H) і легкого ланцюга (V_L) шляхом синтезу генів (Geneart Gene Synthesis; ThermoFisher Scientific,

Німеччина) і клонували в експресійні вектори pcDNA3.3 (ThermoFisher Scientific, США), які містять константні області важкого ланцюга (HC) і легкого ланцюга (LC) IgG1. Потрібні мутації вводили або при синтезі генів або методом сайт-спрямованого мутагенезу. Наведені в даній заявці антитіла містять послідовності V_H і V_L, отримані з описаних раніше антитіл hDR5-01, hDR5-05 (WO 2014/009358) і конатумумаб (US 7521048 B2 і WO 2010/138725) проти DR5, антитіла chCTB007 (US 2009/0136503) проти DR4, антитіл E09 (Chodorge, Cell Death Differ. 2012 Jul, 19(7): 1187-1195), APO1 (WO 2014/076292) і HFE7A (US 6972323) проти FAS, антитіла SF2 (US 2014/0377284) проти OX40, антитіл SGN 40 (US6838261) і CP870893 (US 7338660) проти CD40, антитіл MOR7480 (WO 2012/032433) і BMS-663513 (US 8475790) проти 4-1BB, антитіл HuMab-7D8 і 11B8 (WO 2004/035607) проти CD20, антитіла алемтузумаб (Crowe et al., Clin Exp Immunol. 1992; 87(1): 105-10) проти CD52 і антитіла 2F8 (WO 2002/100348) проти EGFR. У деяких прикладах як негативний контроль використовували специфічне до gp120 антитіло b12 типу IgG1 людини (Barbas et al., J Mol Biol. 1993 Apr 5, 230 (3): 812-23).

Тимчасова експресія

Антитіла експресували у вигляді IgG1,κ. Клітини Expi293 (Life/Thermo Scientific, США) піддавали тимчасовій трансфекції сумішшю плазмідної ДНК, яка кодує і важкі, і легкі ланцюги антитіл, використовуючи Expifectamine (Invitrogen, US) в основному як описано виробником.

Очищення й аналіз білків

Антитіла очищали методом афінної хроматографії з білком А. Супернатанти культур фільтрували крізь тупикові фільтри на 0,20 мкм і наносили на колонки MabSelect SuRe 5 мл (GE Healthcare), промивали й елюювали за допомогою 0,02 М цитрату натрію-NaOH, pH 3. Відразу ж після очищення елюати наносили на колонку для знесолення HiPrep Desalting (GE Healthcare) і проводили заміну буфера антитіл на буфер 12,6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7,4 (B. Braun або Thermo Fisher). Після заміни буфера зразки стерилізували фільтруванням крізь тупикові фільтри на 0,2 мкм. Очищені білки аналізували різними біоаналітичними методами, включаючи капілярний електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфідом натрію (CE-SDS) і високоефективну ексклюзійну хроматографію (HP-SEC). Концентрацію вимірювали за поглинанням при 280 нм. Очищені антитіла зберігали при 2-8 °C.

Одержання біспецифічних антитіл

Біспецифічні антитіла IgG1 одержували шляхом обміну Fab-плеча за контрольованих відновлювальних умов. Основою цього методу є використання комплементарних доменів C_H3, що сприяє утворення гетеродимерів за певних умов аналізу, як описано в WO 2011/131746. Для одержання пар антитіл з комплементарними доменами C_H3 вводили мутації F405L і K409R (нумерація згідно EU) в антитіла IgG1 проти DR5. Мутацію F405L вводили в IgG1-b12-K326A/E333A/P396L/E430G і IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G; а мутацію K409R вводили в IgG1-b12-K326W/E333S/E430G і IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/E430G. Для одержання біспецифічних антитіл два вихідні комплементарні антитіла, кожне в кінцевій концентрації 0,5 мг/мл, інкубували при 75 mM меркаптоетиламіну-HCl (2-MEA) у загальному об'ємі 100 мкл PBS при 31 °C протягом 5 год. Відновлювальну реакцію зупиняли шляхом видалення відновлювального реагенту 2-MEA на центрифужних колонках (центрифужні фільтри Microcon, 30k, Millipore) відповідно до методики виробника. Проводили заміну буфера на буфер 12,6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7,4 (B. Braun або Thermo Fisher). При цьому одержували біспецифічні антитіла: IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/K409R/E430G×IgG1-b12-K326A/E333A/P396L/F405L/E430G, яке називається і як Bsab (hDR5-01-G56T-K409R×b12-F405L)-K326A/E333A/P396L/E430G, і IgG1-CONA-C49W-F405L-K326W/E333S/E430G×IgG1-b12-K409R-K326W/E333S/E430G, яке називається як Bsab (IgG1-CONA-C49W-F405L×IgG1-b12-K409R)-K326W/E333S/E430G.

Приклад 2. Вплив комбінації E430G і K326A/E333A/P396L на ефективність агоністичних антитіл проти DR5

Для оцінки впливу комбінації посилюючої Fc-Fc заміни E430G (WO 2013/004842; WO 2014/108198; WO 2014/006217; de Jong et al., 2016) і K326A/E333A/P396L (WO 2016/116635) на агоністичну активність антитіл проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T і IgG1-hDR-05 проводили аналіз життєздатності на DR 5-позитивних клітинах VxPC-3 (ATCC, CRL-1687). Клітини збирали після трипсинізації й пропускання крізь клітинний фільтр. Клітини осаджували центрифугуванням 5 хв. при 1200 об./хв. і ресуспендували в культуральному середовищі (RPMI 1640 з 25 mM Hepes і L-глутаміном (Lonza, кат. № BE12-115F) + 10% інактивованої нагріванням донорської бичачої сироватки із залізом (DBSI; Life Technologies, кат. № 10371-029) + 50 од./мл пеніциліну/стрептоміцину (Pen/Strep; Lonza, кат. № DE17-603E) за концентрації 0,5×10⁵ клітин/мл. По 100 мкл суспензії одиночних клітин висівали (5000 клітин на комірку) у полістиролові 96-коміркові плоскодонні планшети (Greiner Bio-One, кат. № 655182) і залишали

для прикріплення на ніч при 37 °С. Потім додавали 50 мкл серійних розбавлень препаратів антитіл (кінцеві концентрації від 0,0003 до 20000 нг/мл в 4-разових розбавленнях) і інкубували 3 дні при 37 °С. Як негативний й позитивний контроль клітини інкубували без антитіл або з 5 мкМ стауроспорину (Sigma Aldrich, кат. № S6942), відповідно. Життєздатність культивованих клітин визначали люмінесцентним методом аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo (Promega, кат. № G7571), у якому визначається наявність АТФ, що є індикатором метаболічно активних клітин. З набору додавали реагент – розчин люциферину по 20 мкл на комірку й перемішували струшуванням планшета протягом 2 хв. при 500 об./хв. Потім планшети інкубували 1,5 години при 37°С. По 100 мкл супернатанта переносили в білий Optiplate-96 (Perkin Elmer, кат. № 6005299) і вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні Envision Multilabel Reader (Perkin Elmer). Дані аналізували й будували графіки методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. На Фіг. 1 представлений відсоток життєздатних клітин, який розраховували за наступною формулою: % життєздатних клітин = [(люмінесценція зразка з антитілом – люмінесценція зразка зі стауроспорином)/(люмінесценція зразка без антитіла – люмінесценція зразка зі стауроспорином)]×100.

З Фіг. 1 видно, що комбінація посилюючої Fc-Fc заміни E430G і трьох замін K326A/E333A/P396L приводила до індукції нищівної дії в антитіл проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T (Фіг. 1A) і IgG1-hDR5-05 (Фіг. 1B) при тестуванні у вигляді окремого засобу при аналізі життєздатності *in vitro* на адгезованих ракових клітинах VxPC-3 підшлункової залози людини. Напроти, ці антитіла не демонстрували ефективного знищення таких адгезованих клітин VxPC-3 за наявності тільки E430G або K326A/E333A/P396L. Також для комбінації не блокуючих-перехресно-блокувальних антитіл IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 введення комбінації замін K326A/E333A/P396L/E430G приводило до найбільш ефективного знищення адгезованих клітин VxPC-3 (Фіг. 1C).

Ці дані показують, що заміни K326A/E333A/P396L/E430G індукують сильну агоністичну активність в антитіл проти DR5 на адгезованих клітинах VxPC-3.

Приклад 3. Ефективність моновалентного антитіла проти DR5, що містить K326A/E333A/P396L/E430G

Для вивчення ефективності моновалентного антитіла проти DR5, що містить K326A/E333A/P396L/E430G, проводили аналіз життєздатності на ракових клітинах VxPC-3 підшлункової залози й COLO 205 товстої кишки людини. Моновалентне антитіло до DR5 одержували шляхом контрольованого обміну Fab-плеча між IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/K409R/E430G і IgG1-b12-K326A/E333A/P396L/F405L/E430G, як описано в Прикладі 1. Отримане біспецифічне антитіло, яке називається BsAb (hDR5-01-G56T-K409Rxb12-F405L)-K326A/E333A/P396L/E430G, містить одне плече, специфічне до DR5, і одне неспецифічне плече проти глікопротеїну gp120 ВІЛ, що приводить до моновалентного зв'язування DR5 на DR 5-позитивних ракових клітинах людини. Клітини VxPC-3 одержували, як описано в Прикладі 2. Клітини COLO 205 (ATCC, CCL-222) одержували, поєднуючи супернатанти культур, які містять неадгезовані клітини й трипсинізовані адгезовані клітини COLO 205. Клітини осаджували центрифугуванням 5 хв. при 1200 об./хв. і ресуспендували в культуральному середовищі (RPMI 1640 з 25 мМ Hepes і L-глутаміном + 10 % інактивованим нагріванням DMSO + 50 од./мл Pen/Strep) у концентрації $0,5 \times 10^5$ клітин/мл. По 100 мкл суспензії одиночних клітин висівали (5000 клітин на комірку) у полістиролові 96-коміркові плоскодонні планшети й залишали для прикріплення на ніч при 37°С. Потім додавали 50 мкл серійних розбавлень препаратів антитіл (кінцеві концентрації від 0,0024 до 10000 нг/мл в 4-разових розбавленнях) і інкубували 3 дні при 37 °С. Як негативний й позитивний контроль клітини інкубували без антитіл або з 5 мкМ стауроспорину, відповідно. Життєздатність культивованих клітин визначали люмінесцентним методом аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo, як описано в Прикладі 2.

З Фіг. 2 видно, що в присутності мутацій K326A/E333A/P396L/E430G моновалентний варіант IgG1-hDR5-01-G56T усе ще може викликати загибель ракових клітин VxPC-3 підшлункової залози й COLO 205 товстої кишки людини.

Приклад 4. Вплив комбінації E430G і K326A/E333A, K326A/P396L або E333A/P396L на зв'язування C1q і ефективність агоністичних антитіл проти DR5

Для вивчення впливу комбінації посилюючої Fc-Fc заміни E430G із двома із трьох замін K326A/E333A/P396L на агоністичну активність антитіла проти DR5а IgG1-hDR5-01-G56T проводили аналіз життєздатності на DR 5-позитивних клітинах VxPC-3 і COLO 205. Як контроль включали в експеримент комбінацію E430G з усіма трьома замінами K326A/E333A/P396L, як описано в Прикладі 2. Аналіз життєздатності проводили, як описано в Прикладі 3.

Життєздатність культивованих клітин визначали люмінесцентним методом аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo, як описано в Прикладі 2.

З Фіг. 3 видно, що комбінація посилюючої Fc-Fc заміни E430G і двох із заміни K326A/E333A/P396L (E333A/P396L, K326A/E333A або K326A/P396L) призводила до індукції нищівної дії в антитіла проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T при тестуванні у вигляді окремого засобу при аналізі життєздатності *in vitro* на адгезованих ракових клітинах VxPC-3 підшлункової залози (Фіг. 3A) і COLO 205 товстої кишки людини (Фіг. 3B). Напроти, ніякого знищення цих адгезованих ракових клітин не спостерігалось при наявності тільки E430G. Найбільш ефективно знищення спостерігалось при комбінації E430G з усіма трьома мутаціями K326A/E333A/P396L.

Для оцінки впливу різних заміни на зв'язування C1q проводили аналіз зв'язування по ELISA. Тестували очищені зразки варіантів антитіла IgG-hDR5-01-G56T, які містять заміну E430G у комбінації із замінами K326A/E333A, K326A/P396L, E333A/P396L або K326A/E333A/P396L, і порівнювали з IgG-hDR5-01-G56T дикого типу (WT) і IgG-hDR5-01-G56T-E430G. Як негативний контроль на зв'язування C1q використовували IgG-2F8-I253D/K322A. В 96-коміркових планшетах для ELISA Microton (Greiner, кат. № 655092) фіксували зразки антитіл при 1 мкг/мл шляхом інкубації протягом ночі при 4 °C в 100 мкл PBS. Планшети промивали й блокували протягом 1 години за кімнатної температури в 0,5×PBS по 200 мкл на комірку з додаванням 0,025 % Tween 20 і 0,1 % желатину зі струшуванням. Із промиванням між інкубаціями планшети послідовно інкубували із серійними розбавленнями очищеного C1q (Quidel, кат. № A400; кінцеві концентрації C1q від 30 до 0,010 мкг/мл в 3-разових розбавленнях) по 100 мкл на комірку протягом 1 год. при 37 °C, із кролячим антитілом проти C1q людини (DAKO, кат. № A0136, 1/4000) по 100 мкл на комірку протягом 1 год. за кімнатної температури й з антитілом свині проти кролячого IgG-HRP (DAKO, P0399, 1:10,000) по 100 мкл на комірку як детектуюче антитіло протягом 1 год. за кімнатної температури й, нарешті, із субстратом 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфоною кислотою) при 1 мг/мл (ABTS; Roche, кат. № 11112 597001) по 100 мкл на комірку протягом приблизно 15 хв. за кімнатної температури. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 2% щавлевої кислоти. Вимірювали поглинання при 405 нм на зчитувальному обладнанні BioTek EL808 (BioSPX). Дані після логарифмічного перетворення аналізували шляхом побудови сигмоїдальних кривих доза-ефект зі змінним нахилом за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism.

З Фіг. 3C видно, що введення посилюючої Fc-Fc заміни E430G не впливало на гадану спорідненість зв'язування C1q з фіксованим при 1 мкг/мл антитілом IgG1-hDR5-01-G56T, тоді як варіанти антитіл, які містять комбінації заміни E430G і заміни K326A/E333A, K326A/P396L, E333A/P396L або K326A/E333A/P396L, проявляли посилення зв'язування C1q у порівнянні з IgG1-hDR5-01-G56T і IgG1-hDR5-01-G56T-E430G (табл. 2).

Таблиця 2

Значення EC₅₀ із зв'язування C1q з варіантами антитіла IgG1-hDR5-01-G56T (ELISA)

Варіант антитіла IgG1-hDR5-01-G56T (1 мкг/мл)	EC ₅₀ із зв'язування C1q (мкг/мл)	SD	n	Варіант антитіла у порівнянні з WT ¹	Варіант антитіла у порівнянні з E430G ¹
WT	18,8	9,9	6	не може бути застосоване	не значиме
E430G	20,7	12,6	6	не значиме	не може бути застосоване
K326A/E333A/P396L/E430G	1,3	0,2	3	p<0,05	p<0,05
K326A/E333A/E430G	0,8	0,1	3	p<0,05	p<0,05
K326A/P396L/E430G	0,6	0,1	3	p<0,05	p<0,05
E333A/P396L/E430G	1,9	0,8	3	p<0,05	p<0,05

¹ Однобічний метод ANOVA, p = 0,0022; критерій Бонферони post hoc, Ab проти WT: p < 0,05, як зазначено.

У цілому ці дані показують, що комбінація посилюючої Fc-Fc заміни E430G із заміною K326A/E333A, K326A/P396L, E333A/P396L або K326A/E333A/P396L приводить до посилення

зв'язування C1q і підвищенню агоністичної активності антитіла проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G тільки з посилюючою Fc-Fc мутацією E430G.

Приклад 5. Вплив комбінації E430G і K326W/E333S на зв'язування C1q і ефективність агоністичних антитіл проти DR5

5 Для оцінки впливу K326A/E333A і K326W/E333S на зв'язування C1q з антитілом, що містять посилюючу Fc-Fc мутацію E430G, проводили аналіз зв'язування по ELISA. Тестували очищені зразки варіантів антитіла IgG1-CONA-C49W, що містять заміну E430G у комбінації з мутаціями K326A/E333A або K326W/E333S, і порівнювали з IgG1-CONA-C49W дикого типу (WT) і IgG1-CONA-C49W-E430G. Також тестували IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S без заміни E430G. Як
10 негативний контроль на зв'язування C1q використовували IgG-2F8-I253D/K322A. ELISA із зв'язування C1q проводили в планшетах для ELISA, покритих антитілом при 1 мкг/мл, як описано в Прикладі 4.

При введенні заміни K326W/E333S відзначалося сильне посилення зв'язування C1q у порівнянні з антитілом WT (Фіг. 4A). Напроти, введення посилюючої Fc-Fc мутації E430G не
15 впливало на ймовірну спорідненість зв'язування C1q з фіксованим при 1 мкг/мл антитілом IgG1-CONA-C49W. Варіанти антитіла, які містять комбінацію заміни E430G і замін K326A/E333A або K326W/E333S, проявляли сильне посилення зв'язування C1q у порівнянні з IgG1-hDR5-01-G56T і IgG1-hDR5-01-G56T-E430G (табл. 3).

Таблиця 3

Значення EC₅₀ із зв'язування C1q з варіантами антитіла IgG1-CONA-C49W (ELISA)

Варіант антитіла IgG1-CONA-C49W (1 мкг/мл)	EC ₅₀ із зв'язування C1q (мкг/мл)	SD	n	Варіант антитіла у порівнянні з WT ¹	Варіант антитіла у порівнянні з E430G ¹
WT	15,2	12,2	3	не може бути застосоване	не значиме
E430G	15,4	6,1	3	не значиме	не може бути застосоване
K326W/E333S	0,3	0,1	3	p<0,05	p<0,05
K326A/E333A/E430G	0,8	0,3	3	p<0,05	p<0,05
K326W/E333S/E430G	0,5	0,1	3	p<0,05	p<0,05

¹ Однобічний метод ANOVA, p = 0,0013; критерій Бонферрони post hoc, Ab проти WT: p < 0,05, як зазначено.

20

Для вивчення впливу комбінації посилюючої Fc-Fc мутації E430G із замінами із зв'язування C1q K326A/E333A або K326W/E333S на агоністичну активність антитіла проти DR5a IgG1-hDR5-01-G56T проводили аналіз життєздатності на DR 5-позитивних клітинах ВхРС-3 і COLO 205. Аналіз життєздатності проводили, як описано в Прикладі 3. Життєздатність культивованих
25 клітин визначали люмінесцентним методом аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo, як описано в Прикладі 2.

З Фіг. 4B/C видно, що комбінація посилюючої Fc-Fc заміни E430G і двох мутацій K326W/E333S призводила до індукції сильної нищівної дії в антитіла проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T при тестуванні у вигляді окремого засобу при аналізі життєздатності in vitro на
30 адгезованих ракових клітинах ВхРС-3 підшлункової залози (Фіг. 4B) і COLO 205 товстої кишки людини (Фіг. 4C). Напроти, антитіло WT і IgG1-hDR5-01-G56T-E430G не проявляли ефективності. Нищівна дія IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G було сильнішою, ніж в IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/E430G і на ракових клітинах ВхРС-3, і на COLO 205.

У цілому ці дані показують, що комбінація посилюючої Fc-Fc заміни E430G із замінами
35 K326A/E333A або K326W/E333S приводить до посилення зв'язування C1q і підвищення агоністичної активності антитіла проти DR5 IgG1-CONA-C49W-E430G тільки з посилюючою гексамеризацією мутацією E430G.

Приклад 6. Вплив комбінації E430G з іншими варіантами Fc на зв'язування C1q і ефективність агоністичних антитіл проти DR5

40 Для вивчення впливу замін із зв'язування C1q S267E/H268F/S324T або варіанта 113F IgG1 химерного ізо типу IgG1/IgG3 на зв'язування C1q з антитілом, що містять посилюючу Fc-Fc мутацію E430G (Tammen et al., J Immunol. 2017), проводили аналіз зв'язування C1q за ELISA.

Тестували очищені зразки варіантів антитіла IgG1-hDR5-01-G56T із цими замінами й без них і порівнювали з IgG1-hDR5-01-G56T дикого типу (WT) і IgG1-hDR5-01-G56T-E430G. Як негативний контроль на зв'язування C1q використовували IgG-2F8-I253D/K322A. ELISA із зв'язування C1q проводили в планшетах для ELISA, покритих антитілом при 1 мкг/мл, як описано в Прикладі 4.

З Фіг. 5А видно, що введення посилюючої Fc-Fc заміни E430G не впливало на гадану спорідненість зв'язування C1q з фіксованим при 1 мкг/мл антитілом IgG1-hDR5-01-G56T. Напроти, варіант антитіла, що містить комбінацію заміни E430G і замін S267E/H268F/S324T, проявляв сильне посилення зв'язування C1q у порівнянні з IgG1-hDR5-01-G56T і IgG1-hDR5-01-G56T-E430G, тоді як введення заміни E430G у варіанта у форматі IgG113F-hDR5-01-G56T приводило до невеликого посилення зв'язування C1q у порівнянні з IgG1-hDR5-01-G56T і IgG1-hDR5-01-G56T-E430G (табл. 4).

Таблиця 4

Значення EC₅₀ із зв'язування C1q з варіантами антитіла IgG1-hDR5-01-G56T (ELISA)

Варіант антитіла IgG1-hDR5-01-G56T (1 мкг/мл)	EC ₅₀ із зв'язування C1q (мкг/мл)	SD	n	Варіант антитіла у порівнянні з WT ¹	Варіант антитіла у порівнянні з E430G ¹
WT	15,2	12,2	3	не може бути застосоване	не значиме
E430G	15,4	6,1	3	не значиме	не може бути застосоване
S267E/H268F/S324T/E430G	0,5	0,1	3	p<0,05	p<0,05
IgG113F-E430G	11,4	3,9	3	не значиме	не значиме

¹ Однобічний метод ANOVA, p = 0,0013; критерій Бонферроні post hoc, Ab проти WT: p < 0,05, як зазначено.

Для вивчення впливу комбінації посилюючої Fc-Fc заміни E430G із замінами із зв'язування C1q S267E/H268F/S324T (Moore et al., Mabs 2010) або з варіантом 113F химерного ізо типу IgF1/IgG3 (Natsume et al., Cancer Res. 2008) на агоністичну активність антитіла проти DR5a IgG1-hDR5-01-G56T проводили аналіз життєздатності на DR5-позитивних клітинах ВхРС-3 і COLO 205. Аналіз життєздатності проводили, як описано в Прикладі 3. Життєздатність культивованих клітин визначали люмінесцентним методом аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo, як описано в Прикладі 2.

З Фіг. 5В/С видно, що комбінація посилюючої Fc-Fc заміни E430G із замінами із зв'язування C1q S267E/H268F/S324T призводила до індукції нищівної дії в антитіла проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T при тестуванні у вигляді окремого засобу при аналізі життєздатності in vitro на адгезованих ракових клітинах ВхРС-3 підшлункової залози (Фіг. 5В) і COLO 205 товстої кишки людини (Фіг. 5С). При включенні E430G в IgG1 варіанта 113F IgG1-hDR5-01-G56T химерного ізо типу IgG1/IgG3 спостерігалася індукція нищівної дії на COLO 205 (Фіг. 5С) і менше на ВхРС-3, де агоністична активність спостерігалася тільки за найвищої концентрації антитіла (Фіг. 5В). Однак ефективність цих варіантів IgG1-hDR5-01-G56T-S267E/H268F/S324T/E430G і IgG113F-hDR5-01-G56T-E430G була значно нижчою, ніж в IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G і IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/E430G на обох клітинних лініях. Як і в попередніх прикладах, антитіло WT і IgG1-hDR5-01-G56T-E430G не проявляли ефективності.

У цілому ці дані показують, що комбінація посилюючої Fc-Fc заміни E430G із замінами S267E/H268F/S324T приводить до сильного підвищення зв'язування C1q і агоністичної активності антитіла проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G тільки з посилюючою Fc-Fc заміною E430G. У варіанта у форматі IgG113F-hDR5-01-G56T введення заміни E430G приводило до незначного підвищення зв'язування C1q і агоністичної активності антитіла.

Приклад 7. Зведення щодо впливу комбінації E430G з іншими мутаціями й варіантами Fc на ефективність агоністичних антитіл проти DR5

У попередніх прикладах були описані аналізи життєздатності, у яких тестували вплив на агоністичну активність антитіла проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T при комбінуванні посилюючої Fc-Fc заміни E430G з іншими замінами або варіантами Fc-області, які впливають на агонізм

DR5 або на зв'язування C1q. У даному прикладі представлено зведення за всіма аналізами життєздатності на адгезованих ракових клітинах ВхРС-3 підшлункової залози людини шляхом представлення й ранжирування відсотка життєздатних клітин після інкубації протягом 3 днів із зазначеними антитілами при 10 мкг/мл відносно IgG1-hDR5-01-G56T дикого типу (WT), який, як

було показано в прикладах 2, 4, 5 і 6, не виявляє впливу. Подробиці аналізу життєздатності на адгезованих клітинах ВхРС-3 і люмінесцентного методу CellTiter-Glo описано в Прикладі 2.

З Фіг. 6 видно, що комбінація посилюючої Fc-Fc заміни E430G з подвійною заміною K326W/E333S із зв'язування C1q проявляло найбільш значний ефект при порівнянні з антитілом IgG1-hDR5-01-G56T дикого типу (WT) після 3-денної інкубації ракових клітин ВхРС-3 підшлункової залози людини з антитілом при 10 мкг/мл у повному культуральному середовищі, яке містить інактивовану нагріванням фетальну телячу сироватку. Також комбінації E430G з K326A/E333A/P396L, E333A/P396L і K326A/E333A давали значно менший відсоток життєздатних клітин, ніж антитіло WT. Інші варіанти Fc, які раніше посилювали зв'язування C1q, такі як S267E/H268F/S324T і химерний IgG-113F типу IgG1/IgG3, не проявляли значної індукції нищівної дії в комбінації з E430G в IgG1-hDR5-01-G56T при постановці експерименту з 10 мкг/мл антитіл на адгезованих клітинах ВхРС-3, при якій також IgG1-hDR5-01-G56T-E430G не демонструвало нищівної дії при тестуванні у вигляді окремого засобу.

Приклад 8. Вплив C1q на активність *in vitro* агоністичних антитіл проти DR5 з посилюючої Fc-Fc заміною в комбінації із замінами із зв'язування C1q

Попередні приклади свідчать, що посилення зв'язування C1q сприяє кращій агоністичній активності досліджуваних антитіл проти DR5, які містять посилючу Fc-Fc мутацію E430G. Для перевірки впливу C1q проводили аналіз життєздатності з IgG1-CONA-K326A/E333A/P396L/E430G і IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G на клітинах WIL2-S SF у безсировоточному середовищі в присутності або за відсутності очищеного C1q людини. Клітини WIL2-S SF походять із В-лімфобластів WIL2-S (ATCC, CRL-8885) і адаптовані для росту за безсировоточних умов у культуральному середовищі по рецептурі HyQ-ADCF-Mab (Perbio, кат. № SH30349), яке містить 50 од./мл Pen/Strep і 1 мМ піруват натрію. Суспензії клітин WIL2-S SF пропускали через клітинний фільтр, осаджували центрифугуванням 5 хв. при 300×g і ресуспендували в безсировоточному культуральному середовищі в концентрації 0,5×10⁶ клітин/мл. По 100 мкл суспензії одиночних клітин (50000 клітин на комірку) висівали в полістиролові 96-коміркові плоскодонні планшети (Greiner Bio-One, кат. № 655182). Додавали по 25 мкл серійних розбавлень препаратів антитіл (кінцеві концентрації від 0,0003 до 20000 нг/мл в 4-разових розбавленнях) і 25 мкл очищеного C1q (Quidel, кат. № A400; кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і інкубували 1 день при 37°C. Як негативний й позитивний контроль клітини інкубували в середовищі без антитіл або з 5 мкм стауроспорину (Sigma Aldrich, кат. № S6942), відповідно. Життєздатність клітин визначали за фарбуванням TO-PRO-3. TO-PRO-3 – не проникаючий у клітини мономерний карбоціаніновий барвник, який зв'язується із дволанцюговою ДНК. Тому TO-PRO-3 може застосовуватися як індикатор мертвих клітин. Усі зразки переносили в полістиролові 96-коміркові планшети з U-подібним дном (Greiner Bio-One, кат. № 650261), центрифугували 3 хв. при 300×g і відбирали 70 мкл супернатанта. Додавали 10 мкл суміші TO-PRO-3 (Invitrogen, кат. № T3605, 20 мкл TO-PRO-3 + 1980 мкл PBS) і ресуспендували клітини пропусканням крізь піпетку. Визначали кількість Pro-3-Позитивних клітин методом проточної цитометрії на клітинному аналізаторі BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences).

З Фіг. 7 видно, що додавання очищеного C1q у безсировоточне середовище значно посилює дію IgG1-CONA-K326A/E333A/P396L/E430G (Фіг. 7A) і IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G (Фіг. 7B) на клітини WIL2-S SF. Ці дані означають, що зв'язування C1q сприяє поліпшенню агоністичної активності агоністичних антитіл проти DR5, які містять посилючу Fc-Fc заміну E430G у комбінації з K326A/E333A/P396L або із замінами із зв'язування C1q K326W/E333S.

Приклад 9. Вплив C1q на агоністичну активність *in vitro* агоністичних антитіл проти DR5 з посилюючою Fc-Fc заміною в комбінації із замінами із зв'язування C1q

У прикладі 8 перевіряли вплив C1q на ефективність агоністичних антитіл проти DR5 при аналізі життєздатності клітин WIL2-S SF у безсировоточному середовищі з рядом концентрацій антитіл за фіксованої концентрації C1q. А в цьому прикладі перевіряли вплив ряду концентрацій C1q на ефективність варіантів агоністичного антитіла IgG1-hDR5-01-G56T з посилюючої Fc-Fc заміною (E430G) у комбінації із замінами із зв'язування C1q (K326A/E333S/P396L, K326W/E333S або K326A/E333A) при аналізі життєздатності клітин WIL2-S SF у безсировоточному середовищі. Аналіз життєздатності в основному проводили, як описано в Прикладі 8, за фіксованої концентрації антитіл 2,5 мкг/мл і з рядом концентрацій очищеного C1q при кінцевих концентраціях від 0,0002 до 2,5 мкг/мл в 4-разових розбавленнях.

З Фіг. 8 видно, що додавання очищеного C1q у безсировоточне середовище підвищує активність антитіл проти DR5, які містять посилюючу Fc-Fc заміну E430G. Усі досліджені варіанти антитіла IgG1-hDR5-01-G56T-E430G, які містять посилюючі зв'язування C1q заміни (K326A/E333S/P396L, K326W/E333S або K326A/E333A), демонстрували вплив на клітини WIL2-S SF залежним від дози C1q чином (Фіг. 8A). Із усіх досліджених антитіл найбільшу ефективність проявляло IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G, досягаючи максимального рівня за концентрацій C1q, починаючи з 0,16 мкг/мл. Ці дані означають, що зв'язування C1q сприяє поліпшенню активності агоністичних антитіл проти DR5, які містять посилюючу Fc-Fc заміну E430G у комбінації із замінами із зв'язування C1q K326A/E333A/P396L, K326W/E333S або K326A/E333A. Також комбінація антитіл IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, націлена на два епітопа, проявляла залежне від дози C1q підвищення ефективності C1q у знищенні клітин WIL2S-SF у безсировоточному середовищі, досягаючи максимального рівня при 0,16 мкг/мл C1q (Фіг. 8B).

Приклад 10. Вплив нейтралізації C1q на агоністичну активність *in vitro* агоністичних антитіл проти DR5 з посилюючою Fc-Fc заміною в комбінації із замінами із зв'язування C1q

Перевіряли потребу в C1q для ефективності агоністичного антитіла проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G, що містить посилюючу Fc-Fc заміну E430G у комбінації із заміною K326W/E333S із зв'язування C1q, використовуючи нейтралізуюче C1q антитіло, спрямоване проти глобулярної області голівки C1q, методом аналізу життєздатності клітин WIL2-S SF у безсировоточному середовищі, яке містить очищений C1q. Також перевіряли ефект нейтралізації C1q за тих же умов для націленої на два епітопа комбінації антитіл IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G. Аналіз життєздатності в основному проводили так, як описано в Прикладі 8. Коротко, клітини WIL2-S SF ресуспендували в безсировоточному культуральному середовищі при концентрації $0,67 \times 10^6$ клітин/мл. По 75 мкл суспензії одиночних клітин (50 000 клітин на комірку) висівали в безсировоточне культуральне середовище в полістиролових 96-коміркових плоскодонних планшетах. Потім додавали 25 мкл зразка антитіл проти DR5 (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл), 25 мкл очищеного C1q (кінцева концентрація 0,01 мкг/мл) і 25 мкл зразка антитіла проти C1q (Sanquin, CLB/C1q-85, кат. № MW1828; кінцева концентрація 10 мкг/мл) і інкубували 1 день при 37 °C. Життєздатність клітин визначали за фарбуванням TO-PRO-3, як описано в Прикладі 8.

Ефект додавання очищеного C1q у безсировоточне середовище для посилення активності антитіла проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G, як описано в прикладі 9, підтвердився в цьому експерименті (Фіг. 9A). Більше того, ця активність зменшувалася при нейтралізації зв'язування доданого C1q з антитілом проти DR5 у присутності надлишку антитіла проти C1q (Фіг. 9A). Ці дані показують, що зв'язування C1q є необхідним для оптимальної активності агоністичних антитіл проти DR5, які містять посилюючу Fc-Fc заміну E430G у комбінації із заміною за зв'язуванням C1q K326W/E333S. Також підтвердилася C1q-залежна ефективність у знищенні клітин WIL2S-SF для націленої на два епітопа комбінації антитіл IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G ефективності, що проявляє підвищення, при додаванні C1q у безсировоточне середовище й нейтралізацію цього ефекту в присутності надлишку антитіла проти C1q (Фіг. 9B).

Приклад 11. Аналіз активації комплементу у фазі розчину для антитіл з посилюючої Fc-Fc заміною в комбінації із замінами із зв'язування C1q

Визначали незалежну від зв'язування мішені активацію комплементу варіантами антитіл за визначенням C4d, маркера класичного шляху активації комплементу, після інкубації антитіл у нормальній сироватці людини (NHS). Застосовували 3-стадійну методику ELISA, використовуючи набір для імуноферментного аналізу Microvue C4d (Quidel, кат. № A0008), який містить (1) мікропланшет для аналізу, покритий моноклональним антитілом миші, яке специфічно зв'язується з активаційними фрагментами C4 людини, які містять C4d, (2) кон'юговане з HRP козяче антитіло проти C4d людини й (3) хромогенний субстрат. Разом з набором поставляються внутрішні контролю й стандарти, які використовували, як описано в інструкціях виробника. Як позитивний контроль готували агрегований нагріванням γ -глобулін у такий спосіб. Аліквоти по 1 мл у флаконах на 1,5 мл розчину IVIG (60 мг/мл; Sanquin, кат. № 04H04H443A) нагрівали 20 хв. при 63 °C. Флакони поєднували, розбавляли PBS до 20 мг/мл і фільтрували через шприц-фільтр, який має мембрану з ацетату целюлози без сурфактанта (SFCA) з порами 0,22 мкм (Corning, кат. № 431219). Аліквоти ~ 0,2 мл зберігали при 4 °C. Для зразків антитіл по 50 мкл зразків препаратів антитіл по 100 мкг/мл в 90% нормальній людській сироватці (NHS, Sanquin M0008AC) інкубували в поліпропіленових 96-коміркових планшетах з U-подібним дном (Greiner Bio-One; кат. № 650261) 1 годину при 37 °C. Потім по 5 мкл цих зразків розбавляли в 90 раз розріджувачем зразків і розбавлені зразки по 100 мкл на комірку

інкубували 30 хв. за кімнатної температури зі струшуванням в Coated Strips, які перед цим тричі промивали 250 мкл промивного розчину. Потім комірки 5 раз промивали 250 мкл промивного розчину й інкубували з кон'югатом C4d по 50 мкл на комірку протягом 30 хв. за кімнатної температури зі струшуванням. Комірки 5 раз промивали 250 мкл промивного розчину, а потім інкубували із субстратом по 100 мкл на комірку протягом 30 хв. за кімнатної температури зі струшуванням. Реакції зупиняли додаванням стоп-розчину по 50 мкл на комірку й вимірювали інтенсивність фарбування спектрофотометрично при 405 нм на зчитувальному обладнанні BioTek EL808 (BioSPX).

Зразки позитивного контролю проявляли чітке підвищення рівня C4d у порівнянні зі зразками негативного контролю (Фіг. 10). Напроти, не спостерігалось чіткого підвищення рівнів C4d у всіх досліджених варіантів антитіла IgG1-hDR5-01-G56T, що містять посилюючу Fc-Fc заміну E430G у комбінації із замінами із зв'язування C1q K326W/E333S, K326A/E333A або K326A/E333A/P396L, при інкубації в NHS за відсутності клітин мішені (Фіг. 10), тоді як C4d вироблявся при інкубації в NHS позитивних контролів HAGG, що представляють випадкові імунні комплекси, і IgG1-CONA-RGY, що представляють гексамери IgG1 у рідкій фазі. Ці дані вказують на те, що варіанти антитіла IgG1-hDR5-01-G56T, які містять посилюючу Fc-Fc заміну E430G у комбінації із замінами із зв'язування C1q K326W/E333S, K326A/E333A або K326A/E333A/P396L, не проявляють незалежної від мішені гексамеризації й активації комплементу у фазі розчину.

Приклад 12. Вплив комбінації E430G і K326W, E333S або K326W/E333S на зв'язування C1q і ефективність агоністичних антитіл проти DR5

Для оцінки ефекту введення замін K326W, E333S або K326W/E333S на зв'язування C1q з варіантами IgG-CONA-C49W із заміною E430G або без неї проводили аналіз зв'язування C1q по ELISA. Як негативний контроль на зв'язування C1q використовували IgG-2F8-I253D/K322A. Експеримент з ELISA проводили в 96-коміркових планшетах, покритих антитілами при 1 мкг/мл, які тестували на зв'язування за різних концентрацій очищеного C1q (від 0,010 до 30 мкг/мл в 3-разових розбавленнях), як описано в прикладі 4. Вимірювали поглинання при 405 нм і аналізували дані після логарифмічного перетворення шляхом побудови сигмоїдальних кривих доза-ефект зі змінним нахилом за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 11A,B видно, що введення замін K326W, E333S або K326W/E333S приводило до посилення зв'язування C1q з іммобілізованим навантаженням антитілом як у антитіла проти DR5 IgG1-CONA-C49W, так і в його варіанта IgG1-CONA-C49W-E430G з посилюючою взаємодією Fc-Fc мутацією E430G і з посилюючою гексамеризацією мутацією. Із усіх досліджених варіантів антитіл IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G проявляло найвищу ймовірну спорідненість зв'язування C1q.

Зв'язування очищених варіантів антитіл із суспензіями клітин WIL2-S SF аналізували методом проточної цитометрії. Клітини збирали, підраховували, промивали в PBS і ресуспендували при $3,33 \times 10^6$ клітин/мл у культуральному середовищі. По 30 мкл клітин (1×10^5 клітин на комірку) вносили піпеткою в 96-коміркові планшети. Додавали 50 мкл зразків серійних розбавлень антитіл (кінцеві концентрації антитіл від 0,001 до 2,5 мкг/мл в 3-разових розбавленнях) і інкубували 15 хв. при 37 °C. Після цього додавали 20 мкл очищеного C1q (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) та інкубували 45 хв. при 4 °C. Потім додавали 100 мкл буфера FACS (PBS + 0,1 % мас. бичачого сироваткового альбуміну (BSA) + 0,02% мас. азида натрію), після чого двічі промивали клітини 150 мкл буфера FACS. Відмиті клітини інкубували 30 хв. при 4 °C з 50 мкл позначеного FITC кролячого антитіла проти C1q людини (кінцева концентрація 20 мкг/мл; DAKO, кат. № F0254). Додавали 100 мкл буфера FACS і двічі відмивали клітини буфером FACS. Клітини ресуспендували в 30 мкл буфера FACS і вимірювали флуоресценцію на проточному цитометрі iQue Screener (IntelliCyt). Криві зв'язування після логарифмічного перетворення по осі концентрації C1q аналізували методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 11C,D видно, що введення тільки заміни E333S або E430G в антитіло проти DR5 IgG1-CONA-C49W антитіла не впливало на зв'язування C1q з антитілом, пов'язаним з DR 5-позитивними клітинами WIL2-S SF (Фіг. 11C). Введення мутації K326W в антитіло проти DR5 IgG1-CONA-C49W або IgG1-CONA-C49W-E430G призводило до посилення зв'язування C1q з опсонізованими антитілами проти DR5 клітинами WIL2-S SF, що узгоджується з посиленням зв'язування C1q, яке спостерігалось для клітин, опсонізованих IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G (Фіг. 11C,D). Введення E333S в антитіло проти DR5 IgG1-CONA-C49W-E430G призводило до помірного підвищення зв'язування C1q з опсонізованими антитілами клітинами WIL2-S SF (Фіг. 11D). Ці дані проточної цитометрії вказують на те, що пов'язане із клітинами IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G проявляє найдужче зв'язування C1q.

Для оцінки ефекту введення K326W, E333S або K326W/E333S у варіанти антитіла проти DR5 IgG1-CONA-C49W із заміною E430G або без неї на активність агоністів DR5 проводили аналіз життєздатності на клітинах WIL2-S SF. Проводили 1-денний аналіз життєздатності, в основному як описано в Прикладі 8. Коротко, в 96-комірковій планшети вносили піпеткою по 100 мкл клітин у безсывороточному середовищі (50000 клітин на комірку). Додавали 25 мкл очищеного C1q (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і 25 мкл зразків серійних розбавлень антитіл (кінцеві концентрації від 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-разових розбавленнях) і інкубували при 37°C протягом 1 дня. Життєздатність клітин визначали методом CellTiterGlo, як описано в Прикладі 2. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Дані щодо концентрації C1q після логарифмічного перетворення аналізували й будували графіки методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 11E-G видно, що введення тільки мутації K326W, E333S або E430G в антитіло проти DR5 IgG1-CONA-C49W не викликало індукції активності агоніста DR5 у клітинах WIL2-S SF, тоді як подвійна мутація K326W/E333S в IgG1-CONA-C49W викликала індукцію активності агоніста DR5 і часткове знищення клітин WIL2-S SF (Фіг. 11E). Комбінування мутації K326W, E333S або подвійної мутації K326W/E333S з посилюючою Fc-Fc мутацією E430G в антитіла проти DR5 IgG1-CONA-C49W приводить до індукції активності агоніста DR5, при цьому K326W/E333S/E430G викликає найбільшу максимальну загибель клітин WIL2-S SF (Фіг. 11F).

Приклад 13. Вплив комбінації E430G і K326W, E333S або K326W/E333S на C1q-залежну ефективність агоністичних антитіл проти DR5

Перевіряли вплив введення заміни K326W, E333S або K326W/E333S у варіантів антитіла проти DR5 IgG-CONA-C49W з мутацією E430G або без неї на C1q-залежну агоністичну активність. Проводили 1-денний аналіз життєздатності *in vitro* на клітинах WIL2-S SF у безсывороточному середовищі за різних концентрацій C1q, в основному як описано в прикладі 8. Коротко, в 96-комірковій планшети вносили піпеткою по 100 мкл клітин у безсывороточному середовищі (50 000 клітин на комірку). Додавали по 25 мкл зразків антитіл (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і 25 мкл серійних розбавлень очищеного C1q (кінцеві концентрації від 42 пг/мл до 2,5 мкг/мл в 3-разових розбавленнях) і інкубували при 37 °C протягом 1 дня. Життєздатність клітин визначали методом CellTiterGlo, як описано в Прикладі 2. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Дані щодо концентрації C1q після логарифмічного перетворення аналізували й будували графіки методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 12 видно, що введення посилюючої Fc-Fc заміни E430G або посилюючих зв'язування C1q заміни K326W або E333S у вигляді одиної мутації в антитіло проти DR5 IgG1-CONA-C49W призводить до індукції залежного від дози C1q знищення клітин WIL2-S SF, а в порівнянні із цим введення подвійної мутації K326W/E333S приводить до більш ефективної індукції залежного від дози C1q знищення клітин WIL2-S SF. Комбінування посилюючої Fc-Fc заміни E430G і досліджених заміни із зв'язування C1q приводить до більш ефективного знищення, причому IgG-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G найбільш ефективно викликає залежне від дози C1q знищення клітин WIL2-S SF (Фіг. 12).

Приклад 14. Вплив нейтралізації C1q на агоністичну активність *in vitro* антитіл проти DR5 з мутацією E430G у комбінації з мутацією K326W, E333S або K326W/E333S

Для перевірки внеску C1q в ефективність агоністичних антитіл проти DR5, які містять посилюючу Fc-Fc мутацію E430G, додавали нейтралізуюче C1q антитіло при аналізі життєздатності на клітинах WIL2-S SF, опсонізованих варіантами IgG1-CONA-C49W, у безсывороточному середовищі, що містить очищений C1q людини. Експеримент проводили в основному, як описано в Прикладі 8. Коротко, по 75 мкл суспензії клітин (50 000 клітин на комірку) висівали в безсывороточне культуральне середовище в полістиролових 96-коміркових плоскодонних планшетах. До клітин WIL2-S SF додавали по 25 мкл варіантів антитіла IgG1-CONA-C49W (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл), 25 мкл очищеного C1q (при кінцевих концентраціях C1q, близьких до концентрації EC₉₀ для кожного окремого антитіла згідно табл. 5) і 25 мкл (кінцева концентрація 10 мкг/мл) нейтралізуючого C1q антитіла (CLB-C1q-85; Sanquin, кат. № MW1828) або контрольного ізотипного антитіла (очищений IgG1к миші, клон MOPC-21; BD Biosciences, кат. № 555746) та інкубували 1 день при 37°C. Життєздатність клітин визначали методом CellTiter-Glo, як описано в Прикладі 2. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Дані аналізували й будували графіки за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 13 видно, що в присутності нейтралізуючого C1q антитіла повністю інгібувалася активність агоніста DR5 у варіантів IgG1-CONA-C49W із замінами K326W/E430G, E333S/E430G або K326W/E333S. Для IgG1-CONA-

C49W-K326W/E333S/E430G нейтралізація C1q приводила до часткового інгібування активності агоніста DR5.

Таблиця 5

Значення EC₉₀ для C1q при 2,5 мкг/мл зазначених антитіл при аналізі життєздатності клітин WIL2-S SF у безсировоточному середовищі з додаванням серійних розбавлень очищеного C1q, як описано в Прикладі 13 (дані не приводяться)

Антитіло	EC ₉₀ для C1q (мкг/мл)	Концентрація C1q на Фіг. 13 (мкг/мл)
IgG1-b12	>2,5	2,5
IgG1-CONA-C49W	>2,5	2,5
IgG1-CONA-C49W-K326W/E430G	1,0	1,0
IgG1-CONA-C49W-E333S/E430G	>2,5	2,5
IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S	0,3	0,3
IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G	0,1	0,1

5 Приклад 15. Вплив інгібування взаємодії Fc-Fc на агоністичну активність in vitro антитіл проти DR5 з мутацією E430G у комбінації з K326W, E333S або K326W/E333S

Для перевірки участі опосередкованої Fc-Fc гексамеризації антитіл в індукції клітинної смерті варіантами антитіла IgG1-CONA скористалися пептидом з 13 залишків DCAWHLGELVWCT (Delano et al., Science 2000 Feb 18, 287(5456): 1279-83), який зв'язує Fc у ділянці, що містить базові амінокислоти в районі гідрофобних ручок, які беруть участь у взаємодіях Fc-Fc (Diebold et al., Science 2014 Mar 14, 343 (6176): 1260-3). Життєздатність клітин WIL2-S SF визначали в присутності або за відсутності пептиду DCAWHLGELVWCT, в основному як описано в прикладі 14. Коротко, по 75 мкл суспензії клітин WIL2-S SF (50 000 клітин на комірку) висівали в безсировоточне культуральне середовище в полістиролових 96-коміркових плоскодонних планшетах. Додавали по 25 мкл антитіл (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і інкубували 10 хв. за кімнатної температури. Потім додавали 25 мкл який інгібує Fc-Fc пептиду DCAWHLGELVWCT або розупорядкованого контрольного пептиду WCDLEGVTWHACL (80 мкг/мл) та інкубували 10 хв. за кімнатної температури. Потім додавали 25 мкл очищеного C1q (за кінцевих концентрацій C1q, близьких до концентрації EC₉₀ для кожного окремого антитіла, як зазначено в прикладі 14, табл. 1) та інкубували 1 день при 37 °C. Життєздатність клітин визначали методом CellTiter-Glo, як описано в Прикладі 2. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Дані аналізували й будували графіки за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 14 видно, що в присутності пептиду DCAWHLGELVWCT, який інгібує Fc-Fc, активність агоніста DR5 у варіантів IgG1-CONA-C49W із замінами K326W/E430G, E333S/E430G, K326W/E333S або K326W/E333S/E4G частково інгібувалася. Інгібуючий Fc-Fc пептид інгібував агоністичну активність IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G з посилюючою Fc-Fc мутацією E430G сильніше, ніж IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S без мутації E430G.

30 Приклад 16. Вплив комбінації K326W/E333S з посилюючою Fc-Fc мутацією E345K, E345R або S440Y на агоністичну активність антитіла проти DR5

Для вивчення впливу комбінації замінів із зв'язування C1q K326W/E333S з посилюючими Fc-Fc мутаціями E345K, E345R або S440Y на агоністичну активність антитіла проти DR5 IgG1-CONA-C49W, опсонізованого на клітинах ВхРС-3, проводили аналіз життєздатності. Коротко, по 100 мкл суспензії одиночних клітин ВхРС-3 висівали в повне культуральне середовище (RPMI, що містить 10 % DBSI) у полістиролових 96-коміркових плоскодонних планшетах (5000 клітин на комірку) і залишали для прикріплення на ніч при 37 °C. Потім додавали 50 мкл серійних розбавлень препаратів антитіл (кінцеві концентрації від 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-разових розбавленнях) і інкубували 3 дня при 37 °C. Життєздатність клітин визначали методом CellTiter-Glo. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні Envision Multilabel Reader (Perkin Elmer). Дані після логарифмічного перетворення по осі концентрацій аналізували й будували графіки методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 15А видно, що при введенні мутації E345R антитіло IgG1-CONA-C49W викликало сильну загибель клітин ВхРС-3, меншу загибель при мутації E430G або E345K, а S440Y не давала ефекту. З Фіг. 15В видно, що знищення клітин ВхРС-3 варіантами IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S підвищувалося при мутації E430G, E345K або E345R, а при введенні мутації S440Y воно більше не підвищувалося.

У цілому ці дані показують, що посилююча зв'язування C1q мутація K326W/E333S може посилювати ефективність агоністичних антитіл IgG1 проти DR5 з різними посилюючими Fc-Fc мутаціями типу E430G, E345K або E345R.

5 Приклад 17. Вплив комбінації E430G з іншими модифікаціями Fc на ефективність агоністичних антитіл проти DR5

Для вивчення впливу комбінації посилюючої Fc-Fc заміни E430G із замінами із зв'язування C1q S267E/H268F/S324T або з варіантом 113F химерного ізо типу IgG1/IgG3 на агоністичну активність антитіла проти DR5 IgG1-CONA-C49W, опсонізованого на DR 5-позитивних клітинах ВхРС-3, проводили аналіз життєздатності. Коротко, по 100 мкл суспензії одиночних клітин ВхРС-3 висівали в культуральне середовище (RPMI, яке містить 10 % інактивованого нагріванням DBSI) у полістиролових 96-коміркових плоскодонних планшетах (5000 клітин на комірку) і залишали для прикріплення на ніч при 37 °С. Додавали 25 мкл очищеного C1q (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і 25 мкл зразків антитілу у серійних розбавленнях (кінцеві концентрації від 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-разових розбавленнях) і інкубували 3 дні при 37 °С.

15 Життєздатність культивованих клітин визначали методом CellTiter-Glo, як описано в Прикладі 2. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Дані після логарифмічного перетворення по осі концентрацій аналізували методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) і будували графіки за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 16 видно, що комбінування посилюючої Fc-Fc заміни E430G з посилюючими зв'язування C1q форматами S267E/H268F/S324T (Фіг. 16A) або IgG113F (Фіг. 16B) приводило до індукції агоністичної активності в антитіла проти DR5 IgG1-CONA-C49W на адгезованих ракових клітинах ВхРС-3 підшлункової залози людини. Комбінування заміни E430G з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S приводило до посилення активності агоніста DR5 в IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G у порівнянні з IgG1-CONA-C49W-S267E/H268F/S324T/E430G і IgG113F-CONA-C49W-E430G.

20 Приклад 18. Ефективність моновалентного антитіла проти DR5, що містить заміни K326W/E333S/E430G

Для вивчення впливу на агоністичну активність моновалентного антитіла проти DR5, що містить заміни K326W/E333S/E430G, опсонізованого на ракових клітинах ВхРС-3 підшлункової залози, проводили аналіз життєздатності. Моновалентне антитіло DR5 одержували шляхом контрольованого обміну Fab-плеча між IgG1-CONA-C49W-F405L-K326W/E333S/E430G і IgG1-b12-K409R-K326W/E333S/E430G, як описано в Прикладі 1. Отримане антитіло, яке називається як BsAb (IgG1-CONA-C49W-F405L×IgG1-b12-K409R)-K326W/E333S/E430G, містить одне плече, специфічне для DR5, і одне неспецифічне плече проти глікопротеїну gp120 ВІЛ, що приводить до моновалентного зв'язування DR5 з DR 5-позитивними клітинами людини. Проводили 1-денний аналіз життєздатності на клітинах WIL2-S SF, в основному як описано в Прикладі 8. Коротко, по 100 мкл клітин WIL2-S SF у безсировоточному середовищі вносили піпеткою в 96-коміркові планшети (50000 клітин на комірку). До клітин додавали 25 мкл очищеного C1q (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і по 25 мкл серійних розбавлень зразків антитілу (кінцеві концентрації від 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-разових розбавленнях) і інкубували 1 день при 37 °С. Життєздатність клітин визначали методом CellTiter-Glo, як описано в Прикладі 2. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Дані після логарифмічного перетворення по осі концентрацій аналізували методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) і будували графіки за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 17 видно, що в присутності мутацій K326W/E333S/E430G моновалентний варіант IgG1-CONA-C49W все-таки може викликати загибель клітин WIL2-S SF.

35 Приклад 19. Вплив комбінації E430G і K326W/E333S на агоністичну активність варіантів антитіла проти DR5 різних ізо типів

Для перевірки того, чи може введення заміни K326W/E333S/E430G індукувати агоністичну активність антитілу проти DR5 не в остові IgG1, одержували варіанти IgG3-CONA-C49W ізо типу IgG3 з константними доменами IgG3 людини відомими в даній галузі методами, одержуючи IgG3-CONA-C49W. Остов IgG3 також містив мутацію R345H для посилення зв'язування FcRn (Stapleton et al., 2011, Nat. Commun.). Вводили заміни K326W/E333S/E430G у варіанти обох ізо типів IgG1 і IgG3 і тестували агоністичну активність різних антитіл методом аналізу життєздатності *in vitro* на клітинах різних ліній: клітинах В-лімфобластів WIL2-S SF людини, ракових клітинах ВхРС-3 і HPAF-II (ATCC, CRL-1997) підшлункової залози й ракових клітинах HT-29 (ATCC, HTB-38) товстої кишки. Аналіз життєздатності на суспензіях клітин WIL2-S SF в основному проводили, як описано в Прикладі 8. Коротко, по 100 мкл клітин WIL2-S SF у

50 55 60

безсивороточному середовищі вносили піпеткою в 96-коміркові планшети (50 000 клітин на комірку). Потім до клітин додавали по 25 мкл очищеного C1q (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і 25 мкл серійних розбавлень зразків антитіл (кінцеві концентрації від 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-разових розбавленнях) та інкубували 1 день при 37 °С. Для адгезованих клітин ВхРС-3, НРАФ-II і НТ-29 проводили 3-денний аналіз життєздатності в основному, як описано в Прикладі 3. Коротко, по 100 мкл клітин у культуральному середовищі (RPMI 1640 з 25 мМ Hepes і L-глутаміном + 10% інактивованим нагріванням DBSI + 50 од./мл Pen/Strep) вносили піпеткою в 96-коміркові планшети (5000 клітин на комірку) і залишали для прикріплення на ніч при 37°C. Потім до клітин додавали по 25 мкл очищеного C1q (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і 25 мкл серійних розбавлень зразків антитіл (кінцеві концентрації від 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-разових розбавленнях) і інкубували 3 дні при 37°C. Життєздатність клітин визначали методом CellTiter-Glo, як описано в Прикладі 2. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Дані після логарифмічного перетворення по осі концентрацій аналізували методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) і будували графіки за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 18 видно, що введення заміни K326W/E333S/E430G в IgG 3-варіант антитіла проти DR5 (IgG3-DR5-CONA-C49W-R435H-K326W/E333S/E430G) приводило до індукції активності агоніста на всіх досліджених лініях клітин: WIL2S-SF (Фіг. 18A), ВхРС-3 (Фіг. 18B), НРАФ-II (Фіг. 18C) і НТ29 (Фіг. 18D). IgG 1-варіант IgG1-DR5-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G виявився більш сильним, ніж IgG 3-варіант IgG3-DR5-CONA-C49W-R435H-K326W/E333S/E430G на всіх досліджених лініях клітин.

Приклад 20. Вплив комбінації E430G і K326W/E333T на агоністичну активність антитіл проти DR5

Для оцінки впливу комбінації посилюючої Fc-Fc заміни E430G і K326W/E333T у порівнянні з K326W/E333S на агоністичну активність антитіла проти DR5 IgG1-CONA-C49W проводили аналіз життєздатності на DR 5-позитивних клітинах WIL2-S. Аналіз життєздатності *in vitro* в основному проводили, як описано в Прикладі 8. Коротко, по 100 мкл клітин WIL2-S SF у культуральному середовищі (RPMI 1640 з 25 мМ Hepes і L-глутаміном (Lonza, кат. № BE12-115F) + 10 % інактивованим нагріванням DBSI + 1 мМ пірувата натрію (Lonza, кат. № BE13-115E) + 50 од./мл Pen/Strep) вносили піпеткою в 96-коміркові планшети (50000 клітин на комірку). Потім до клітин додавали по 50 мкл серійних розбавлень зразків антитіл (кінцеві концентрації від 0,001 до 20 мкг/мл в 5-разових розбавленнях) і 10 мкл очищеного C1q (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і інкубували 1 день при 37 °С. Життєздатність клітин визначали методом CellTiterGlo, як описано в Прикладі 2. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Дані після логарифмічного перетворення по осі концентрацій аналізували й будували графіки методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 19 видно, що введення K326W/E333T/E430G в IgG1-CONA-C49W приводило до індукції активності агоніста DR5 у даного агента з такою ж ефективністю знищення при аналізі життєздатності *in vitro* на клітинах WIL2-S, як при введенні K326W/E333S/E430G.

Приклад 21. Фармакокінетичний (ФК) аналіз варіантів антитіла IgG1-CONA-C49W, які містять посилюючу Fc-Fc мутацію й/або мутації Fc із зв'язування C1q

Вивчали вплив мутації E430G, яка посилює Fc-Fc, і посилюючих зв'язування C1q мутацій на швидкість кліренсу IgG1-CONA-C49W в експерименті з ФК на мишах SCID. Усі досліджені варіанти антитіл перераховані в табл. 6. Експерименти на тваринах проводилися відповідно до голландського закону про захист тварин (WoD), переведеним з директив (2010/63/EU) і, де це можна застосувати, Кодексу практики "Експерименти на тваринах при дослідженні раку" (Inspection V&W, Zutphen, The Netherlands, 1999) і були схвалені Етичним комітетом Утрехта. Тварин утримували й обробляли відповідно до гарної практики щодо тварин, визначеної FELASA, в акредитованому AAALAC і ISO 9001:2000 віварії (GDL). 12-тижневим самкам мишей SCID (C.B-17/1crhan@hsd-prkdcscid; миші SCID Envigo) вводили внутрішньовенно 450 мкг антитіла (22,5 мг/кг) в об'ємі 200 мкл (3 миші на групу). Брали проби крові по 50 мкл із підшкірної вени ноги через 10 хв., 4 години, 1 день, 2 дні, 7 днів, 14 днів і 20 днів після введення антитіла. Кров збирали в флакони з гепарином й центрифугували 10 хв. при 14000 g. По 20 мкл зразків плазми розбавляли 380 мкл PBS (1:20) і зберігали при -20 °С до визначення концентрації антитіла. Загальні концентрації IgG людини визначали методом сендвич-ELISA. Як антитіла захоплення використовували мишаче mAb клону MH16 проти IgG-к людини (CLB Sanquin, кат. № M1268), яке фіксували по 100 мкл протягом ночі при 4 °С в 96-коміркових планшетах Microlopin ELISA (Greiner, Німеччина) у концентрації 2 мкг/мл в PBS. Планшети блокували шляхом інкубації на качалці, 1 годину за кімнатної температури в PBS з додаванням 0,2% бичачого

сироваткового альбуміну (BSA). Після відмивання додавали 100 мкл розбавлених зразків плазми й інкубували на качалці 1 годину за кімнатної температури. Планшети тричі відмивали 300 мкл PBST (PBS з додаванням 0,05 % Tween 20), а потім інкубували на качалці 1 годину за кімнатної температури з 100 мкл позначеного пероксидазою козячого імуноглобуліну проти IgG людини (#109-035-098, Jackson, West Grace, PA; 1:10000 в PBST з додаванням 0,2% BSA). Планшети знову 3 тричі відмивали 300 мкл PBST, а потім інкубували 15 хв. за кімнатної температури з 100 мкл субстрату 2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонової кислоти) [ABTS; Roche, кат. № 11112 422001; 1 таблетка в 50 мл буфери ABTS (Roche, кат. № 11112 597001)], захищеними від світла. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 2 % щавлевої кислоти з інкубацією 10 хв. за кімнатної температури. Вимірювали поглинання при 405 нм на зчитувальному обладнанні (Biotek, Winooski, VT). Розраховували концентрації, використовуючи введений матеріал для каліброваної кривої. Як контроль в планшети включали білок мієломи людини, що містить IgG (The Binding Site, кат. № BP078). Концентрації IgG людини (у мкг/мл) наносили на графіки (Фіг. 20A) і розраховували площу під кривою (AUC) за допомогою GraphPad Prism. Показники кліренсу до останнього дня забору крові (21 день) визначали за формулою $D \times 1000 / AUC$, де D означає дозу, що вводиться, 22,5 мг/кг (Фіг. 20B). Усі досліджені варіанти IgG1-CONA-C49W, що містять посилюючу Fc-Fc мутацію E430G і/або посилюючі зв'язування C1q мутації, проявляли швидкість кліренсу, співрозмірну з IgG1 дикого типу (WT) (Фіг. 20A,B). Отже, введення посилюючих зв'язування C1q мутацій типу K326W/E333S або K326A/E333A не має значного впливу на швидкість кліренсу таких антитіл IgG1, що містять посилюючу Fc-Fc мутацію E430G, як IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G і IgG1-CONA-C49W-K326A/E333A/E430G.

Таблиця 6

Варіанти антитіла IgG1-CONA-C49W при аналізі ФК на мишах Scid

Варіант антитіла	Посилююча Fc-Fc мутація	Посилююча зв'язування C1q мутація
IgG1-CONA-C49W	-	-
IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S	-	K326W/E333S
IgG1-CONA-C49W-K326W/E430G	E430G	K326W
IgG1-CONA-C49W-E333S/E430G	E430G	E333S
IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G	E430G	K326W/E333S
IgG1-CONA-C49W-K326A/E333A/E430G	E430G	K326A/E333A

Приклад 22. Вплив комбінації посилюючої Fc-Fc мутації E430G і посилюючих зв'язування C1q мутацій K326A/E333A або K326W/E333S на зв'язування з FcRn в антитіла IgG1

Неонатальний Fc-рецептор (FcRn) відповідає за тривалий період напівжиття IgG у плазмі, захищаючи IgG від деградації. Після інтерналізації антитіл FcRn зв'язується з Fc-областями антитілу в ендосомах, де взаємодія стабільна в слабкокислотному середовищі (pH 6,0). При поверненні на плазматичну мембрану, де середовище є нейтральним (pH 7,4), взаємодія зникає й антитіло знову потрапляє в кровоток. Це впливає на період напівжиття IgG у плазмі.

Для оцінки ефекту введення комбінації посилюючої Fc-Fc мутації й посилюючих зв'язування C1q мутацій K326A/E333A або K326W/E333S на зв'язування FcRn людини з варіантами антитіла IgG1-7D8 проводили аналіз зв'язування FcRn по ELISA. Як негативний контроль на зв'язування FcRn використовували IgG1-7D8-I235A/H310A/H435A (нокаут FcRn; Shields et al., J. Biol. Chem. 2001, 276: 6591); а як контроль на посилення зв'язування FcRn використовували IgG1-7D8-M252Y/S254T/T256E (Dall'Acqua et al., J Biol Chem. 2006 Aug 18, 281(33): 23514-24). Усі інкубації проводили за кімнатної температури. 96-коміркові планшети Streptawell (Roche, кат. № 17347760 01) протягом 1 години покривали отриманим рекомбінантно біотинільованим позаклітинним доменом FcRn людини (FcRnECDHis-B2M-BIO, тобто позаклітинним доменом FcRn людини з C-кінцевим His і міткою BAP у вигляді димера з β_2 -мікроглобуліном) при 5 мкг/мл (100 мкл на комірку), розбавленим в PBST з 0,2 % BSA. Планшети тричі відмивали PBST. Додавали серійні розбавлення зразків антитілу (кінцеві концентрації від 0,003 до 10 мкг/мл в 3-

разових розбавленнях в PBST/0,2% BSA, pH 6,0) і інкубували 1 годину. Планшети відмивали PBST/0,2 % BSA, pH 6,0. Додавали кон'юговане з пероксидазою хрину (HRP) поліклональне козяче антитіло проти IgG людини (1:10000; Jackson Immunoresearch, кат. № 109-035-097), розбавлене в PBST/0,2% BSA, pH 6,0 або 7,4, і інкубували планшети протягом 1 години. Після відмивання додавали 100 мкл ABTS (1 мг/мл) як субстрату й інкубували планшети 30 хв. захищеними від світла. Реакцію зупиняли за допомогою 100 мкл 2% щавлевої кислоти й вимірювали поглинання при 405 нм на зчитувальному обладнанні Elx808 (Biotek). Дані після логарифмічного перетворення аналізували й будували сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. Негативний контроль (IgG1-7D8-I235A/H310A/H435A) проявляв повну втрату зв'язування FcRn людини при pH 6,0 (Фіг. 21A), тоді як позитивний контроль (IgG1-7D8-M252Y/S254T/T256E) проявляв посилене зв'язування з FcRn людини в порівнянні з IgG1-7D8 дикого типу (WT) при pH 6,0 і втрату зв'язування при pH 7,4 (Фіг. 21B). Усі досліджені варіанти IgG1-7D8 з посилюючої Fc-Fc мутацією й з посилюючими зв'язування C1q мутаціями або без них проявляли ефективно зв'язування з FcRn людини при pH 6,0 і втрату зв'язування при pH 7,4. Однак у порівнянні з IgG1-7D8 WT введення однієї лише посилюючої Fc-Fc мутації E430G приводило до невеликого зниження зв'язування з FcRn людини при pH 6,0, яке ще більше знижувалося в комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326A/E333A або K326W/E333S.

Приклад 23. Вплив C1q на активність ADCC у варіантів антитіла проти CD20 IgG1-7D8, які містять заміни K326W/E333S/E430G

Перевіряли вплив C1q на активність ADCC у варіантів антитіла проти CD20 IgG1-7D8, які містять посилюючу Fc-Fc мутацію E430G і посилюючі зв'язування C1q заміни K326W/E333S/E430G, методом вивільнення хрому на клітинах WIL2-S SF у безсывороточному середовищі. Клітини WIL2-S SF збирали (5×10^6 клітин/мл), промивали (два рази в PBS, 1200 об./хв., 5 хв.) і збирали в 1 мл безсывороточного середовища (середовище HyQ ADCF-Mab з додаванням 10% пірувата натрію). Додавали 200 мкКи ^{51}Cr (Chromium-51; Amersham Biosciences Europe GmbH) і інкубували на качалці з водяною банею 1 годину при 37°C. Після промивання клітин (двічі в PBS, 1200 об./хв., 5 хв.) їх ресуспендували в безсывороточному середовищі. Підраховували мічені хромом клітини за виключенням трипанового синього й розбавляли до концентрації 1×10^5 клітин/мл. Виділяли мононуклеарні клітини периферійної крові людини (PBMС) зі свіжих лейкоцитних плівок від здорових донорів (Sanquin) стандартним методом центрифугування через фікол відповідно до інструкцій виробника (середовище для розділення лімфоцитів; Lonza). PBMС ресуспендували в безсывороточному середовищі, підраховували за виключенням трипанового синього й концентрували до 1×10^7 клітин/мл. Для експерименту по ADCC в 96-коміркові планшети вносили піпеткою по 50 мкл мічених хромом клітин WIL2-S SF (5000 клітин на комірку). Додавали 25 мкл серійних розбавлень зразків антитіл (кінцеві концентрації від 0,003 до 10 мкг/мл в 3-разових розбавленнях) і 25 мкл очищеного C1q людини (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) або середовища й інкубували 10 хв. за кімнатної температури. Потім додавали 50 мкл PBMС (500 000 клітин на комірку), що дає співвідношення ефектора й мішені 100:1, і інкубували 4 години при 37°C. Максимальний лізис клітин визначали шляхом інкубації 50 мкл мічених хромом клітин WIL2-S SF (5000 клітин на комірку) з 100 мкл 5% Triton-X100 (Sigma-Aldrich). Спонтанний лізис визначали шляхом інкубації мічених хромом клітин WIL2-S SF (5000 клітин на комірку) в 150 мкл середовища без антитіл і ефекторних клітин. Незалежний від антитіл лізис клітин визначали шляхом інкубації мічених хромом клітин WIL2-S SF (5000 клітин на комірку) з PBMС (500000 клітин на комірку) у загальному обсязі 150 мкл за відсутності антитіл. Ступінь лізису клітин визначали на сцинтиляційному лічильнику. Клітини центрифугували (1200 об./хв., 3 хв.) і переносили по 25 мкл супернатанта в 96-коміркові білі планшети Optiplate, заповнені 100 мкл розчину Microscint-40. Вивільнений ^{51}Cr у супернатантах визначали на сцинтиляційному лічильнику. Для розрахунків ступеня опосередкованого антитілами лізису використовували виміряні значення імпульсів за хвилину (срп) за наступною формулою: $(\text{срп зразка} - \text{срп при незалежному від антитіл лізисі}) / (\text{срп при максимальному лізисі} - \text{срп при спонтанному лізисі}) \times 100 \%$. Як негативний контроль використовували неспецифічне антитіло IgG1-b12 і варіант IgG1-7D8 із замінами L234A/L235A/P329G, які, як відомо, усувають зв'язування й активацію комплексу, а також зв'язування FcγR і індукцію ADCC (Lo et al., JBC 2017). Як і очікувалося, активність ADCC не спостерігалася в неспецифічного антитіла IgG1-b12 ні за відсутності, ні в присутності C1q (Фіг. 22). Для антитіла IgG1-7D8-F405L-K326W/E333S/E430G додавання 2,5 мкг/мл очищеного C1q людини приводило до інгібування активності ADCC на клітинах WIL2-S SF у безсывороточному середовищі. Навпроти, C1q не впливав на активність ADCC в IgG1-7D8 WT і IgG1-7D8-E430G.

Приклад 24. Вплив K326W/E333S/E430G на агоністичну активність антитіл проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T K326W/E333S/E430G і IgG1-hDR5-05

Для перевірки ефекту введення комбінації посилюючої Fc-Fc мутації E430G і посилюючих зв'язування C1q мутацій K326W/E333S на агоністичну активність антитіл проти DR5 IgG1-hDR5-01-G56T і IgG1-hDR5-05 проводили аналіз життєздатності *in vitro* на клітинах WIL2-S SF. Проводили 1-денний аналіз життєздатності в основному, як описано в Прикладі 8. Коротко, по 100 мкл клітин у безсивороточному середовищі вносили піпеткою в 96-коміркові планшети (50 000 клітин на комірку). Додавали по 25 мкл серійних розбавлень зразків антитіл (кінцеві концентрації від 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-разових розбавленнях) і 25 мкл очищеного C1q (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і інкубували 1 день при 37 °C. Життєздатність клітин визначали методом CellTiterGlo, як описано в Прикладі 2. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Дані аналізували й будували графіки методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism.

Введення посилюючої Fc-Fc мутації E430G разом з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S приводило до індукції активності агоніста DR5 в обох досліджених антитіл IgG1-hDR5-01-G56T і IgG1-hDR5-05, тоді як ці антитіла не викликали загибелі клітин при введенні однієї лише посилюючої Fc-Fc мутації E430G (Фіг. 23).

Приклад 25. Сумісність K326W/E333S/E430G з комплементарною парою мутацій Fc K439E і S440K у комбінації агоністичних антитіл проти DR5

Перевіряли сумісність мутацій K326W/E333S/E430G з іншими інженерними мутаціями Fc начебто комплементарної пари мутацій Fc K439E і S440K, яка може контролювати міжмолекулярні взаємодії Fc-Fc між різними антитілами, пов'язаними з мішенями на поверхні клітини, використовуючи комбінацію агоністичних антитіл проти DR5 IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G методом аналізу життєздатності *in vitro* на клітинах WIL2-S SF. Проводили 1-денний аналіз життєздатності в основному, як описано в Прикладі 8. Коротко, по 100 мкл клітин у безсивороточному середовищі вносили піпеткою в 96-коміркові планшети (50 000 клітин на комірку). Додавали по 25 мкл серійних розбавлень зразків антитіл (кінцеві концентрації від 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-разових розбавленнях) і 25 мкл очищеного C1q (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і інкубували 1 день при 37 °C. Життєздатність клітин визначали методом CellTiterGlo, як описано в Прикладі 2. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Дані аналізували й будували графіки методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 24 видно, що саме антитіло IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G-K439E, що містить інгібуючу Fc-Fc мутацію K439E, практично не викликало загибелі клітин. IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G-S440K, що містить інгібуючу Fc-Fc мутацію S440K, викликало деяку загибель клітин, хоча максимальна загибель не досягала 100%. Напроти, комбінація обох IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G-K439E + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G-S440K, яка поєднує дві комплементарні контролюючі Fc-Fc мутації K439E і S440K, проявляла ефективне знищення клітин, близьке до такого, що і в комбінації без комплементарних контролюючих Fc-Fc мутацій K439E і S440K. Знищення клітин комбінаціями антитіл, які містять мутації K326W/E333S/E430G (з комплементарними мутаціями K439E і S440K і без них), було набагато більш ефективним, ніж в комбінації антитіл, які містять тільки посилюючу Fc-Fc мутацію E430G (IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G-K439E + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G-S440K).

Приклад 26. Вплив комбінації посилюючих зв'язування C1q замін K326W/E333S з K248E/T437R на ефективність CDC в антитіла проти CD52

Перевіряли вплив комбінації мутацій K326W/E333S, що посилюють зв'язування C1q, із замінами K248E/T437R, що сприяють мультимеризації антитіл на клітинній поверхні (Zhang et al., 2017, Mabs (9)7: 1129-42), на ефективність CDC у варіантів антитіла проти CD52 IgG1-Campath (на основі алектумумаба) на CD 52-позитивних клітинах В-клітинної лімфоми Wien 133. Клітини Wien 133 (люб'язно надані Dr. Geoff Hale, Bioanalab Limited, Oxford, UK) збирали й ресуспендували в середовищі RPMI (Lonza, кат. № BE12-115F) з 0,2 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA; Roche, кат. № 10735086001). По 40 мкл клітин вносили піпеткою в круглодонні 96-коміркові планшети ($0,1 \times 10^6$ клітин на комірку). Додавали 40 мкл серійних розбавлень зразків антитіл (кінцеві концентрації від 0,002 до 40 мкг/мл в 4-разових розбавленнях) та інкубували 15 хв. за кімнатної температури зі струшуванням. Потім додавали 20 мкл NHS (кінцева концентрація 20 %) як джерело комплекменту людини й інкубували 45 хв. при 37 °C. Реакцію зупиняли, поміщаючи зразки на лід. Охолоджені клітини осаджували й ресуспендували в 30 мкл пропідію йодиду 2 мкг/мл (PI; Sigma Aldrich). Зразки аналізували методом проточної цитометрії

на Intellicyt iQue Screener Plus і визначали ступінь лізису за наступною формулою: % лізису = (число Рі-позитивних клітин/загальне число клітин)×100%. З Фіг. 25 видно, що введення посилюючої гексамеризацію одиночної мутації E430G або посилюючої мультимеризацію подвійної мутації K248E/T437R в IgG1-Campath дикого типу (WT) призводило до підвищення ефективності CDC на клітинах W1en 133. Ефективність CDC ще більше підвищувалася при комбінуванні мутацій K248E/T437R, що сприяють мультимеризації на клітинній поверхні, і мутацій K326W/E333S, що посилюють зв'язування C1q, в IgG1-Campath-k248E/K326W/E333S/T437R.

Приклад 27. Вплив комбінації E430G і K326W/E333S на ефективність агоністичних антитіл проти DR4 у присутності C1q

Для вивчення впливу комбінації посилюючої гексамеризацію мутації E430G і K326W/E333S на агоністичну активність антитіла проти DR4 chCTB007 проводили аналіз життєздатності на DR 4-позитивних клітинах ВхРС-3. Аналіз життєздатності проводили в основному, як описано в Прикладі 2. По 100 мкл суспензій одиночних клітин ВхРС-3 у культуральному середовищі (RPMI з 10 % інактивованим нагріванням DBSI) висівали в полістиролові 96-коміркові плоскодонні планшети (5000 клітин на комірку) і залишали для прикріплення на ніч при 37 °С. Додавали 25 мкл очищених зразків C1q (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і 25 мкл серійних розбавлень зразків антитіл (кінцеві концентрації від 0,00001 до 20 мкг/мл в 5-разових розбавленнях) і інкубували 3 дня при 37 °С. Життєздатність культивованих клітин визначали люмінесцентним методом аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo, як описано в Прикладі 2. Люмінесценцію вимірювали на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer), а дані аналізували й будували графіки методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. З Фіг. 26 видно, що комбінація посилюючої гексамеризацію мутації E430G і двох мутацій K326W/E333S призводила до індукції сильної нищівної дії в антитіла проти DR4 IgG1-DR4-chCTB007, так само, як у потрійного мутанта E345R/E430G/S440Y при тестуванні як єдиних агентів при аналізі життєздатності *in vitro* на адгезованих ракових клітинах ВхРС-3 підшлункової залози людини в присутності інактивованої нагріванням фетальної телячої сироватки з додаванням 2,5 мкг/мл очищеного C1q. Напроти, ці антитіла не демонстрували ефективного знищення цих адгезованих клітин ВхРС-3 при тестуванні у вигляді антитіла IgG1-DR4-chCTB007 дикого типу або при наявності однієї лише мутації E430G. Ці дані показують, що мутації K326W/E333S/E430G індукують сильну агоністичну активність в антитіл проти DR4 на адгезованих клітинах ВхРС-3 при додаванні C1q.

Приклад 28. Введення посилюючої гексамеризацію мутації E430G у комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S поліпшує ефективність комплемент-залежної цитотоксичності (CDC) та індукцію загибелі клітин у антитіл проти FAS

FAS-рецептор – це рецептор смерті на поверхні клітин, який призводить до запрограмованої загибелі клітин (апоптозу) при зшиванні рецептора лігандом Fas (Wajant et al., 2002, Science 296 (5573): 1635-6). FAS також відомий як апоптотичний антиген-1 (APO-1 або APT), кластер диференціювання 95 (CD95) або представник 6 суперродини рецепторів фактора некрозу пухлин (TNFRSF6). Проводили аналіз CDC в антитіл проти FAS, які містять потрійну мутацію K326W/E333S/E430G, методом CDC *in vitro* на FAS-позитивних В-лімфоцитах WIL2-S. Введення посилюючої гексамеризацію мутації E430G у комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S у різні антитіла проти FAS IgG1-FAS-E09, IgG1-CD95-APO1 і IgG1-CD95-HFE7A вивчали в аналізі CDC на клітинах WIL2-S SF в основному, як описано в Прикладі 26. Коротко, по 40 мкл клітин WIL2-S SF у середовищі RPMI-1640 ($3,33 \times 10^6$ клітин/мл) преінкубували в круглодонних 96-коміркових планшетах ($0,1 \times 10^6$ клітин на комірку) з 50 мкл серійних розбавлень антитіл (кінцеві концентрації від 0,003 до 10,0 мкг/мл в 3-разових розбавленнях) 15 хв. на качалці за кімнатної температури. Потім додавали 20 мкл нормальної людської сироватки як джерело комплементу (кінцева концентрація 20%) та інкубували 45 хв. при 37 °С. Реакцію зупиняли, поміщаючи планшети на лід. Лізис клітин визначали за фарбуванням йодидом пропідію. Зразки аналізували методом проточної цитометрії на iQue Screener. Дані після логарифмічного перетворення по осі концентрацій аналізували й будували графіки методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. Усі три антитіла дикого типу проти FAS: IgG1-FAS-E09 (Фіг. 27A), IgG1-CD95-APO1 (Фіг. 27B) і IgG1-CD95-HFE7A (Фіг. 27C) не індукували CDC, як і антитіло негативного контролю IgG1-b12. IgG1-FAS-E09 з посилюючою Fc-Fc мутацією (E430G) або з посилюючими зв'язування C1q мутаціями (K326W/E333S) індукували CDC. Комбінація E430G з K326W/E333S в IgG1-FAS-E09 приводила до максимального рівня CDC, аналогічно IgG1-FAS-E09-E345R/E430G/S440Y. Така ж картина спостерігалася з IgG1-CD95-

APO1, при цьому IgG1-CD95-APO1-E430G індукувало CDC, а IgG1-FAS-E09-K326W/E333S/E430G ще більше посилювало CDC. В антитіла IgG1-CD95-HFE7A додавання мутації E430G не впливало на CDC, однак IgG1-CD95-HFE7A з потрібною мутацією K326W/E333S/E430G повністю відновлювало CDC до максимального рівня.

Для перевірки того, чи загибель клітин, яка спостерігається при описаному вище аналізі CDC, була викликана опосередкованим комплементом лізисом, проводили аналіз життєздатності на клітинах WIL2-S SF у безсывороточному середовищі, у яке як зшиваючий агент додавали очищений C1q (Quidel). Аналіз життєздатності проводили в основному, як описано в Прикладі 8. Коротко, по 100 мкл клітин WIL2-S SF у безсывороточному середовищі вносили піпеткою в 96-коміркові планшети (50 000 клітин на комірку). Потім до клітин додавали по 50 мкл серійних розбавлень зразків антитіл (кінцеві концентрації від 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-разових розбавленнях) і 10 мкл очищеного C1q (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) і інкубували 45 хв. або 24 години при 37 °C. Життєздатність культивованих клітин визначали методом CellTiterGlo, як описано в Прикладі 2. Вимірювали люмінесценцію на зчитувальному обладнанні EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Дані після логарифмічного перетворення по осі концентрацій аналізували й будували графіки методом нелінійної регресії (сигмоїдальні криві доза-ефект зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. На Фіг. 28 представлені значення RLU (необроблені дані) у клітин після 45-хвилинної інкубації з антитілами в присутності 2,5 мкг/мл C1q. Жодне з антитіл не впливало на життєздатність клітин після такого короткого періоду інкубації.

З Фіг. 29A видно, що при 24-годинному аналізі життєздатності введення однієї лише посилюючої гексамеризацію мутації E430G або посилюючих зв'язування C1q мутацій K326W/E333S в антитіло проти FAS IgG1-FAS-E09 здатне індукувати залежну від дози загибель клітин WIL2-S SF у присутності C1q, тоді як антитіло дикого типу було не здатне викликати загибель при досліджених концентраціях антитіла. При об'єднанні посилюючої Fc-Fc мутації E430G з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S в IgG1-FAS-E09 антитіло ставало настільки ж ефективним, як з E345R/E430G/S440Y при 24-годинному аналізі життєздатності в присутності C1q. А з Фіг. 29B видно, що й введення E430G або K326W/E333S/E430G в антитіло IgG1-CD95-APO1 приводило до залежної від дози загибелі клітин WIL2-S SF у присутності C1q, причому потрібний мутант K326W/E333S/E430G виявився найефективнішим. З Фіг. 29C видно, що для індукції інгібування проліферації в присутності C1q в IgG1-CD95-HFA7E потрібна комбінація посилення зв'язування C1q і посилення Fc-Fc (K326W/E333S/E430G).

Як контрольний експеримент також проводили 24-годинний аналіз життєздатності на клітинах WIL2-S SF без C1q. З Фіг. 30A видно, що введення мутацій, які посилюють гексамеризацію E345R/E430G/S440Y в антитіло проти FAS IgG1-FAS-E09 здатне індукувати залежну від дози загибель клітин WIL2-S SF незалежно від C1q, тоді як антитіло дикого типу й варіанти антитіла тільки з посилюючої Fc-Fc мутацією E430G або з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S були не здатні викликати загибель при досліджених концентраціях антитіла за відсутності C1q. Однак введення посилюючих Fc-Fc мутацій разом з посилюючими зв'язування C1q мутаціями (IgG1-FAS-E09-K326W/E333S/E430G) приводило до втрати життєздатності клітин до 25 % за відсутності C1q. За відсутності C1q введення K326W/E333S/E430G давало такий же ефект для IgG1-CD95-APO1 (Фіг. 30B), але не впливало на IgG1-CD95-HFA7E (Фіг. 30C).

Отже, комбінування посилюючої Fc-Fc мутації E430G з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S в антитілах проти FAS може індукувати CDC у клітин WIL2-S SF через 45 хв. Цей процес повністю залежав від сироватки, тому що C1q як такий не викликав загибелі клітин через 45 хв. Однак через 24 години інкубація антитіл проти FAS з мутацією K326W/E333S/E430G у присутності C1q дійсно викликала загибель, яка перевершувала ефективність знищення у мутантів E430G і K326W/E333S.

Приклад 29. Вплив комбінації посилюючої Fc-Fc мутації E430G з мутаціями K326W/E333S на активацію OX40 на клітинах Jurkat антитілами проти OX40

Передресне зшивання рецепторів OX40 (CD134) під дією ліганда OX40 (OX40L) може індукувати проліферацію T-клітин, які експресують OX40 (Gramaglia et al., 1998, J. Immunol. 161, 6510-6517). Перевіряли вплив мутацій K326W/E333S на сигналізацію OX40, використовуючи різні варіанти антитіла проти OX40 IgG1-SF2 за допомогою набору для біоаналіза OX40 Bioassay Kit (Promega, кат. № CS197704), в основному відповідно до інструкцій від виробника. Клітини Jurkat Thaw-and-Use GloResponse NFkB-luc2/OX40 (Promega, кат. № CS197704), які стабільно експресують OX40 людини й репортерний ген люциферази по спадній від елемента відповіді NFAT, експресують люциферазу після активації OX40. По 25 мкл свіжодифростованих

клітин інкубували протягом ночі в білих 96-коміркових планшетах з F-подібним дном Optiplate (Perkin Elmer, кат. № 6005299) в 25 мкл середовища RPMI 1640 (Promega, кат. № G708A) у присутності 8% фетальної телячої сироватки (FBS; Promega, кат. № J121A). Наступного дня до клітин у середовищі додавали серійні розбавлення антитіл (кінцеві концентрації від 19,5 до 5000 нг/мл в 4-разових розбавленнях) до кінцевого обсягу 80 мкл. Клітини інкубували ще 5 годин, а потім додавали реагент Bio-Glo (Promega, кат. № CS197704). Після інкубації 5-10 хв. за температури навколишнього середовища реєстрували люмінесценцію на зчитувальному обладнанні Envision Multilabel Plate reader. З Фіг. 31 видно, що антитіло дикого типу проти OX40 IgG1-CD134-SF2 не викликало відповіді OX40. Введення посилюючої Fc-Fc мутації E345R приводило до сильної індукції, а E430G – до слабкої індукції відповіді OX40. Комбінування посилюючої Fc-Fc мутації E430G з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S приводило до сильної агоністичної активності IgG1-SF2.

Приклад 30. Вплив мутацій K326W/E333S/E430G на активацію CD40 на клітинах U20S антитілами проти CD40 у присутності фетальної телячої сироватки

Перехресне зшивання рецепторів CD40, які знаходяться на антигенпрезентуючих клітинах, під дією ліганду CD40 на TH-клітинах може викликати різні спадні ефекти (Chatzigeorgiou et al., 2009, BioFactors (Oxford, England) 35(6): 474-83). Перевіряли вплив мутацій K326W/E333S/E430G на сигналізацію CD40, використовуючи різні варіанти антитіл проти CD40 SGN40 і CP870893 за допомогою набору для біоаналіза CD40 Bioassay Kit (Promega, кат. № CS1979A06), в основному відповідно до інструкцій виробника. Клітини Jurkat Thaw-and-Use GloResponse NFkB-luc2P/U20S, які стабільно експресують CD40 людини і репортерний ген люциферази по низхідній від елемента відповіді NFAT, експресують люциферазу після активації CD40. По 25 мкл свіжодифростованих клітин інкубували протягом ночі в 96-коміркових білих планшетах з F-подібним дном Optiplate (Perkin Elmer, кат. № 6005299) в 25 мкл середовища RPMI 1640 (Promega, кат. № G708A) в присутності 8% фетальної телячої сироватки (J121A). На наступний день до клітин в середовище добавляли серійні розбавлення антитіл або очищеного рекомбінантного ліганду CD40 (R&D Systems, кат. № 6420-CL-025/CF) до кінцевого об'єму 80 мкл. Клітини інкубували ще 5 годин, а потім добавляли реагент Bio-Glo (Promega, кат. № CS197704). Після інкубації 5-10 хв. за температури навколишнього середовища реєстрували люмінесценцію на пристрої зчитування Envision MultiLabel Plate reader. Як джерело сироватки використовували фетальну телячу сироватку (FBS; Promega, кат. № J121A). Антитіла тестували в серійних розбавленнях в діапазоні від 0,1 до 25 000 нг/мл. Рекомбінантний ліганд CD40 (серійні розбавлення від 0,04 до 10 000 нг/мл), який використовували як позитивний контроль при аналізі відповіді CD40, індукував чіткі сигнали відповіді відносно антитіла негативного контролю, який не зв'язувався IgG1-b12 (Фіг. 32). Антитіло проти CD40 IgG1-SGN40 дикого типу індукувало відповіді CD40 на рівне, в основному близькому антитілу негативного контролю IgG1-b12. Напроти, варіант IgG1-CD40-SGN40, який містить тільки мутацію E430G, яка індукує взаємодії Fc-Fc між антитілами після зв'язування на клітинній поверхні, індукував відповіді CD40 ($EC_{50} = 336,4 \pm 15,3$ нг/мл). Варіант IgG1-CD40-SGN40 з підсилюючою Fc-Fc мутацією E430G в поєднанні з мутаціями K326W/E333S, які посилюють зв'язування C1q ще більше підвищував ефективність IgG1-SGN40 ($EC_{50} = 18,0 \pm 1,1$ нг/мл). Антитіло IgG1-CD40-CP870893 дикого типу теж здатне індукувати відповідь CD40 ($EC_{50} = 187,4 \pm 9,2$ нг/мл), яка ще посилюється при K326W/E333S/E430G ($EC_{50} = 45,9 \pm 3,3$ нг/мл) до рівня, близького до ліганду CD40.

Отже, мутації K326W/E333S/E430G посилюють активацію CD40 на клітинах U20S антитілами проти CD40 у присутності фетальної телячої сироватки.

Таблиця 7

Значення EC_{50} і SD у ліганду CD40 і антитіл IgG1-CD40 і їх варіантів

	Середнє EC_{50} (нг/мл)	SD (нг/мл)
Ліганд CD40	112,5	48,0
IgG1-CD40-SGN40	3356,0	0,0
IgG1-CD40-SGN40-E430G	336,4	15,3
IgG1-CD40-SGN40-WSG	18,0	1,1
IgG1-CD40-CP870893	187,4	9,2
IgG1-CD40-CP870893-WSG	45,9	3,3

Приклад 31. Вплив мутацій K326W/E333S/E430G на активацію 4-1BB (CD137) на клітинах Jurkat антитілами проти 4-1BB у присутності фетальної телячої сироватки

4-1BB або CD137 або представник 9 суперродини рецепторів фактора некрозу пухлин (TNFRSF9) є членом суперродини рецепторів фактора некрозу пухлин (TNFR) і індукується при активації лімфоцитів (ILA) (Schwarz et al., 1993, Gene 134(2): 295-8). Перекресне зшивання 4-1BB посилює проліферацію, секрецію IL-2, виживання і цитолітичну активність Т-клітин (Sica et al., 2000, Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 47(5): 275-9). Перевіряли вплив мутацій K326W/E333S/E430G на сигналізацію 4-1BB, використовуючи різні варіанти антитіл проти 4-1BB MOR7480 і BMS-663513 за допомогою набору для біоаналіза 4-1BB Bioassay Kit (Promega, кат. № CS196005), в основному відповідно до інструкцій виробника. Клітини Jurkat Thaw-and-Use GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB, які стабільно експресують 4-1BB людини і репортерний ген люциферази за низхідною від елемента відповіді NFAT, експресують люциферазу після активації 4-1BB. По 25 мкл свіжодефростованих клітин інкубували протягом ночі в 96-коміркових білих планшетах з F-подібним дном Optiplate (Perkin Elmer, кат. № 6005299) в 25 мкл середовища RPMI 1640 (Promega, кат. № G708A) в присутності 1% фетальної телячої сироватки (J121A). На наступний день до клітин в середовищі добавляли серійні розведення антитіл або очищеного рекомбінантного ліганда 4-1BB з His-міткою (R&D Systems, 2295-4L-025/CF) для антитіла проти His-мітки (клон J099B12) до кінцевого об'єму 80 мкл. Клітини інкубували ще 5 годин, а потім добавляли реагент Bio-Glo (Promega, кат. № CS197704). Після інкубації 5-10 хв. за температури оточуючого середовища реєстрували люмінесценцію на пристрої зчитування Envision MultiLabel Plate reader. Як джерело сироватки використовували фетальну телячу сироватку (FBS; Promega, кат. № J121A). Рекомбінантний ліганд 4-1BB і Ab проти His, які використовувались як позитивний контроль при аналізі відповіді 4-1BB, індукували чіткі сигнали відповіді відносно антитіла IgG1-b12-WSG негативного контролю, яке не зв'язувалося (Фіг. 33). Досліджувані антитіла, які містять мутацію E430G, яка посилює Fc-Fc разом з мутаціями K326W/E333S, які посилюють зв'язування C1q, індукували дозозалежну активацію сигналізації 4-1BB на клітинах Jurkat в присутності фетальної телячої сироватки ($EC_{50} = 16,9$ нг/мл для IgG1-CD137-MOR7480-K326W/E333S/E430G і $EC_{50} = 32,9$ нг/мл для IgG1-BMS-663513-K326W/E333S/E430G).

Приклад 32. Вплив мутацій K326W/E333S/E430G на активацію GITR на клітинах Jurkat антитілами проти GITR у присутності фетальної телячої сироватки GITR (індукований глюкокортикоїдами родинний TNFR білок) або представник 18 суперродини рецепторів фактора некрозу пухлин (TNFRSF18) є членом суперродини TNFR. GITR активується лігандом GITR (GITRL), який в основному експресується на APC. Взаємодія GITR в Т-клітинах з агоністичними антитілами, рекомбінантним GITRL або трансфектантами GITRL після субоптимальної стимуляції TCR посилює активацію Т-клітин за допомогою підвищувальної регуляції CD25, індукції експресії IL-2 і IFN (і посилення проліферації (див. огляд Knee et al. в Eur. J. Cancer, 2016 Nov, 67: 1-10).

Перевіряли вплив мутацій K326W/E333S/E430G на сигналізацію GITR, використовуючи різні варіанти антитіла проти GITR INCAGN01876 за допомогою набору для біоаналіза GITR Bioassay Kit (Promega, кат. № CS184006), в основному відповідно до інструкцій від виробника. Клітини Jurkat Thaw-and-Use Gloresponse NFκB-luc2P/GITR, які стабільно експресують GITR людини й репортерний ген люциферази по спадній від елемента відповіді NFAT, експресують люциферазу після активації GITR. По 25 мкл свіжодефростованих клітин інкубували протягом ночі в 96-коміркових білих планшетах з F-подібним дном Optiplate (Perkin Elmer, кат. № 6005299) в 25 мкл середовища RPMI 1640 (Promega, кат. № G708A) у присутності 8 % фетальної телячої сироватки (J1211). Наступного дня до клітин у середовище додавали серійні розбавлення антитіл до кінцевого об'єму 80 мкл. Клітини інкубували ще 5 годин, а потім додавали реагент Bio-Glo (Promega, кат. № CS197704). Після інкубації 5-10 хв. за температури навколишнього середовища реєстрували люмінесценцію на зчитувальному обладнанні Envision Multilabel Plate reader. Як джерела сироватки використовували фетальну телячу сироватку (FBS; Promega, кат. № J121A). Антитіло негативного контролю IgG1-b12, яке не зв'язувалося визначає фоновий сигнал. Антитіло дикого типу проти GITR IgG1-GITR-INCAGN01876 індукувало відповіді GITR на рівні ледь вище антитіла негативного контролю IgG1-b12 (Фіг. 34). Напроти, варіант IgG1-GITR-INCAGN01876, який містить тільки посилюючу Fc-Fc мутацію E430G, викликала більш сильна відповідь GITR. IgG1-GITR-INCAGN01876 з посилюючої Fc-Fc мутацією E430G у комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S ще більше посилював активність IgG1-GITR-INCAGN01876.

Отже, мутації K326W/E333S/E430G посилюють активацію GITR на клітинах Jurkat антитілом проти GITR у присутності фетальної телячої сироватки.

Приклад 33. Вплив мутацій K326W/E333S/E430G на активацію GITR на клітинах Jurkat антитілами проти GITR різних підкласів IgG у присутності фетальної телячої сироватки

Перевіряли вплив мутацій K326W/E333S/E430G на сигналізацію G1TR, використовуючи різні варіанти антитіла проти G1TR 36E5 підкласів IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4 за допомогою набору для біоаналіза G1TR Bioassay Kit, як описано в прикладі 32, у присутності фетальної телячої сироватки. Антитіла тестували за кінцевої концентрації 111 нг/мл. Антитіло IgG1 дикого типу проти G1TR IgG1-G1TR-36E5 індукувало слабку відповідь агоніста G1TR у порівнянні з контрольним IgG1-b12 (35), який не зв'язувався. Введення посилюючої Fc-Fc мутації E430G, приводило до помірного підвищення відповіді агоніста G1TR. Варіант IgG1-G1TR-36E5 з посилюючою Fc-Fc мутацією E430G у комбінації з посилюючими зв'язування C1q мутаціями K326W/E333S ще більше посилював активність антитіла до максимального рівня. Введення K326W/E333S/E430G в IgG2-G1TR-36E5 підкласу IgG2 призводило до помірної реакції агоніста G1TR. Введення мутацій K326W/E333S/E430G в IgG3-G1TR-36E5 і IgG4-G1TR-36E5 приводило до слабких відповідей агоніста G1TR на рівні, близькому до антитіла IgG1 дикого типу (WT).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

15 <110> Генмаб Б.В.
 <120> ВАРІАНТИ ПОЛІПЕПТИДІВ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ
 <130> P/0114-WO
 <160> 172
 20 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> N/A
 <400> 1
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Phe
 1 5
 30 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 35 <223> N/A
 <400> 2
 Ile Asp Pro Ala Asn Thr Asn Thr
 1 5
 <210> 3
 40 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 45 <400> 3
 Val Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 118
 50 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 4
 55 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Phe Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 60 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Thr Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 5 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 10 115
 <210> 5
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 15 <220>
 <223> N/A
 <400> 5
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 20 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Phe Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Thr Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 25 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30 Val Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 35 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 40 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 45 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 50 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 55 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 60

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
5 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
10 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
15 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445
<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
20 <220>
<223> N/A
<400> 6
Gln Ser Ile Ser Asn Asn
1 5
25 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
30 <223> N/A
<400> 7
Gln Gln Gly Asn Ser Trp Pro Tyr Thr
1 5
<210> 8
35 <211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> N/A
40 <400> 8
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30
45 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
50 65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
55 <210> 9
<211> 214
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
60 <223> N/A

<400> 9
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 5 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 10 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Trp Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 15 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 20 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 25 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 30 <210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 35 <223> N/A
 <400> 10
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr His
 1 5
 <210> 11
 40 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 45 <400> 11
 Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr
 1 5
 <210> 12
 <211> 11
 50 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 12
 55 Ala Arg Trp Gly Thr Asn Val Tyr Phe Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 118
 <212> PRT
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> N/A
 <400> 13
 5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 His Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 10 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 15 85 90 95
 Ala Arg Trp Gly Thr Asn Val Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 20 <210> 14
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> N/A
 <400> 14
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 His Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Asp Gln Lys Phe
 50 55 60
 35 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Gly Thr Asn Val Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 40 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 45 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 50 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 55 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 60

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 5 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 10 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 15 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 20 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 15
 25 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 30 <400> 15
 Ser Ser Val Ser Tyr Arg Thr Ser
 1 5
 <210> 16
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 16
 40 Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 17
 <211> 106
 <212> PRT
 45 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 17
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 50 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 55 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr
 85 90 95
 60

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 18
 <211> 213
 5 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 18
 10 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 15 35 40 45
 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 20 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 25 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 30 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 35 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 19
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 19
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Asp Tyr Phe
 1 5 10
 45 <210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 20
 50 Ile His Asn Ser Gly Thr Thr
 1 5
 <210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 55 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 21
 Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10
 <210> 22
 60 <211> 122

<212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 22
 5 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Asp Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 10 Trp Ile Gly His Ile His Asn Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 15 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 20 <210> 23
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 23
 25 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Asp Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly His Ile His Asn Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe
 65 70 75 80
 35 Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 40 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 45 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 50 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 55 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 5 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 10 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 15 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 20 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 24
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 24
 Gln Gly Ile Ser Arg Ser Tyr
 1 5
 30 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 25
 35 Gln Gln Phe Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 26
 <211> 108
 <212> PRT
 40 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 26
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ser
 20 25 30
 45 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 55 100 105
 <210> 27
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 60 <400> 27

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ser
 20 25 30
 5 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 10 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Ile Val Leu
 100 105 110
 15 Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
 115 120 125
 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp
 130 135 140
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile Tyr Gly Ala
 145 150 155 160
 20 Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 165 170 175
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe
 180 185 190
 25 Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly
 195 200 205
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 210 215 220
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 225 230 235 240
 30 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 245 250 255
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 260 265 270
 35 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 275 280 285
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 290 295 300
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 305 310 315 320
 40 Gly Glu Cys

<210> 28
 <211> 8
 45 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 28
 Gly Phe Thr Phe His Asp Tyr Ala
 1 5
 50 <210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 29
 55 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile
 1 5
 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 60 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 30
 Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 31
 5 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 31
 10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Asp Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15 Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 20 Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25 <210> 32
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 32
 30 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Asp Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 40 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 45 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 50 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 55 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 60

	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	
		245 250 255
	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	
		260 265 270
5	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	
		275 280 285
	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr	
		290 295 300
10	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	
		305 310 315 320
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro	
		325 330 335
	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln	
		340 345 350
15	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val	
		355 360 365
	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	
		370 375 380
20	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro	
		385 390 395 400
	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	
		405 410 415
	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val	
		420 425 430
25	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu	
		435 440 445
	Ser Pro Gly Lys	
		450
30	<210>	33
	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	Homo Sapiens (Людина розумна)
	<400>	33
35	Gln Ser Val Ser Ser Tyr	
		1 5
	<210>	34
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	Homo Sapiens (Людина розумна)
40	<400>	34
	Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr	
		1 5
	<210>	35
	<211>	107
45	<212>	PRT
	<213>	Homo Sapiens (Людина розумна)
	<400>	35
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
		1 5 10 15
50	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	
		20 25 30
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
		35 40 45
55	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
		50 55 60
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
		65 70 75 80
	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile	
		85 90 95
60		

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 36
<211> 214
5 <212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 36
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
10 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
15 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95
20 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
25 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
30 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
35 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 37
<211> 8
<212> PRT
40 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 37
Gly Phe Thr Phe Ser Tyr His Ala
1 5
<210> 38
45 <211> 7
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 38
Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr
50 1 5
<210> 39
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
55 <400> 39
Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly
1 5 10 15
Met Asp Val
60 <210> 40

<211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 40
 5 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr His
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 10 35 40 45
 Ser Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 15 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly Met
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 20 <210> 41
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 25 <400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr His
 20 25 30
 30 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 35 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly Met
 100 105 110
 40 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 45 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 50 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 55 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 5 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 10 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 15 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 20 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 25 <210> 42
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 42
 30 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 43
 Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 44
 40 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 44
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 50 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Leu
 85 90 95
 55 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 45
 <211> 214
 60 <212> PRT

<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 45
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 5 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 10 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Leu
 85 90 95
 15 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 20 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 25 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 30 <210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 35 <220>
 <223> N/A
 <400> 46
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe Tyr
 1 5
 40 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> N/A
 <400> 47
 Ile Arg Asp Lys Ala Lys Gly Tyr Thr Thr
 1 5 10
 50 <210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 55 <223> N/A
 <400> 48
 Ala Arg Glu Gly His Thr Ala Ala Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10
 60 <210> 49
 <211> 121

<212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 5 <400> 49
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 10 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asp Lys Ala Lys Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 15 65 70 75 80
 Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Glu Gly His Thr Ala Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 20 Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 50
 <211> 451
 <212> PRT
 25 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 50
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 35 Gly Phe Ile Arg Asp Lys Ala Lys Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75 80
 Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 40 Tyr Cys Ala Arg Glu Gly His Thr Ala Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 45 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 50 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 55 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 60

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
5 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
10 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
15 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
20 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
25 Pro Gly Lys
450
<210> 51
<211> 6
<212> PRT
30 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> N/A
<400> 51
Gln Asn Ile Asp Lys Tyr
35 1 5
<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
40 <220>
<223> N/A
<400> 52
Leu Gln His Ile Ser Arg Pro Arg Thr
1 5
45 <210> 53
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
50 <223> N/A
<400> 53
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asp Lys Tyr
55 20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Ile Ser Arg Pro Arg
85 90 95
5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 54
<211> 214
<212> PRT
10 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> N/A
<400> 54
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
15 1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asp Lys Tyr
20 20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
20 Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Ile Ser Arg Pro Arg
85 90 95
25 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
30 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
35 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
40 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 55
<211> 8
<212> PRT
45 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 55
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly
1 5
<210> 56
50 <211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 56
Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys
55 1 5
<210> 57
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
60 <400> 57

Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe
 1 5 10 15
 Asp Tyr

5 <210> 58
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 58

10 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 15 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

25 <210> 59
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 59

30 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 40 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 50 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 55 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

60

[illegible]

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 63
<211> 214
5 <212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 63
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
20 25 30
Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
15 50 55 60
Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
20 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
25 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
30 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
35 210
<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
40 <400> 64
Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe Val
1 5
<210> 65
<211> 8
45 <212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 65
Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys
1 5
50 <210> 66
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 66
55 Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
1 5 10 15
Tyr Met Asp Val
20
<210> 67
60 <211> 127

```

<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 67
5  Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
   1           5           10          15
   Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
      20          25          30
   Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
      35          40          45
10  Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
   50          55          60
   Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
   65          70          75          80
   Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
15  85          90          95
   Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
      100         105         110
   Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
      115         120         125
20  <210> 68
   <211> 457
   <212> PRT
   <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
   <400> 68
25  Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
   1           5           10          15
   Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
      20          25          30
   Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
      35          40          45
30  Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
   50          55          60
   Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
   65          70          75          80
35  Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85          90          95
   Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
      100         105         110
   Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser Ala
      115         120         125
40  Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
      130         135         140
   Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
   145         150         155         160
45  Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
      165         170         175
   Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
      180         185         190
   Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
50  195         200         205
   Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
      210         215         220
   Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
   225         230         235         240
55  Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
      245         250         255
   Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
      260         265         270
60  Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
      275         280         285

```

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290 295 300
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315 320
5 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
325 330 335
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
340 345 350
10 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
355 360 365
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
370 375 380
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400
15 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
405 410 415
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
420 425 430
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445
20 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455
<210> 69
<211> 7
25 <212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 69
His Ser Ile Arg Ser Arg Arg
1 5
30 <210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 70
35 Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser Tyr Thr
1 5
<210> 71
<211> 108
<212> PRT
40 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 71
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg
20 25 30
45 Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val
35 40 45
Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60
50 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser
85 90 95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys
55 100 105
<210> 72
<211> 215
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
60 <400> 72

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg
 20 25 30
 5 Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val
 35 40 45
 Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu
 10 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 15 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 20 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 25 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 73
 30 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 73
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 35 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 40 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 45 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 50 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 55 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 60

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 5 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 10 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 15 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 74
 <211> 330
 <212> PRT
 20 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 74
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 25 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 30 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 35 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 40 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 45 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 50 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 55 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 60

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

5 <210> 75
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 75

10 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 15 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 20 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Pro Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 25 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 30 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 35 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 40 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 45 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 50 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 76
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 76

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

60

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 5 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Pro Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 10 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 15 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 20 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 25 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 30 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 35 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 77
 40 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 45 <400> 77
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 50 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 55 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 60

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

5 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

10 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

15 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

20 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

25 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

30 <210> 78
<211> 330
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>

35 <223> N/A
<400> 78
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

45 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

50 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

55 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

60

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 5 Gln Pro Arg Lys Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 10 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 15 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 20 <210> 79
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> N/A
 <400> 79
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 30 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 35 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 40 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 45 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 50 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 55 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 60

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Leu Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 5 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 10 <210> 80
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 15 <223> N/A
 <400> 80
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 25 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 30 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 35 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 40 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 45 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 50 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Leu Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 55 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 81
 60 <211> 330

<212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 5 <400> 81
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 10 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 15 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 20 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 25 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 30 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 35 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 40 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 45 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 82
 <211> 330
 50 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 82
 55 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 60

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 5 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 10 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 15 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 20 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 25 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 30 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 35 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

 <210> 83
 <211> 330
 40 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 83
 45 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 50 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 55 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 60 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 5 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 10 195 200 205
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 15 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 20 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Leu Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 25 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

 <210> 84
 <211> 330
 30 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 84
 35 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 40 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 45 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 50 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 55 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 60 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 5 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 10 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Leu Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 15 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 85
 <211> 330
 20 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 85
 25 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 30 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 35 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 40 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Asp Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 45 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn
 195 200 205
 50 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 55 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 60

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 5 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 86
 <211> 330
 <212> PRT
 10 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 86
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 20 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 25 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 30 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 35 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 40 Trp Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 45 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 50 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 55 <210> 87
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 60 <220>

<223> N/A
 <400> 87
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 5 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 10 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 15 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 20 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 25 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 30 Trp Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 35 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 40 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 45
 <210> 88
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <223> N/A
 <400> 88
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 55 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 5 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 10 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Glu Phe Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 15 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Thr Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 20 210 215 220

 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 25 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 30 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 35 325 330

 <210> 89
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 40 <220>
 <223> N/A
 <400> 89
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 45 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 55 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 60 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
5 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
10 210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
15 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
20 290 295 300
Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
25 325 330
<210> 90
<211> 330
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
30 <220>
<223> N/A
<400> 90
Ala Ser Thr Lys Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
35 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
40 50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
45 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
50 130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
55 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
60 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 5 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 10 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 15 <210> 91
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 91
 20 Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 1 5
 <210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 92
 Ile Asn His Gly Gly Tyr Val
 1 5
 <210> 93
 30 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 93
 Ala Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
 35 1 5 10 15
 <210> 94
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 40 <400> 94
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 45 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 50 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 55 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 95
 <211> 6
 <212> PRT
 60 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)

<400> 95
 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 96
 5 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 96
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ala Leu Thr
 10 1 5 10
 <210> 97
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 15 <400> 97
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 25 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 98
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 35 <223> N/A
 <400> 98
 Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr Thr
 1 5
 <210> 99
 40 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 45 <400> 99
 Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 100
 <211> 14
 50 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 100
 55 Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 101
 <211> 121
 <212> PRT
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> N/A
 <400> 101
 5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 10 Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 15 85 90 95
 Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 20 <210> 102
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> N/A
 <400> 102
 Gln Asp Val Gly Ala Ala
 1 5
 <210> 103
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 35 <400> 103
 Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 104
 <211> 107
 40 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 104
 45 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile
 35 40 45
 50 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 55 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 105
 60 <211> 8

<212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 5 <400> 105
 Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr Trp
 1 5
 <210> 106
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 106
 15 Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr
 1 5
 <210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 107
 Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr
 25 1 5
 <210> 108
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 30 <220>
 <223> N/A
 <400> 108
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 35 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 40 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 45 Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 109
 50 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 55 <400> 109
 Asn Ile Gly Asp Gln Tyr
 1 5
 <210> 110
 <211> 6
 60 <212> PRT

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 110
 5 Asn Ile Gly Asp Gln Tyr
 1 5
 <210> 111
 <211> 108
 <212> PRT
 10 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 111
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 20 Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
 85 90 95
 25 Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 112
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 112
 35 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5
 <210> 113
 <211> 8
 <212> PRT
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 113
 Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr
 1 5
 45 <210> 114
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <223> N/A
 <400> 114
 Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
 1 5 10 15
 55 Phe Asp Tyr
 <210> 115
 <211> 126
 <212> PRT
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> N/A
 <400> 115
 5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 10 Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 15 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
 100 105 110
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 20 <210> 116
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> N/A
 <400> 116
 Gln Gly Ile Tyr Ser Trp
 1 5
 <210> 117
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 35 <400> 117
 Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 118
 <211> 107
 40 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 118
 45 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 50 Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 55 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 119
 60 <211> 8

<212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 5 <400> 119
 Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5
 <210> 120
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 120
 15 Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr
 1 5
 <210> 121
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 121
 Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp
 25 1 5
 <210> 122
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 30 <220>
 <223> N/A
 <400> 122
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 40 Ala Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 45 Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 50 <210> 123
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 55 <223> N/A
 <400> 123
 Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe
 1 5 10
 <210> 124
 60 <211> 9

<212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 5 <400> 124
 Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 125
 <211> 112
 10 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 125
 15 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 20 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 25 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 126
 30 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 35 <400> 126
 Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn Ala
 1 5
 <210> 127
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 127
 45 Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr
 1 5 10
 <210> 128
 <211> 6
 <212> PRT
 50 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 128
 Val Thr Asp Gly Tyr Tyr
 55 1 5
 <210> 129
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 60 <220>

<223> N/A
 <400> 129
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 10 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 15 Tyr Cys Val Thr Asp Gly Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 130
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 25 <400> 130
 Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu
 1 5 10
 <210> 131
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 131
 35 Gln Gln Ser Thr Lys Val Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 132
 <211> 111
 <212> PRT
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 132
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30
 Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 50 Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Thr
 85 90 95
 55 Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 133
 <211> 8
 60 <212> PRT

<213> Mus Musculus
 <400> 133
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
 1 5
 5 <210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 134
 10 Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr
 1 5
 <210> 135
 <211> 14
 <212> PRT
 15 <213> Mus Musculus
 <400> 135
 Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 136
 20 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 136
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 30 Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 35 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Arg Asp Tyr Ser Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 40 <210> 137
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 137
 45 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr
 1 5 10
 <210> 138
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Mus Musculus
 <400> 138
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr
 1 5
 <210> 139
 55 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 139
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 60 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 5 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 10 85 90 95
 Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 140
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 140
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
 1 5
 20 <210> 141
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 141
 25 Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr
 1 5
 <210> 142
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Mus Musculus
 <400> 142
 Ala Tyr Tyr Tyr Val Ser Asn Ala Trp Phe Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 143
 35 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 143
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 40 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 45 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Tyr Tyr Tyr Val Ser Asn Ala Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115
 50 <210> 144
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 144
 55 Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 1 5

<210> 145
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 5 <400> 145
 Gln His Phe Trp Gly Thr Trp Thr
 1 5
 <210> 146
 <211> 106
 10 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 146
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Val
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 147
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 20 <400> 147
 Gly Ala Ser Ile Ser Ala Asn Ser Tyr Tyr
 1 5 10
 <210> 148
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 148
 30 Ile Ala Tyr Arg Gly Asn Ser Asn Ser Gly Ser Thr
 1 5 10
 <210> 149
 <211> 19
 <212> PRT
 35 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 149
 40 Ala Arg Arg Gln Leu Leu Asp Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Trp Ala Ala
 1 5 10 15
 Phe Asp Val
 <210> 150
 45 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 50 <400> 150

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ala Asn
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Gly Val Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Gly Ser Ile Ala Tyr Arg Gly Asn Ser Asn Ser Gly Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ala Thr Val Ser Val Asp Thr
 65 70 75 80
 Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp
 85 90 95
 Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gln Leu Leu Asp Asp Gly Thr
 100 105 110
 Gly Tyr Gln Trp Ala Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> N/A

<400> 151

Ser Phe Asn Ile Gly Arg Tyr Pro

10 1 5

<210> 152

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

15 <220>

<223> N/A

<400> 152

Ser Thr Trp Asp Asp Thr Leu Lys Gly Trp Val

20 1 5 10

<210> 153

<211> 110

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

25 <223> N/A

<400> 153

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Glu Ala Pro Arg Gln

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asn Ser Phe Asn Ile Gly Arg Tyr

30 20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Asn Leu Arg Phe Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60

35 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Arg Asp Leu Leu

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Trp Asp Asp Thr Leu

85 90 95

Lys Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

40 100 105 110

<210> 154

<211> 8

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

45 <220>

<223> N/A

<400> 154

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

50 <210> 155

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 5 <223> N/A
 <400> 155
 Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr
 1 5
 <210> 156
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 15 <400> 156
 Ala Arg Val Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 157
 <211> 118
 20 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 157
 Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Val Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile
 100 105 110
 Ser Val Thr Asp Ser Ser
 115
 25 <210> 158
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 30 <220>
 <223> N/A
 <400> 158
 Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Val Ser Phe
 1 5 10
 35 <210> 159
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 40 <223> N/A
 <400> 159
 Gln Gln Thr Lys Glu Val Thr Trp Thr
 1 5
 45 <210> 160
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 50 <223> N/A
 <400> 160

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys
 85 90 95
 Glu Val Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 161

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> N/A

<400> 161

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala

10 1 5

<210> 162

<211> 8

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

15 <220>

<223> N/A

<400> 162

Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val

20 1 5

<210> 163

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

25 <223> N/A

<400> 163

Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr

30 1 5 10

<210> 164

<211> 118

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> N/A

35 <400> 164

Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Val Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ile Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Gly Thr Val Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 165

<211> 12

<212> PRT

40 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> N/A

<400> 165

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr

```

1           5           10
<210> 166
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> N/A
<400> 166
Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
10 1           5
<210> 167
<211> 113
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
15 <220>
<223> N/A
<400> 167
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1           5           10           15
Glu Lys Val Ile Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 20           25           30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 35           40           45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 50           55           60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 65           70           75           80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr His Cys Gln Asn
85 85           90           95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105           110
Lys
20 <210> 168
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo Sapiens (Людина розумна)
<400> 168
25 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1           5           10           15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
30 35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 65           70           75           80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
35 85           90           95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 100           105           110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
40 115           120           125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 130           135           140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150           155           160
45 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170           175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185           190
50 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200           205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

```

210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 5 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 10 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 15 325
 <210> 169
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 20 <400> 169
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125
 Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375
 <210> 170
 <211> 327
 25 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 170

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 5 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 10 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 15 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 20 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 25 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 30 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 35 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 40 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325
 <210> 171
 <211> 303
 45 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> N/A
 <400> 171
 50 Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser
 1 5 10 15
 Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro
 20 25 30
 Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys
 35 40 45
 55 Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu
 50 55 60
 Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys
 65 70 75 80
 60 Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys

85 90 95
 Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu
 100 105 110
 Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly
 5 115 120 125
 Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln
 130 135 140
 Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro
 145 150 155 160
 10 His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp
 165 170 175
 Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly
 180 185 190
 Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu
 15 195 200 205
 Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly
 210 215 220
 Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu
 225 230 235 240
 20 Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His
 245 250 255
 Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys
 260 265 270
 Ser Ser Pro Gly Ser Ser Ser His His His His His His Pro Gly Gly
 25 275 280 285
 Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 290 295 300
 <210> 172
 <211> 99
 30 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens (Людина розумна)
 <400> 172
 Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
 1 5 10 15
 35 Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
 20 25 30
 Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
 35 40 45
 Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
 40 50 55 60
 Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
 65 70 75 80
 Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
 85 90 95
 45 Arg Asp Met

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Поліпептид, який містить Fc-область імуноглобуліну й антигензв'язувальну ділянку, причому Fc-область включає: а) заміну E430G, і b) заміну K326W і E333S, причому ці положення відповідають IgG1 людини згідно з нумерацією EU.
2. Поліпептид за п. 1, який **відрізняється** тим, що він містить одну або декілька додаткових замін в Fc-області.
3. Поліпептид за п. 2, який **відрізняється** тим, що додатковою заміною є K439E або S440K.
4. Поліпептид за пп. 2, 3, який **відрізняється** тим, що додатковою заміною є F405L або K409R.
5. Поліпептид за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що поліпептид є антитілом, моноспецифічним антитілом, біспецифічним антитілом або мультиспецифічним антитілом.
6. Поліпептид за п. 5, при цьому поліпептид є біспецифічним антитілом, яке містить Fc-область, яка містить перший важкий ланцюг і першу антигензв'язувальну ділянку, другий важкий ланцюг і

другу антигензв'язувальну ділянку, причому:

а) зазначений перший важкий ланцюг містить додаткову заміну, вибрану із заміни K409R або F405L,

5 б) зазначений другий важкий ланцюг містить додаткову заміну, вибрану із заміни K409R або F405L,

с) причому додаткові заміни в зазначеному першому важкому ланцюзі й зазначеному другому важкому ланцюзі знаходяться не в тому ж самому положенні.

7. Поліпептид за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що Fc-область представлена ізоטיפами IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 людини або змішаним ізотипом.

10 8. Поліпептид за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що Fc-область представлена ізотипом IgG1 людини.

9. Поліпептид за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що цей поліпептид є людським антитілом, гуманізованим антитілом або химерним антитілом.

15 10. Поліпептид за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що антигензв'язувальна ділянка зв'язується із представником суперродини рецепторів фактора некрозу пухлин (TNFR-SF) або суперродини пов'язаних з G-білком рецепторів (GPCR).

20 11. Поліпептид за будь-яким з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що антигензв'язувальна ділянка зв'язується із представником TNFR-SF, вибраним із групи, яка складається з FAS, DR4, DR5, TNFR1, DR6, DR3, EDAR, NGFR, OX40, CD40, CD30, CD27, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, RELT і GITR.

12. Спосіб підвищення агоністичної активності поліпептиду, що містить Fc-область IgG людини й антигензв'язувальну ділянку, який передбачає: а) введення заміни E430G, і б) введення заміни K326W і E333S, причому положення відповідають IgG1 людини згідно з нумерацією EU.

25 13. Спосіб підвищення активності CDC поліпептиду, що містить Fc-область IgG людини й антигензв'язувальну ділянку, який передбачає: а) введення заміни E430G, і б) введення заміни K326W і E333S, причому положення відповідають IgG1 людини згідно з нумерацією EU.

14. Спосіб за будь-яким з пп. 12-13, який **відрізняється** тим, що спосіб передбачає введення однієї або декількох додаткових замін в Fc-області.

30 15. Спосіб за будь-яким з пп. 12-14, який **відрізняється** тим, що спосіб передбачає введення додаткової заміни в Fc-області, яка представлена K439E або S440K.

16. Спосіб за будь-яким з пп. 12-15, який **відрізняється** тим, що спосіб передбачає введення додаткової заміни в Fc-області, яка є F405L або K409R.

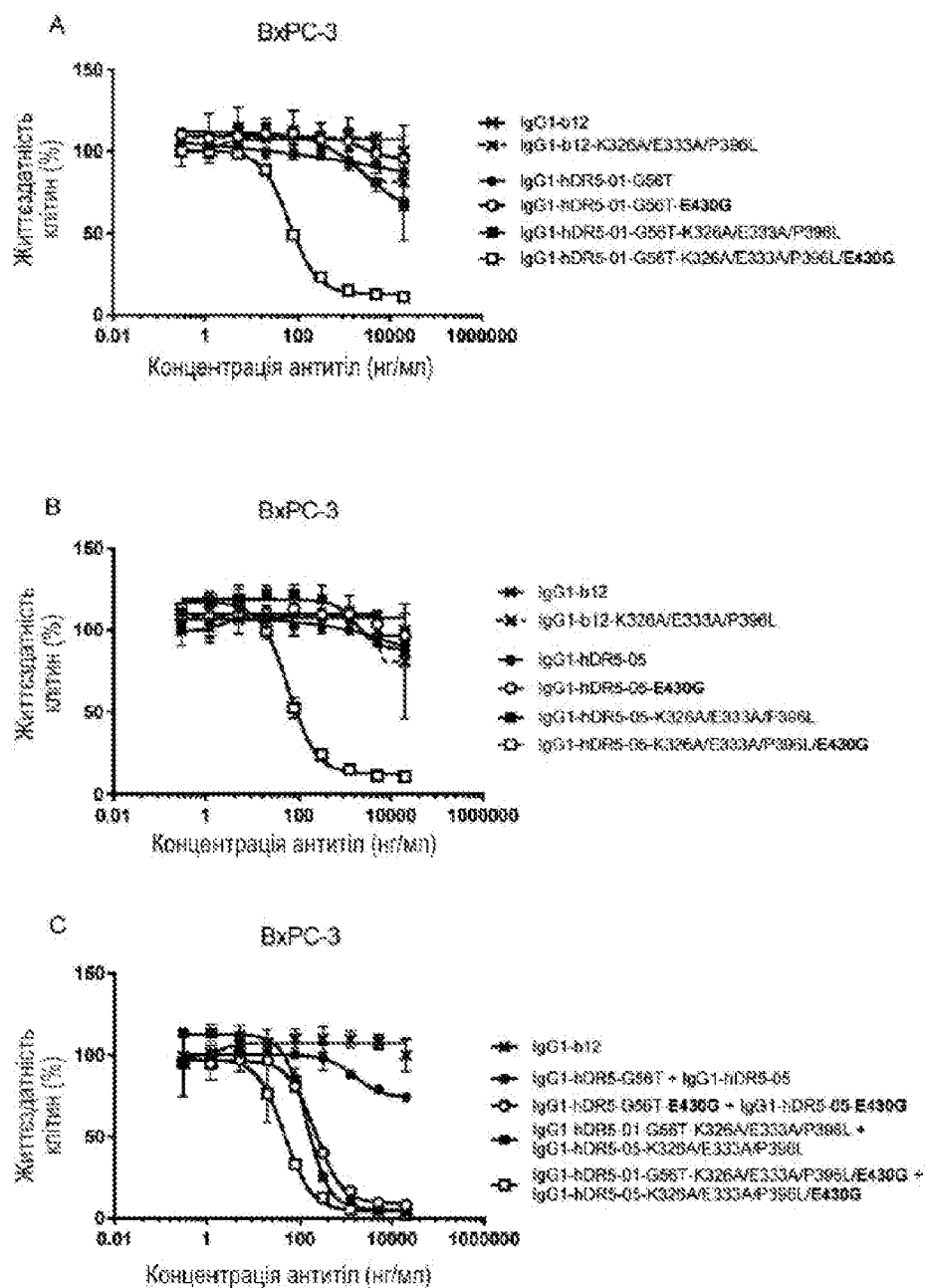
17. Композиція, яка містить щонайменше один поліпептид за будь-яким з пп. 1-16.

35 18. Композиція за п. 17, яка **відрізняється** тим, що містить перший поліпептид і другий поліпептид за будь-яким з пп. 1-11.

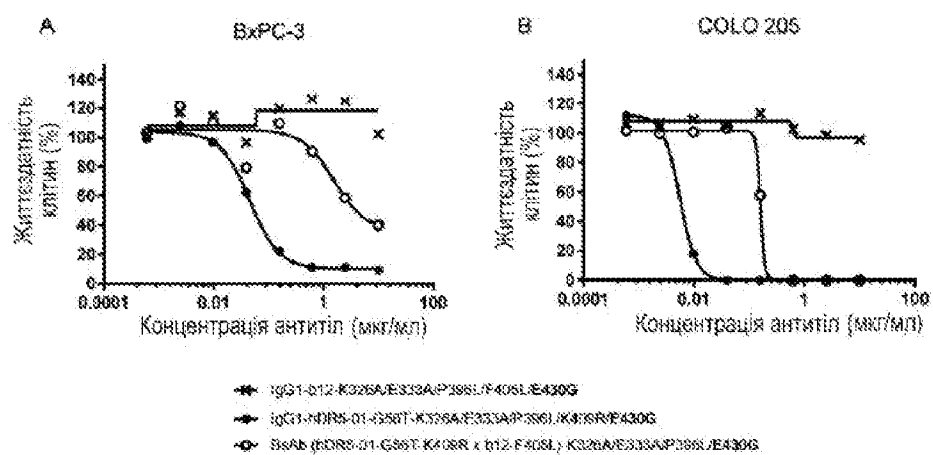
19. Композиція за будь-яким з пп. 17-18, яка **відрізняється** тим, що композиція є фармацевтичною композицією.

20. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-11 або композиція за будь-яким з пп. 17-19, які **відрізняються** тим, що їх застосовують як лікарський засіб.

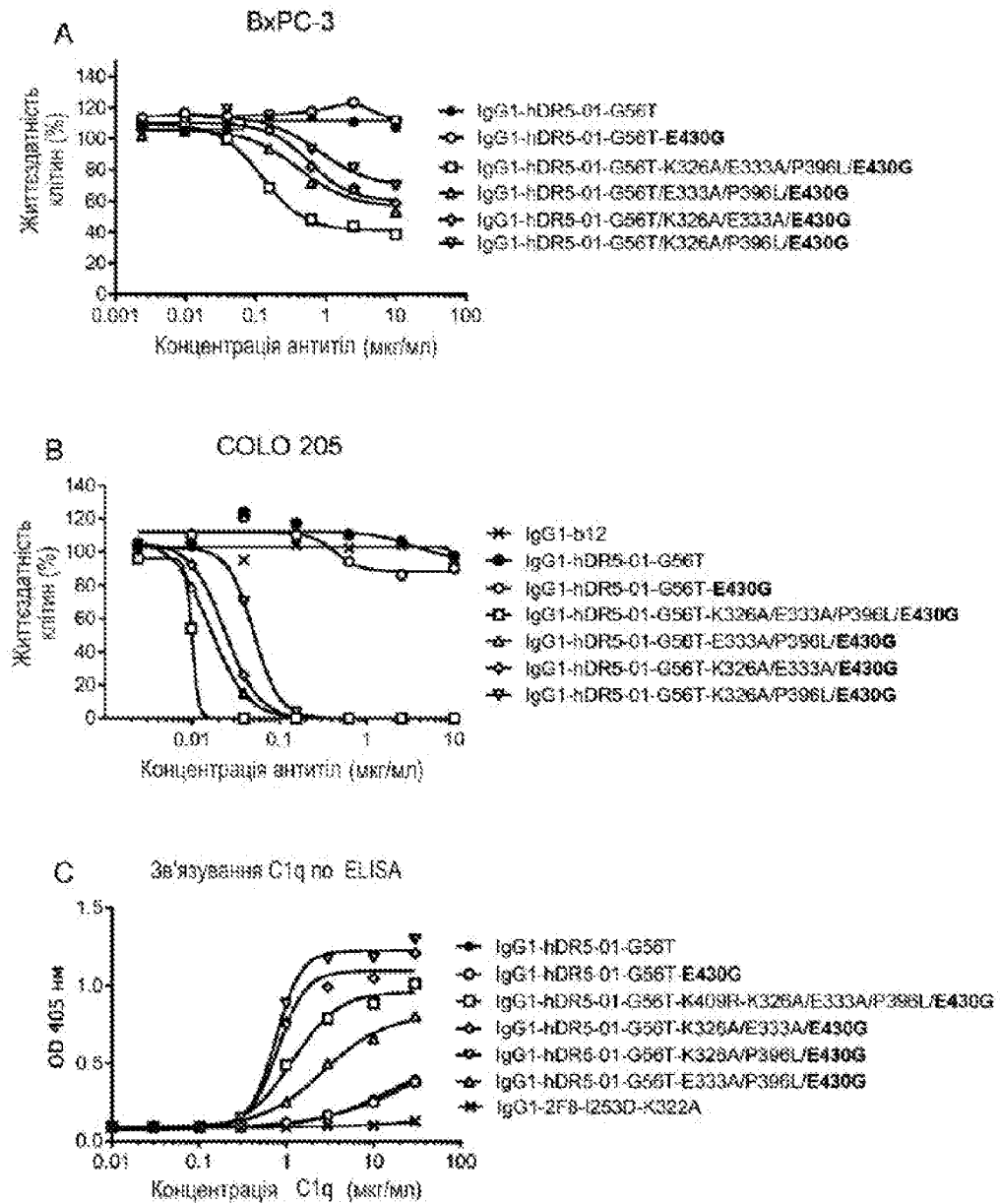
40 21. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-11 або композиція за будь-яким з пп. 17-19, які **відрізняються** тим, що їх застосовують при лікуванні раку, аутоімунних захворювань, запальних захворювань або інфекційних захворювань.



Фіг. 1



Фиг. 2



Фір. 3

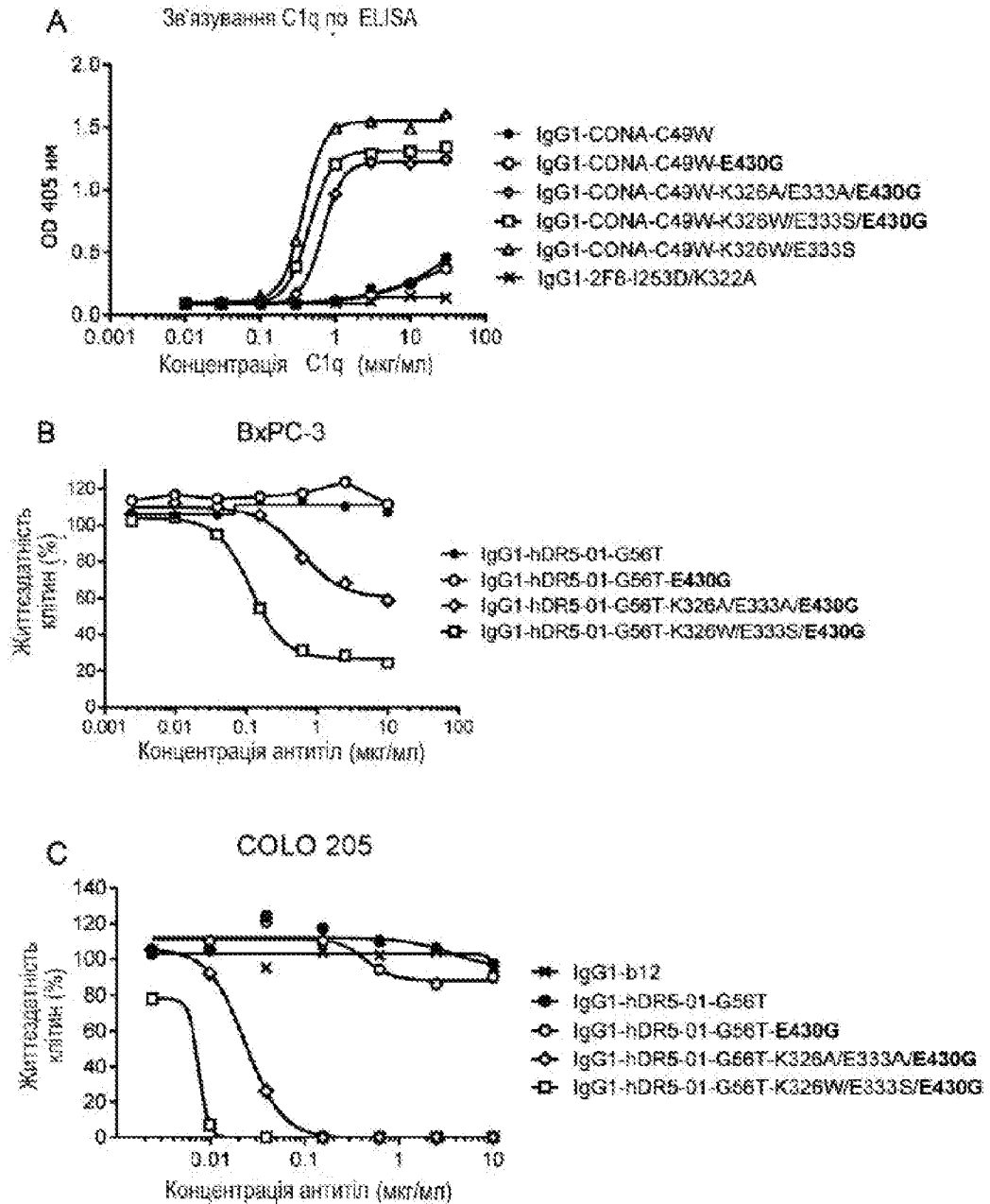
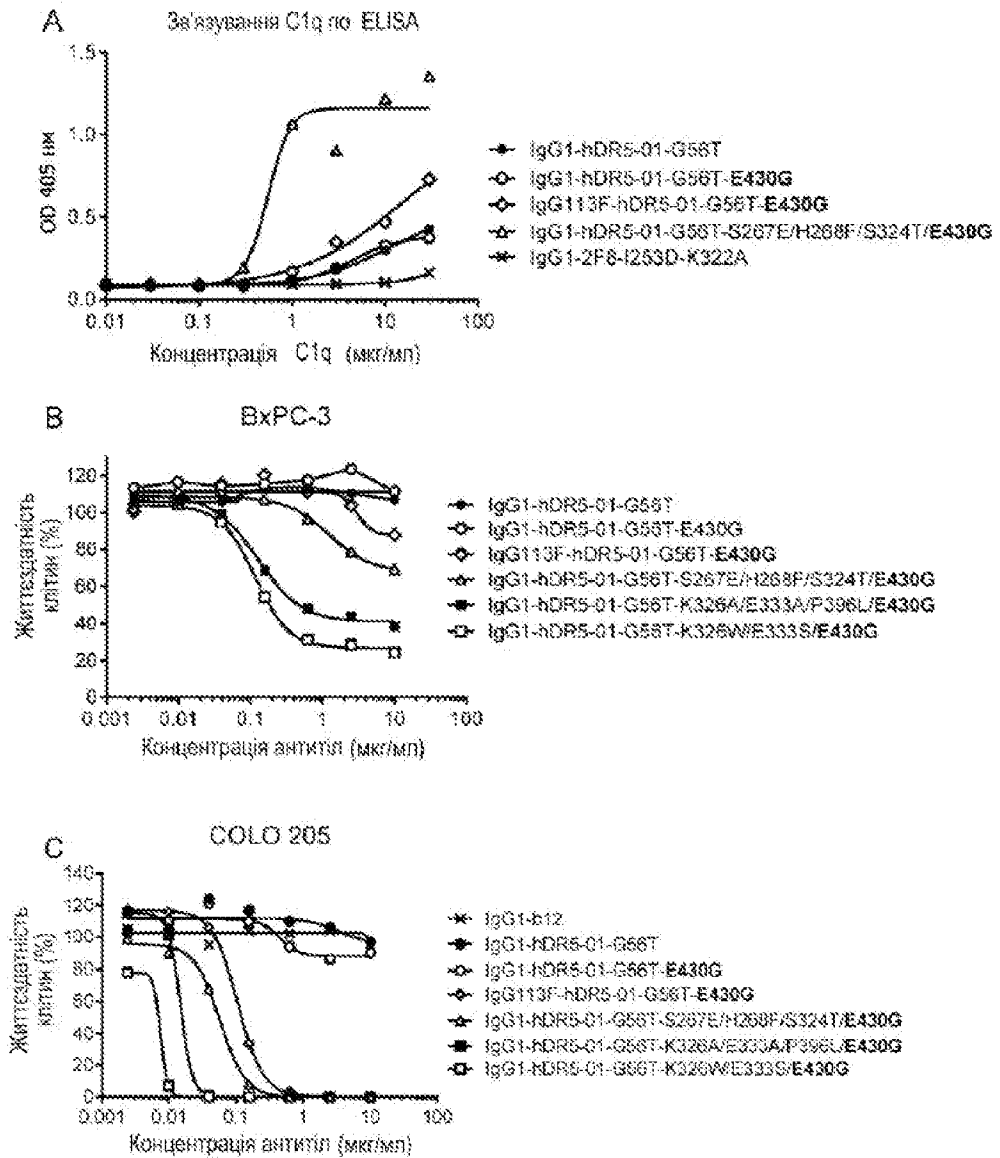
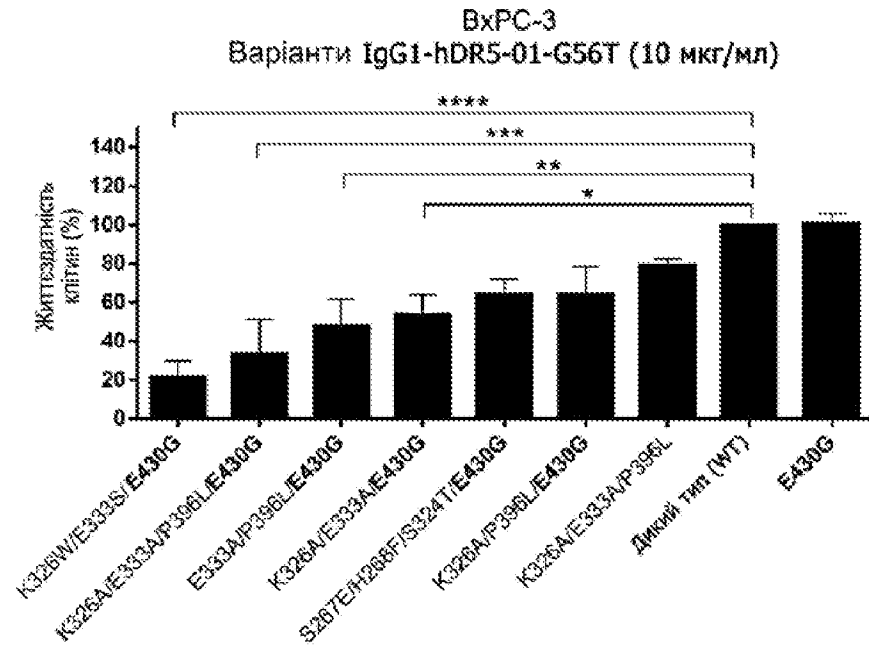


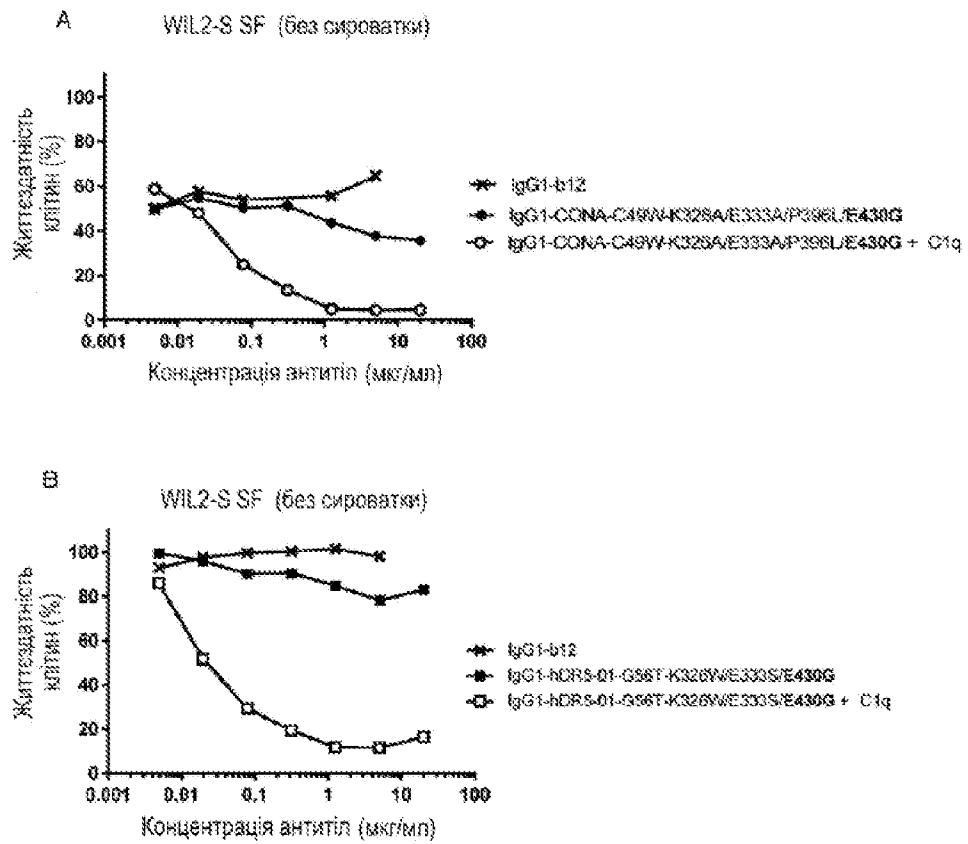
Fig. 4



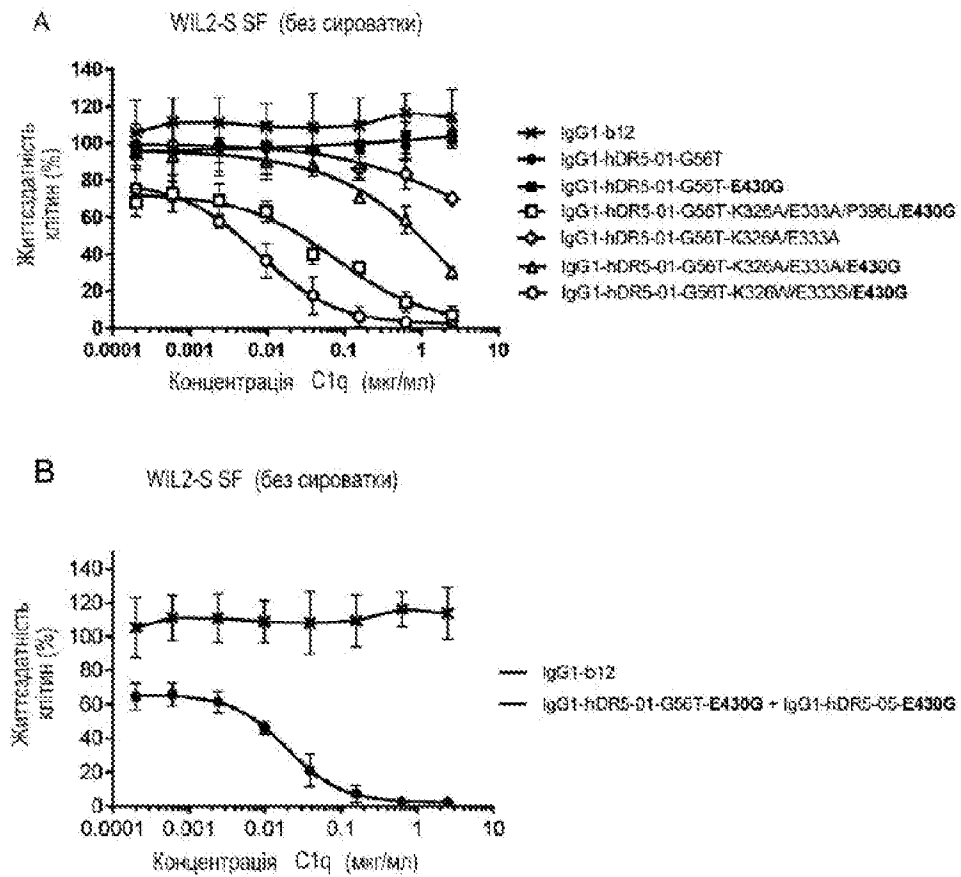
Фиг. 5



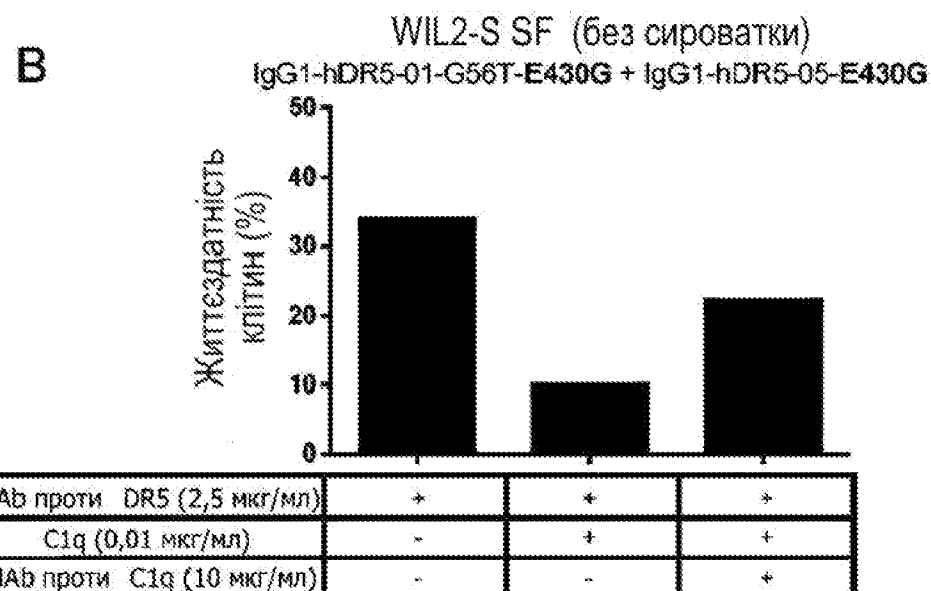
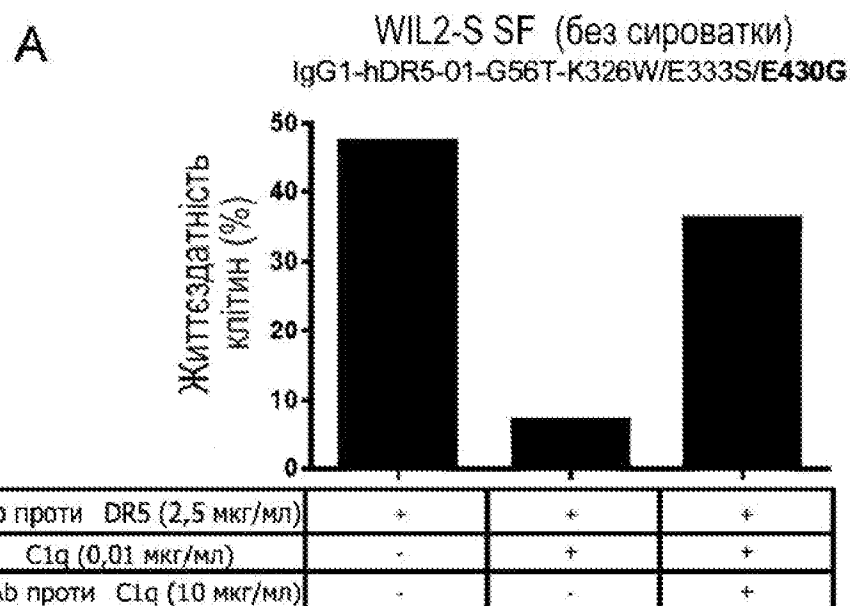
Фіг. 6



Фіг. 7



Фиг. 8



Фіг. 9

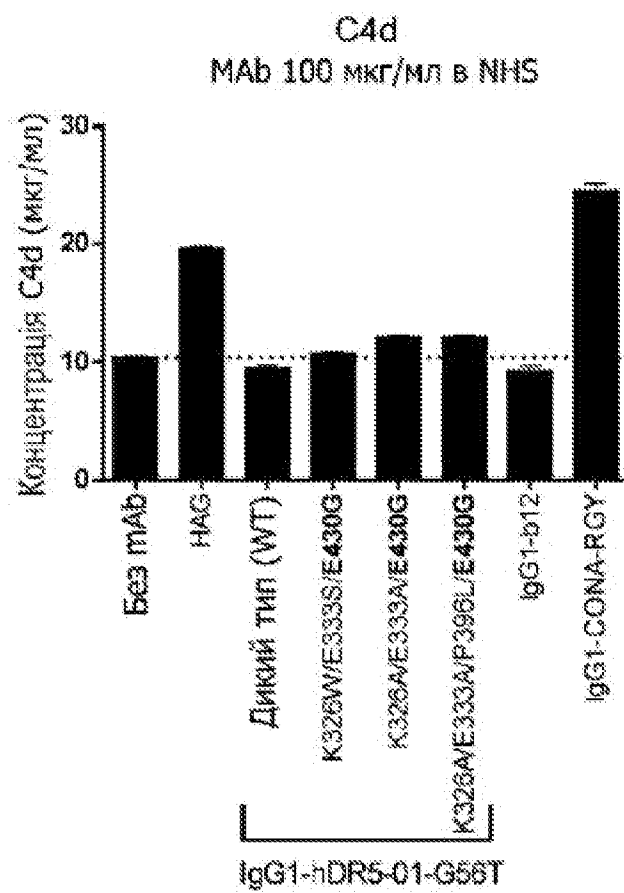


Fig. 10

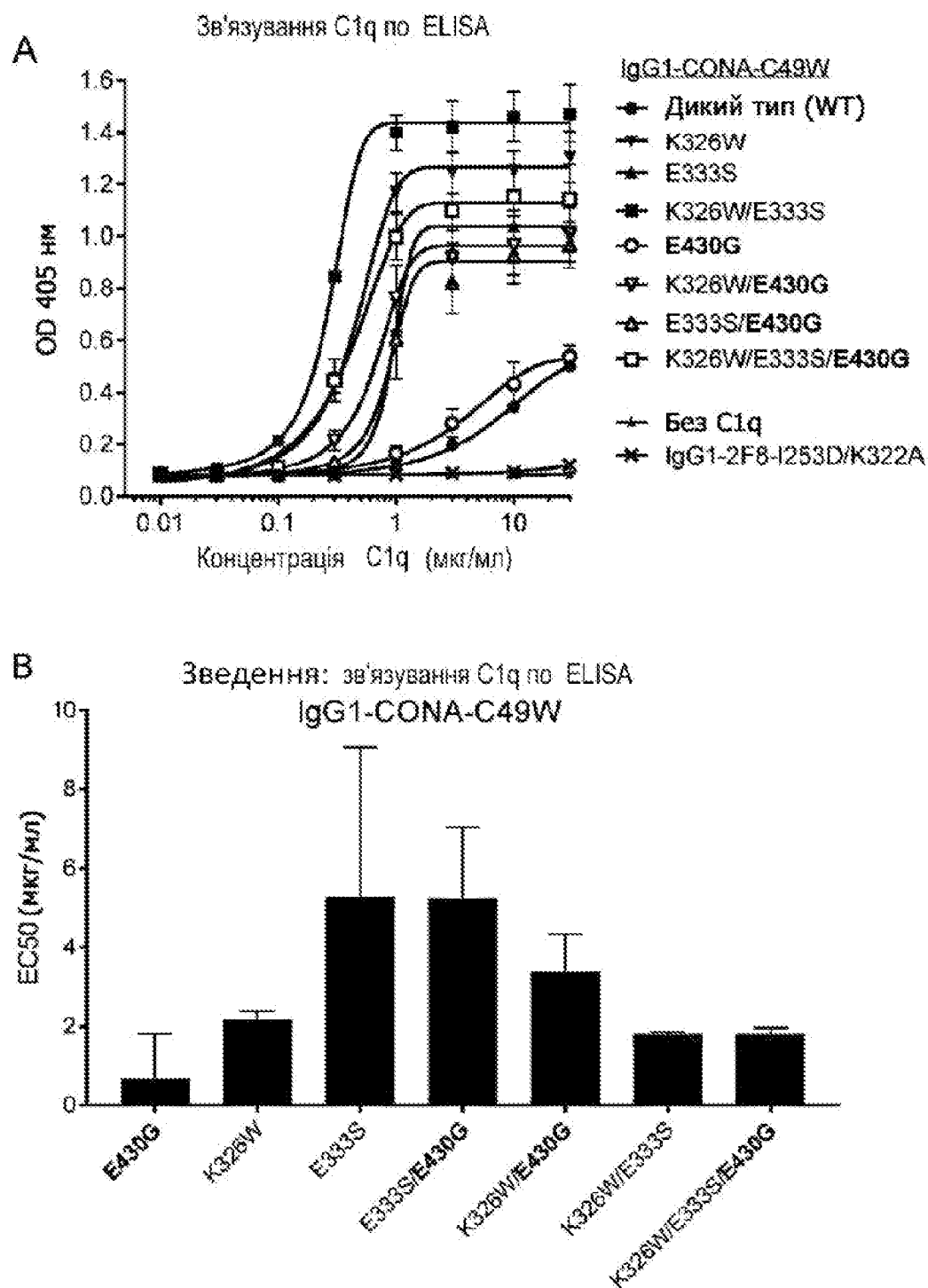
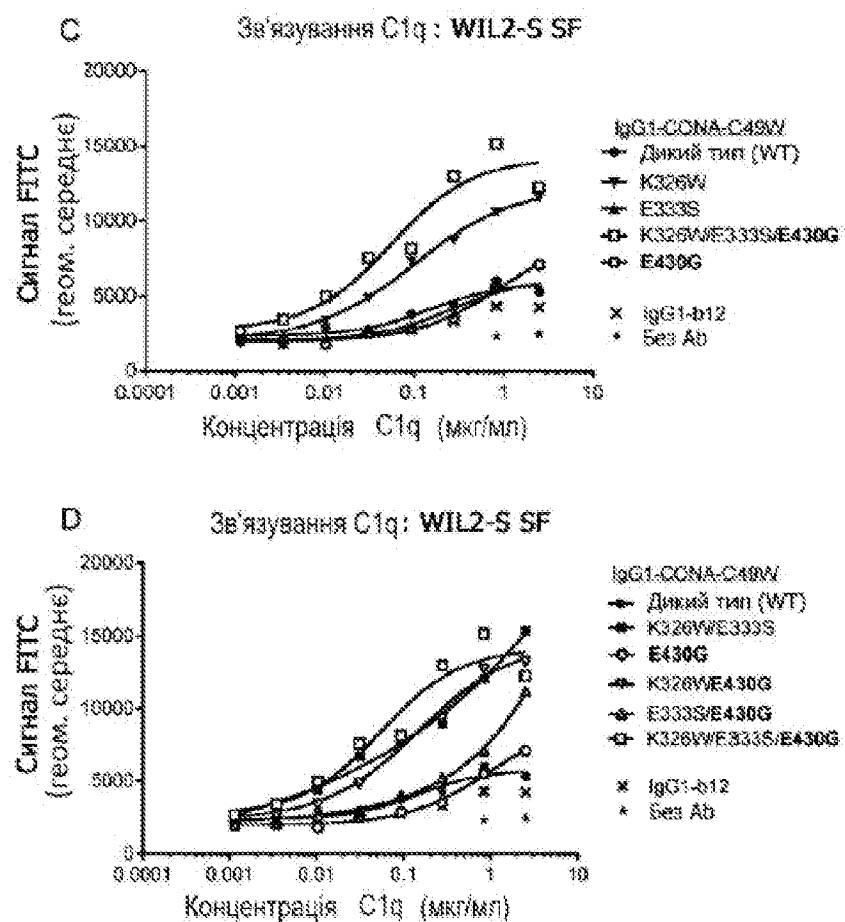
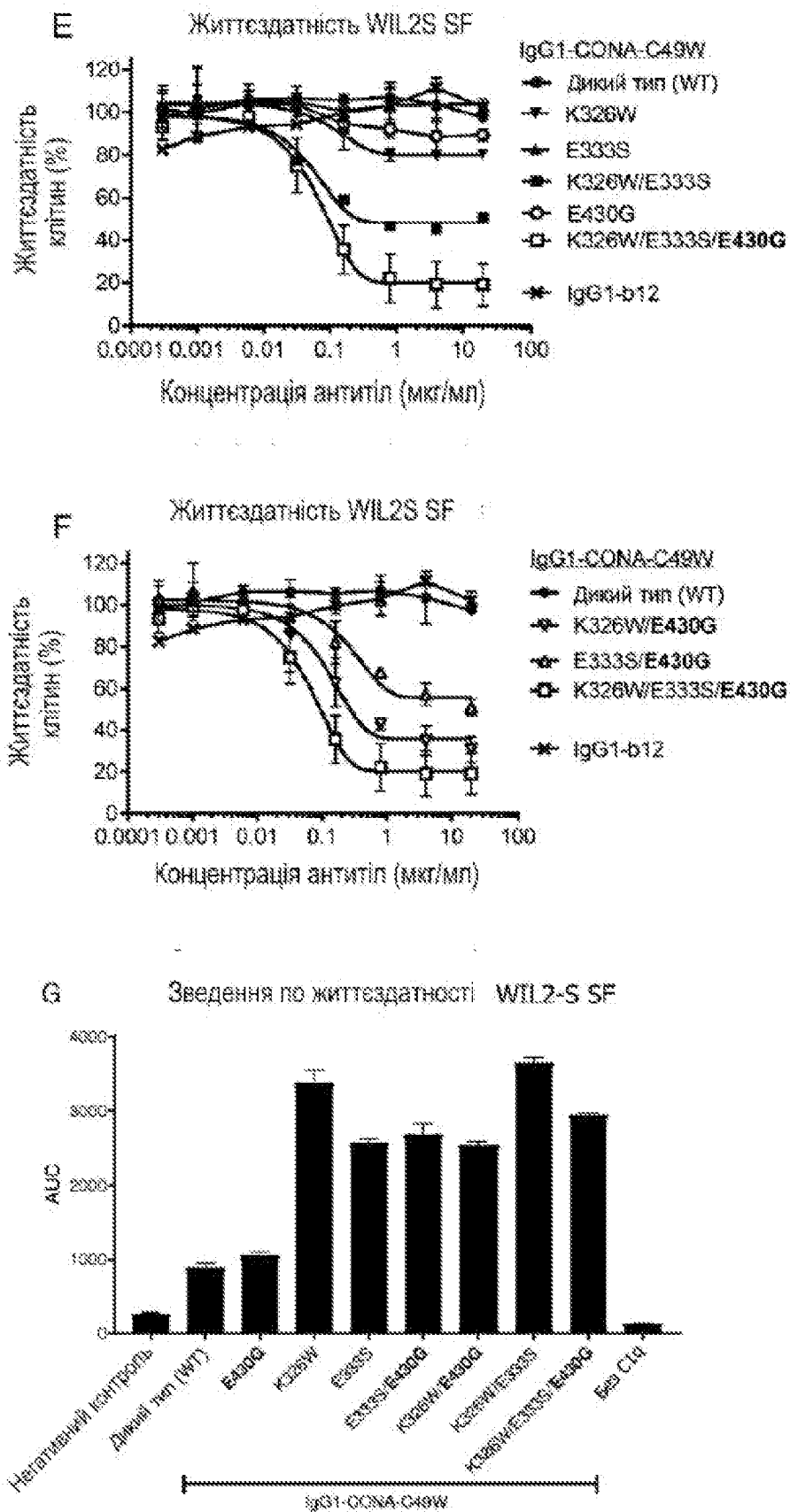


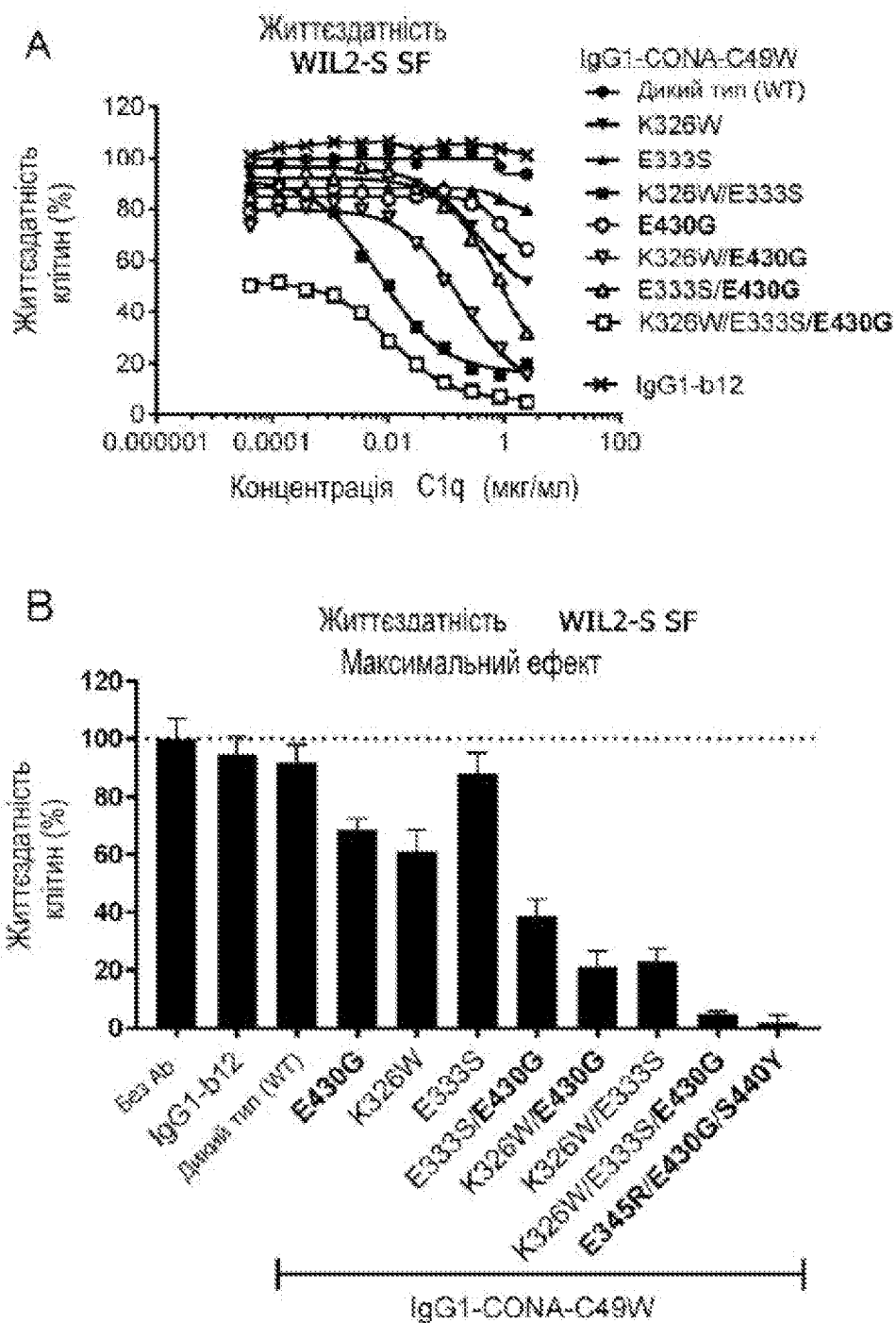
Fig. 11



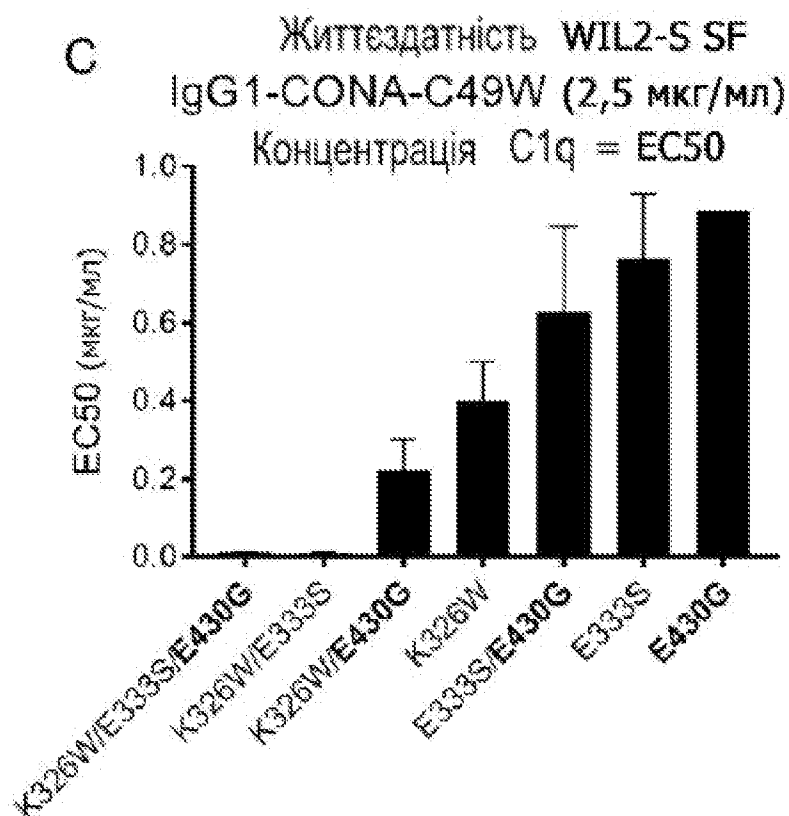
Фіг. 11 продовження



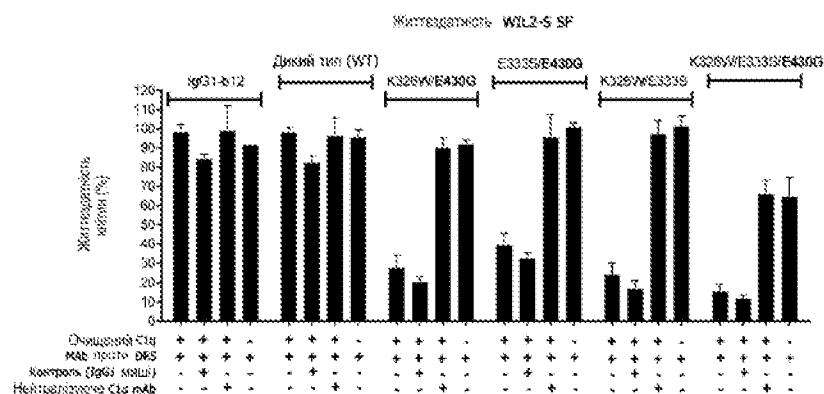
Фіг. 11 продовження



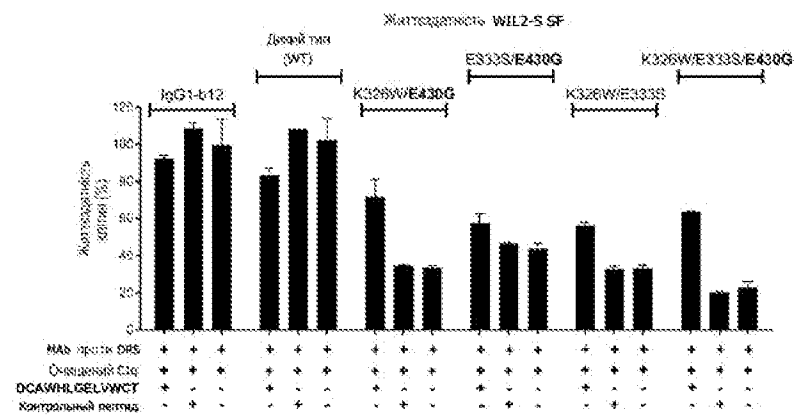
Фіг. 12



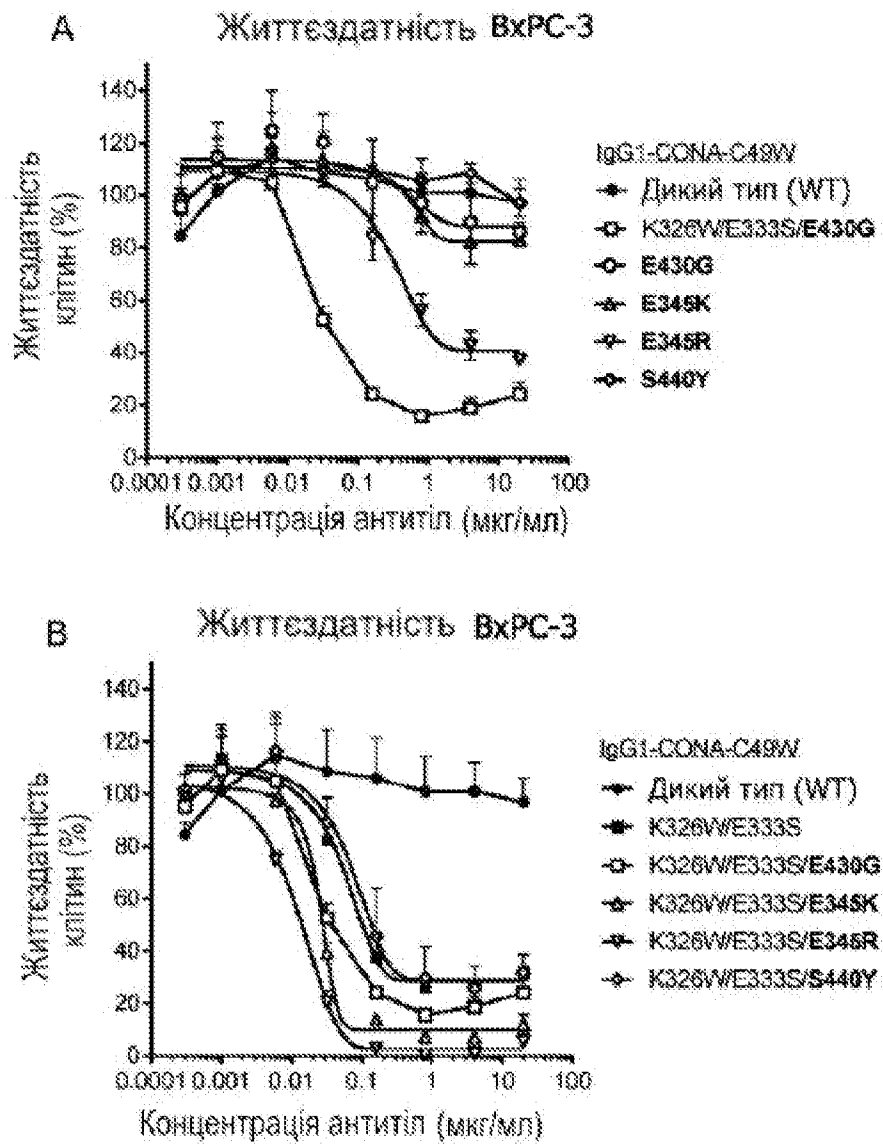
Фіг. 12 продовження



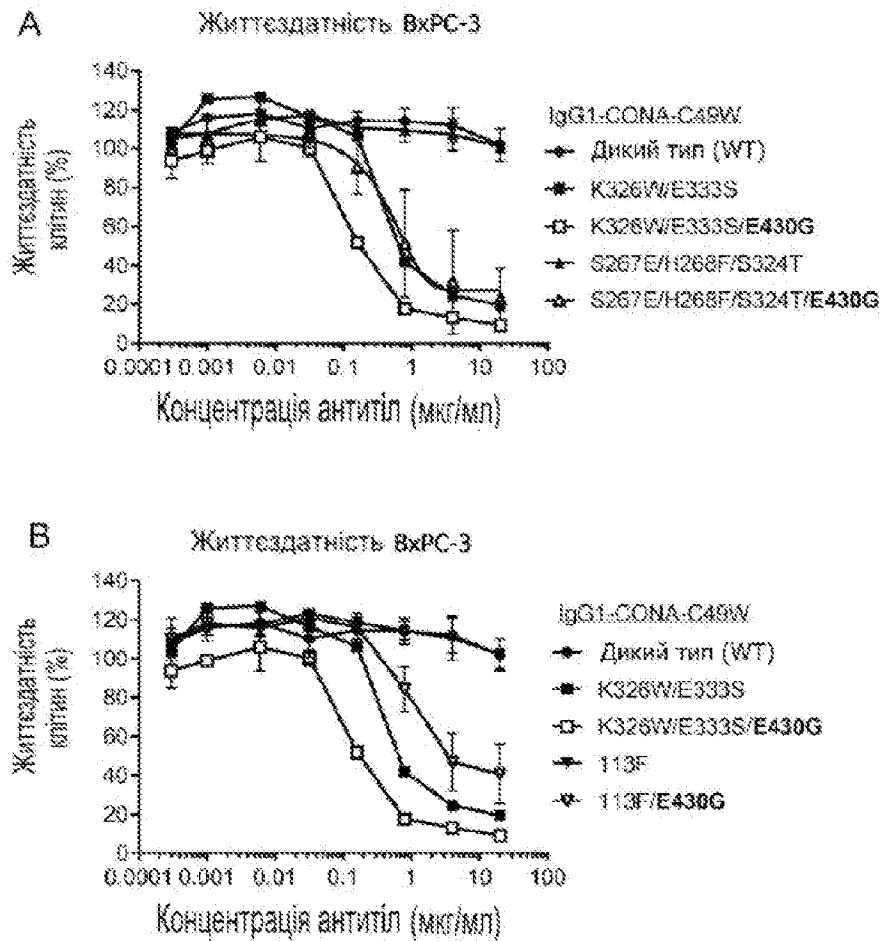
Фіг. 13



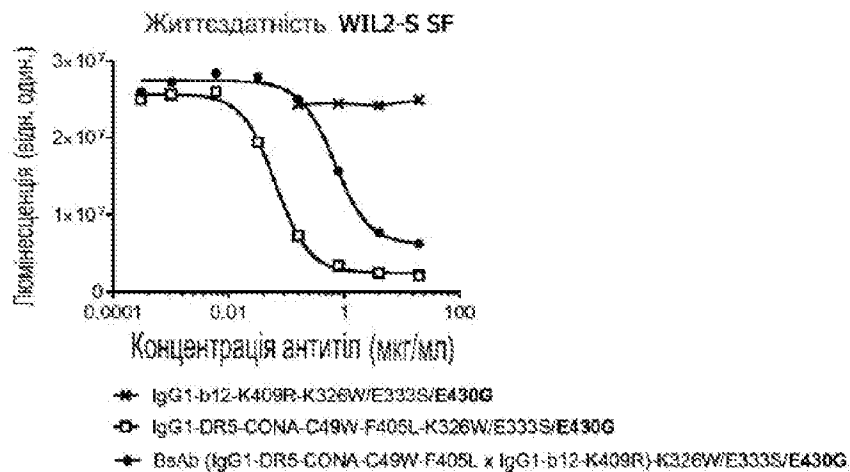
Фиг. 14



Фіг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

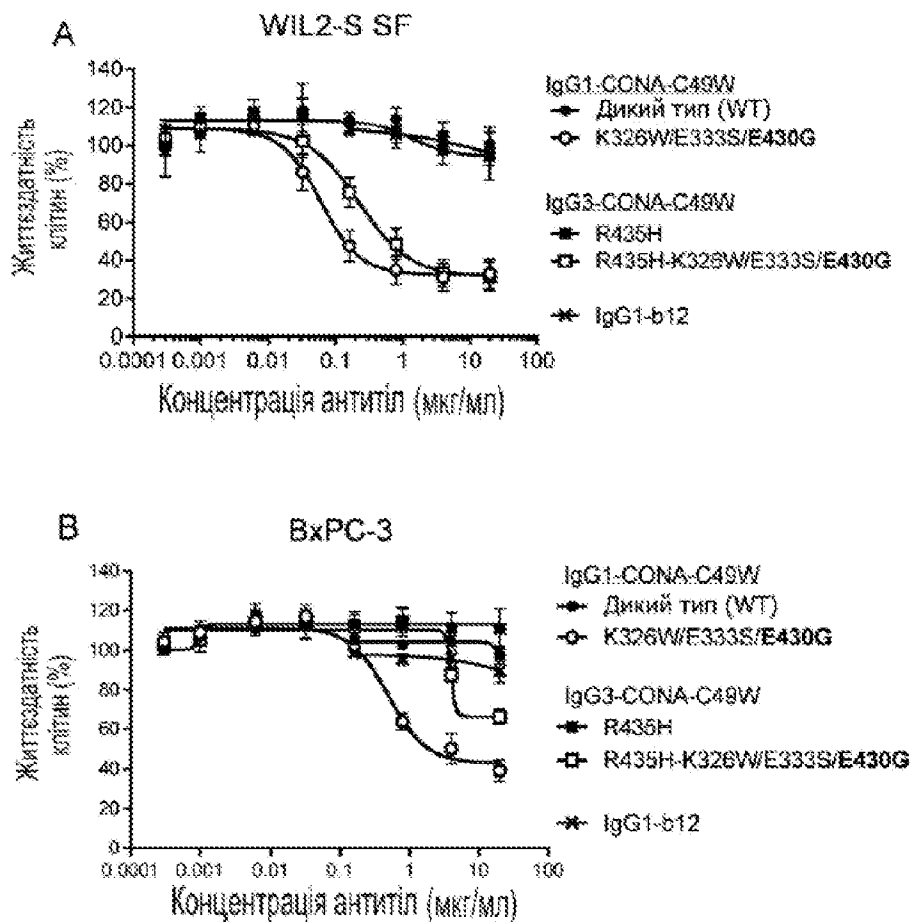
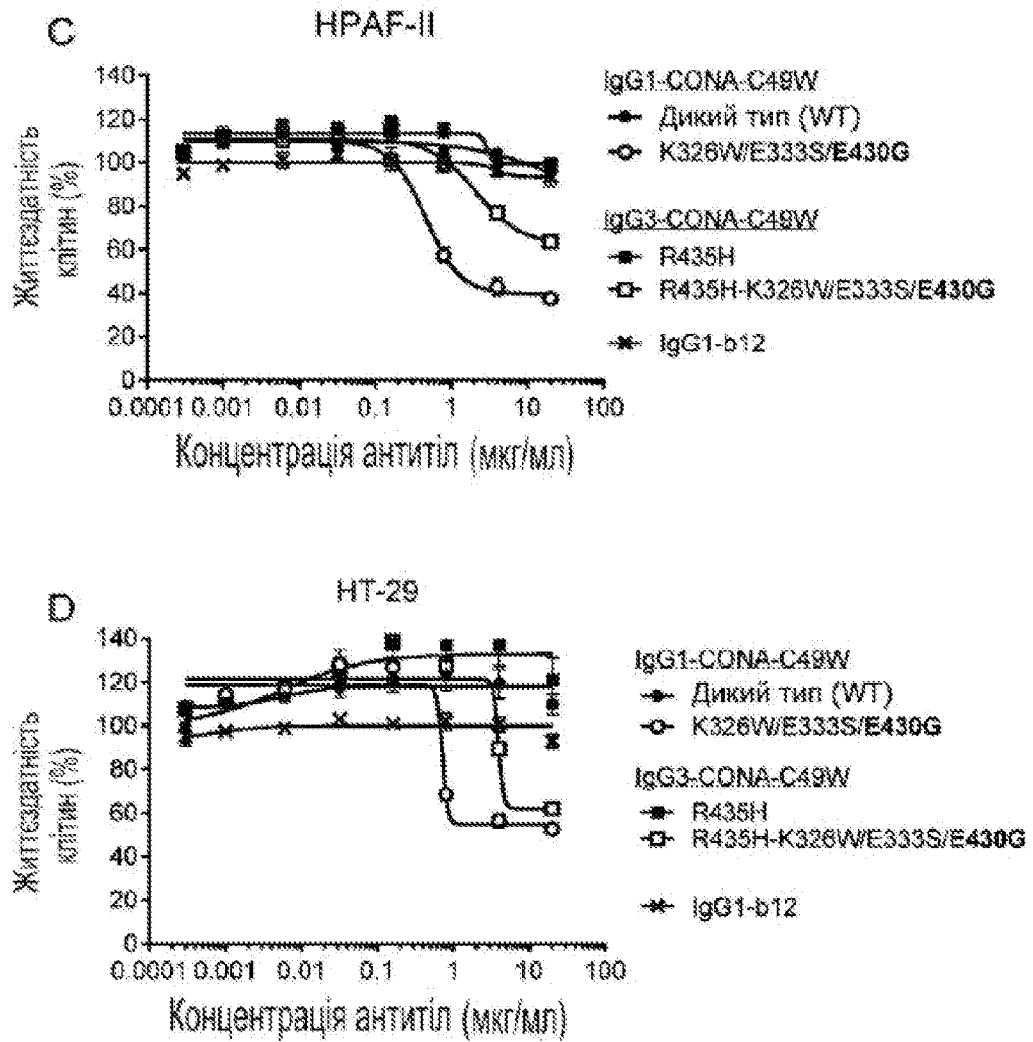
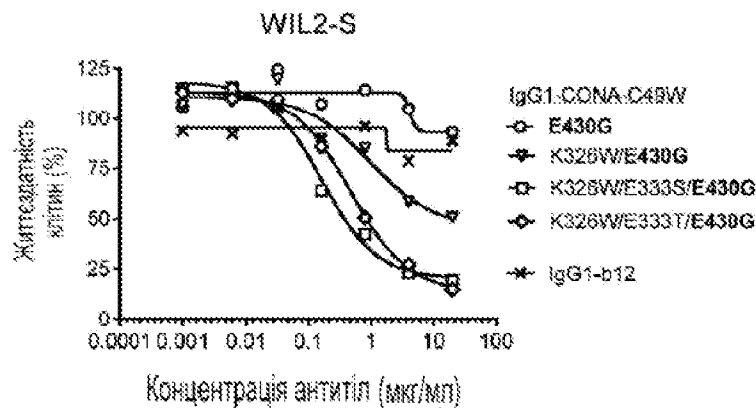


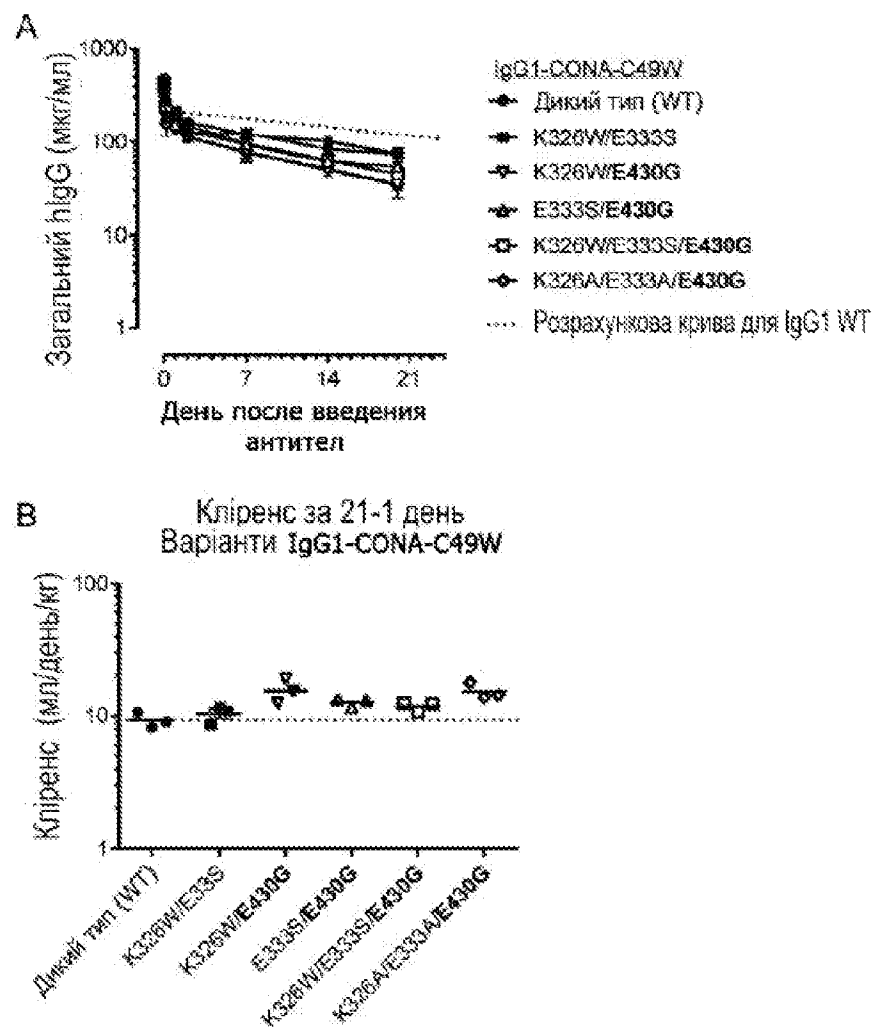
Fig. 18



Фіг. 18 продовження



Фіг. 19



Фіг. 20

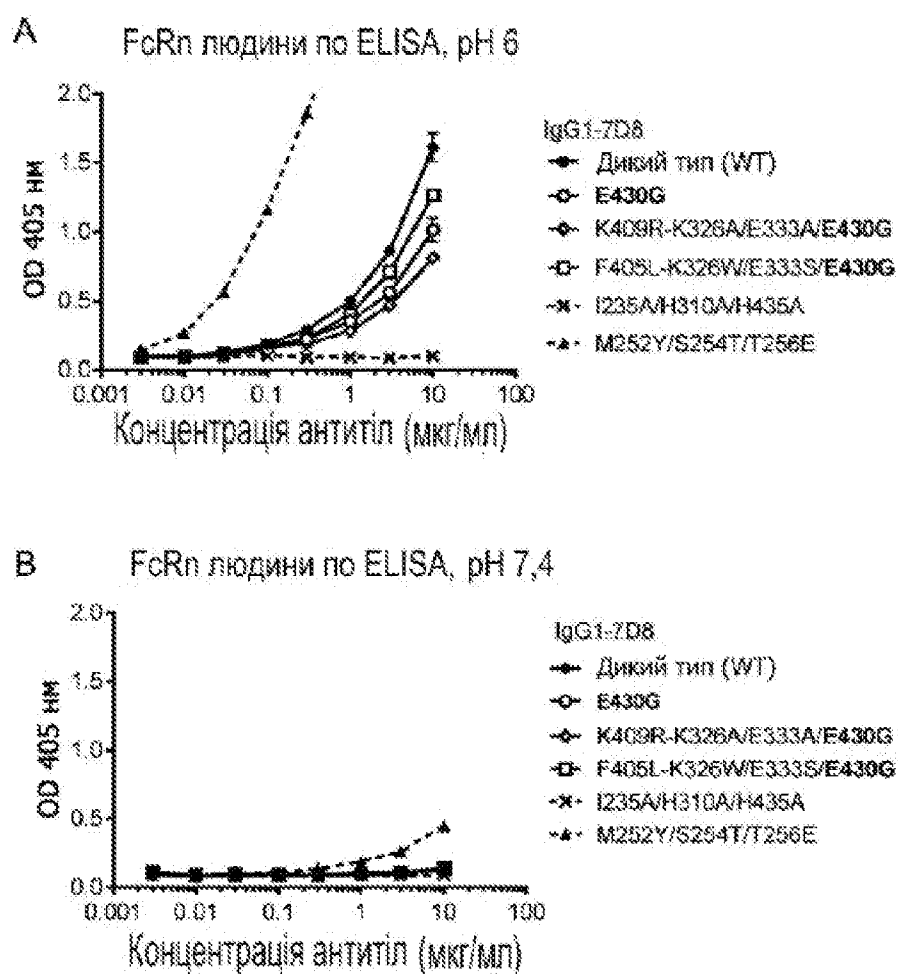
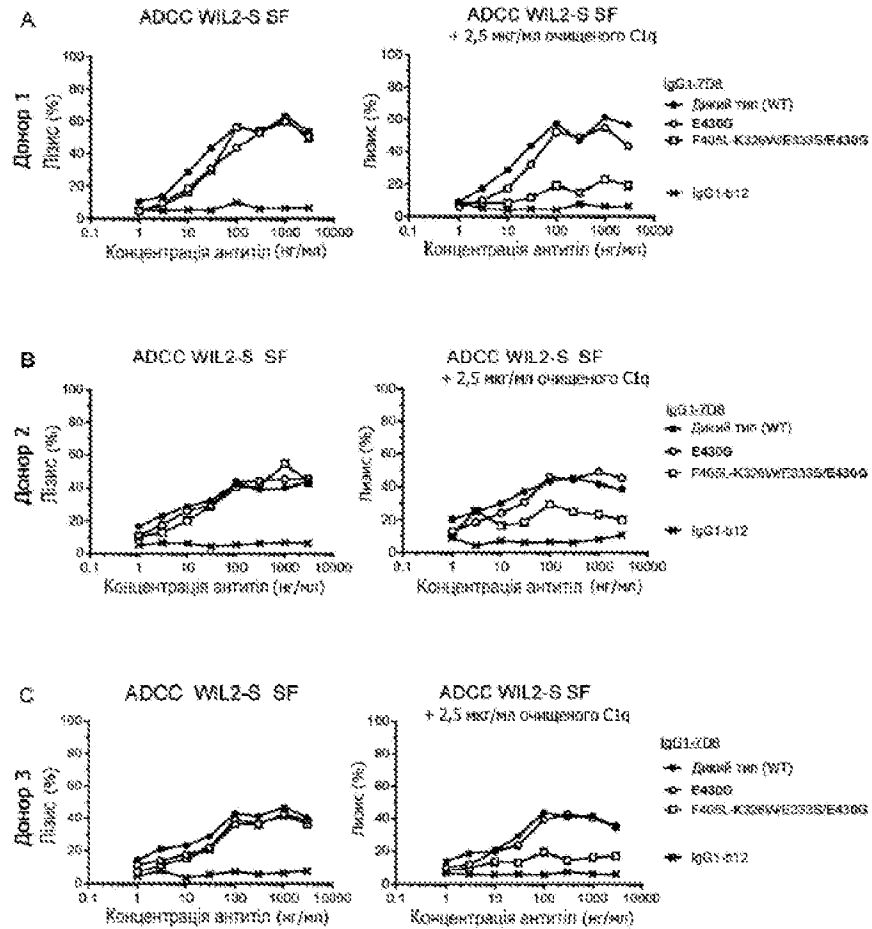
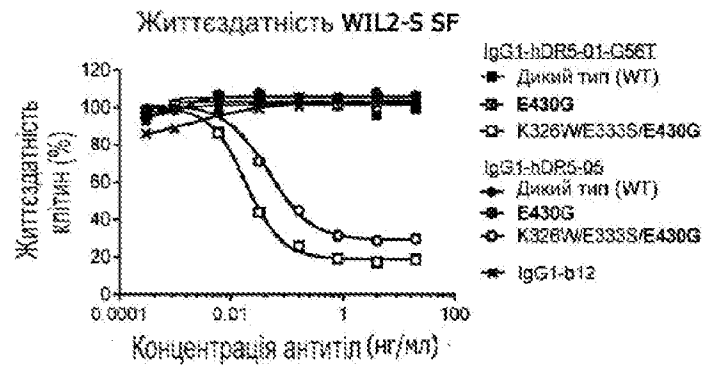


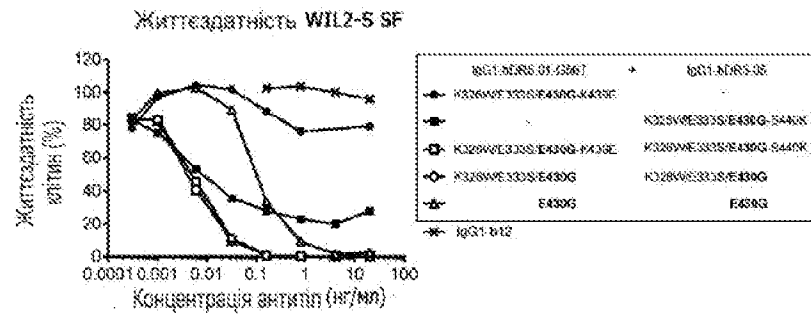
Fig. 21



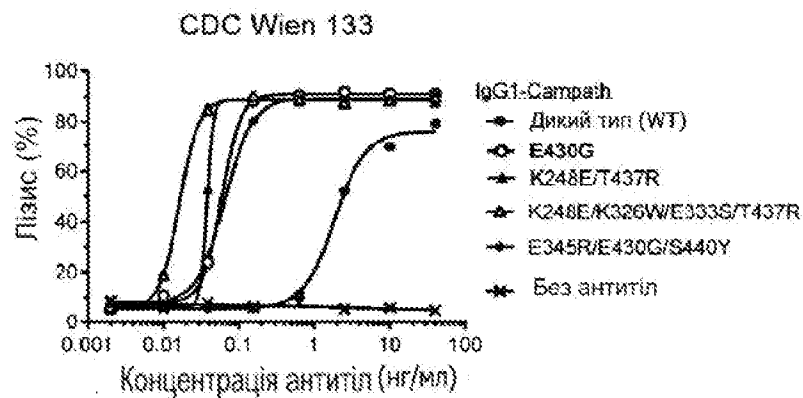
Фиг. 22



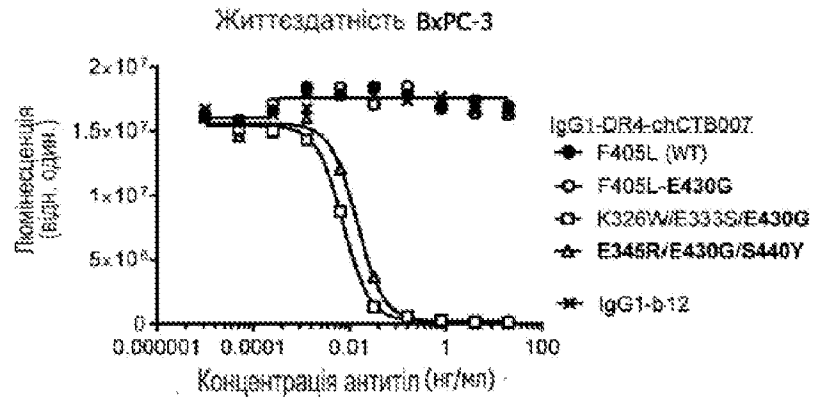
Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26

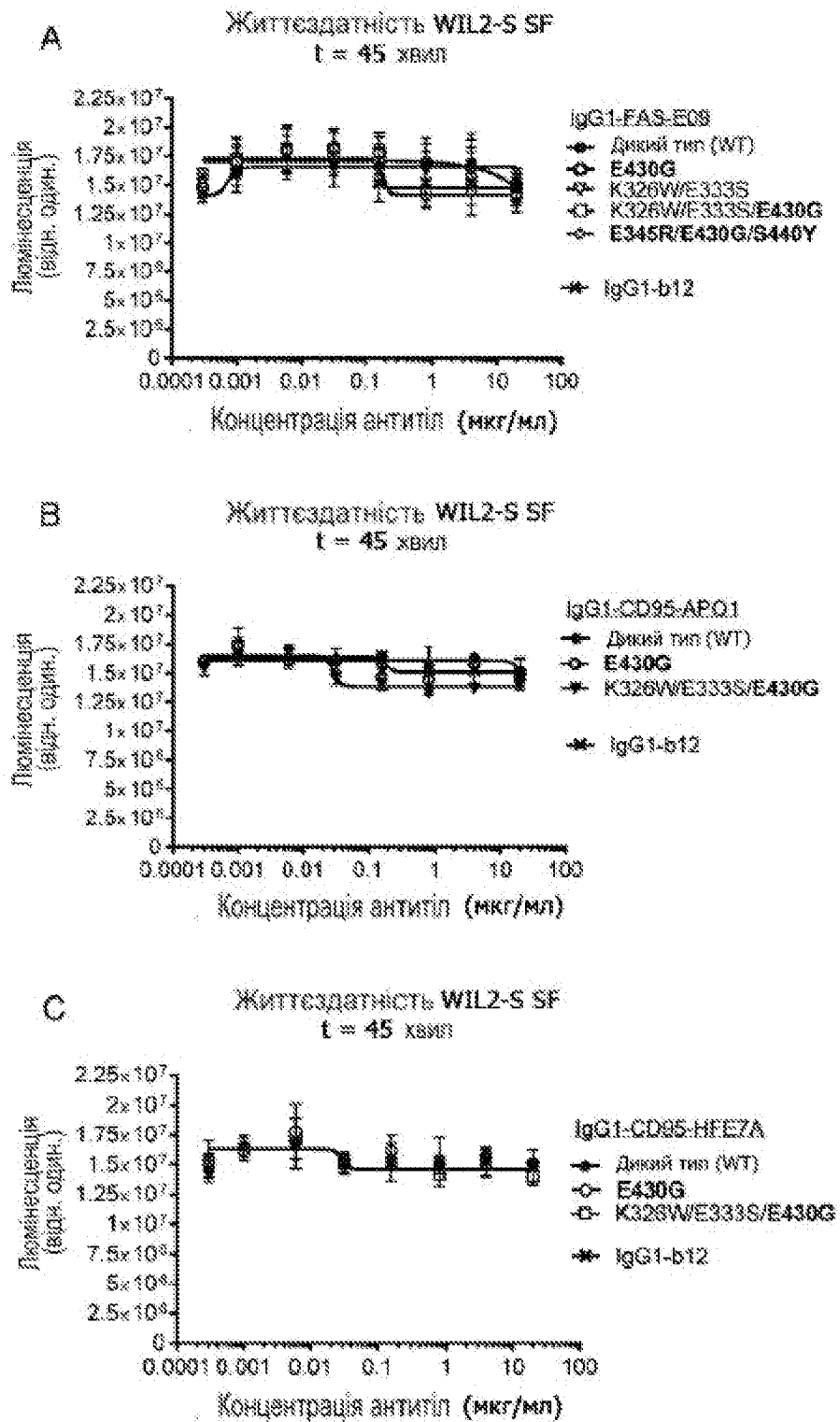
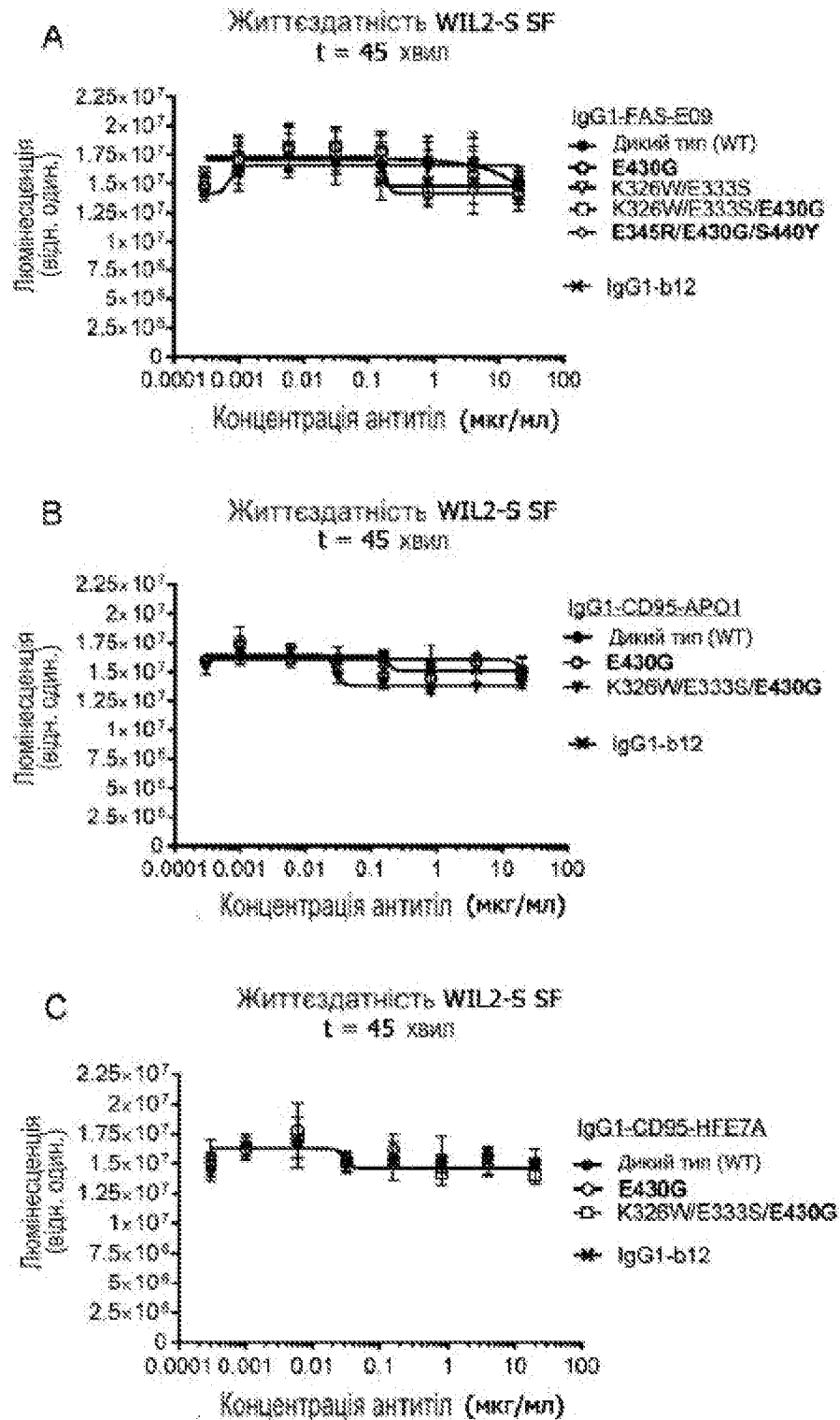
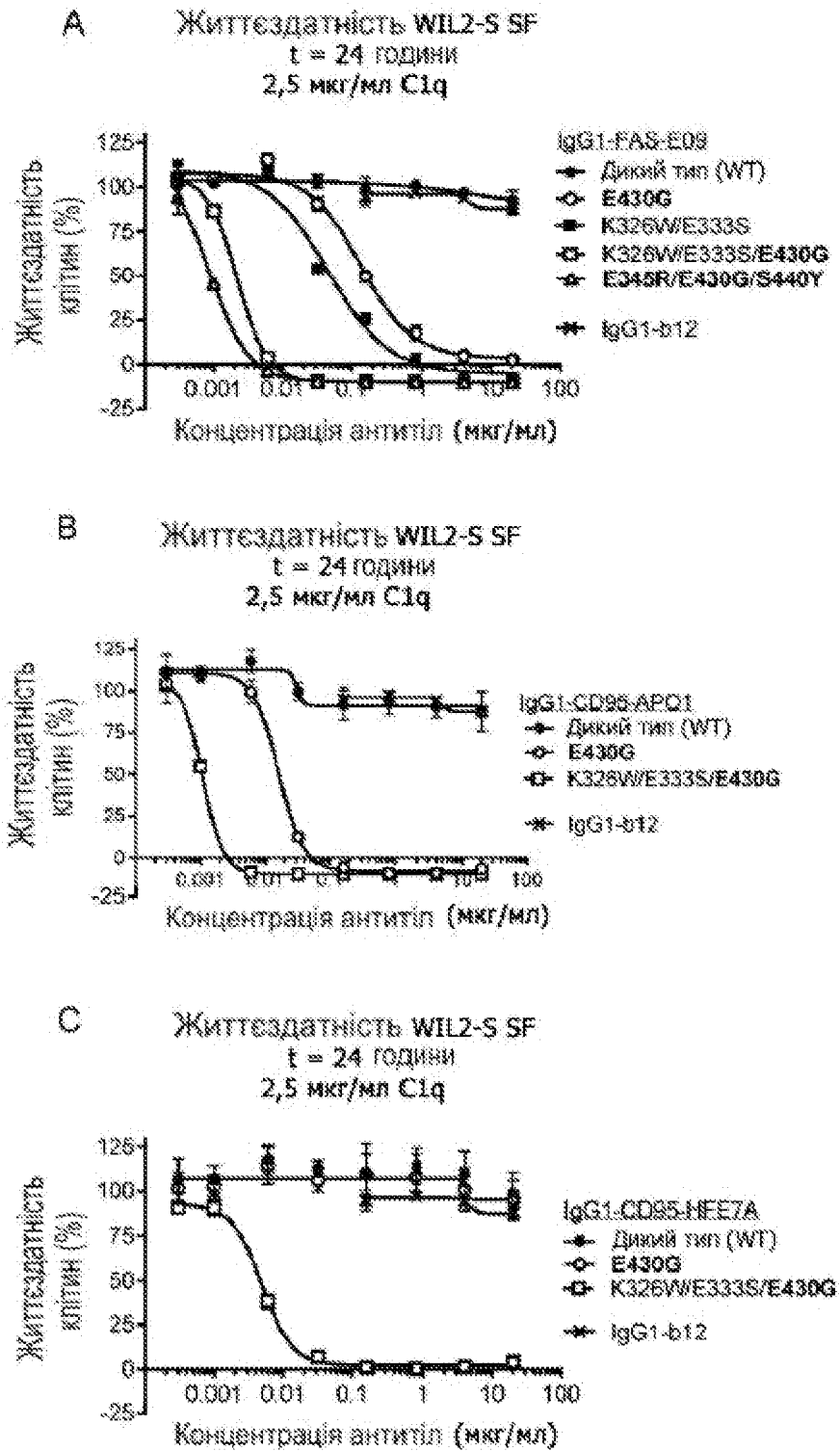


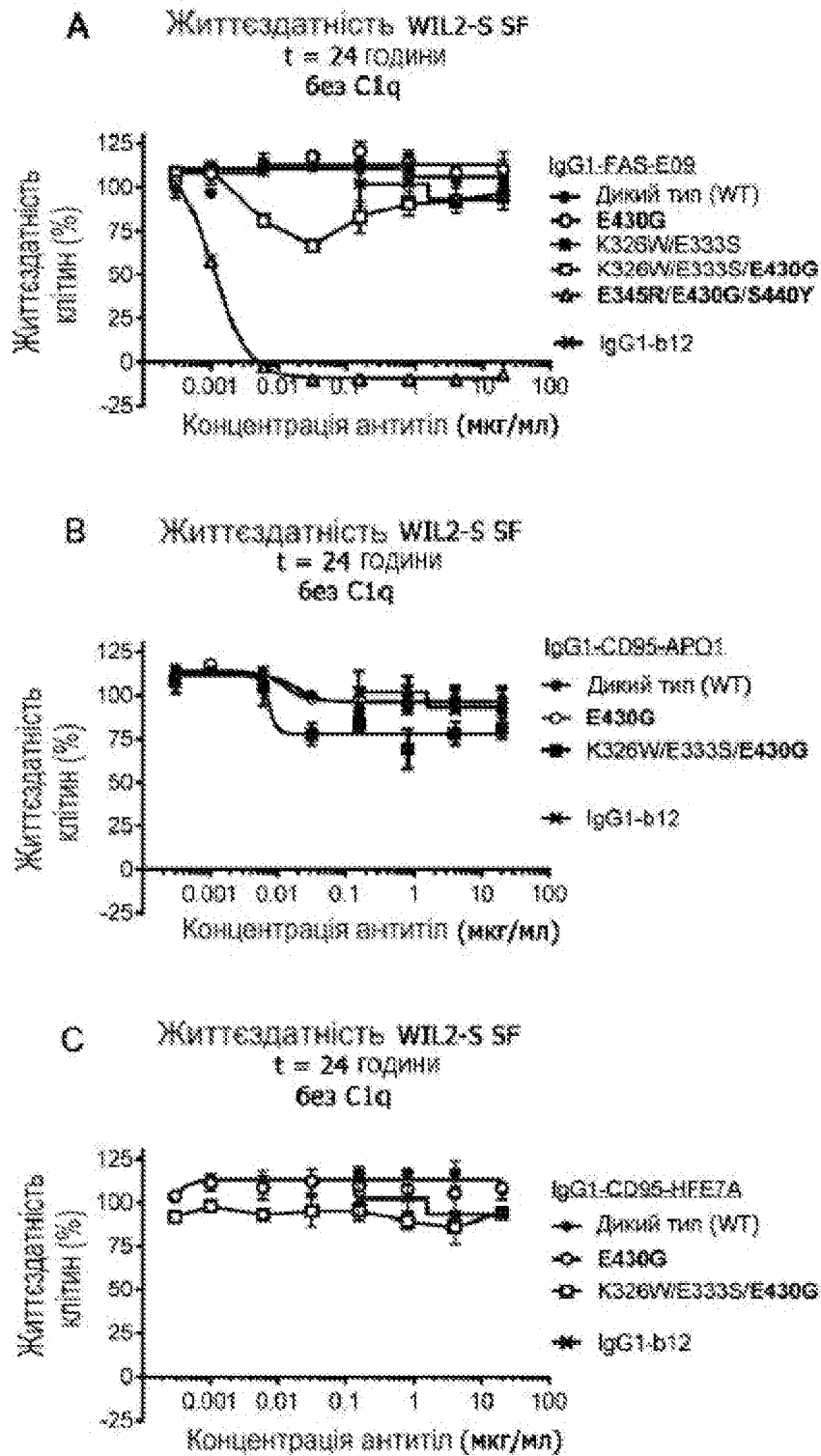
Fig. 27



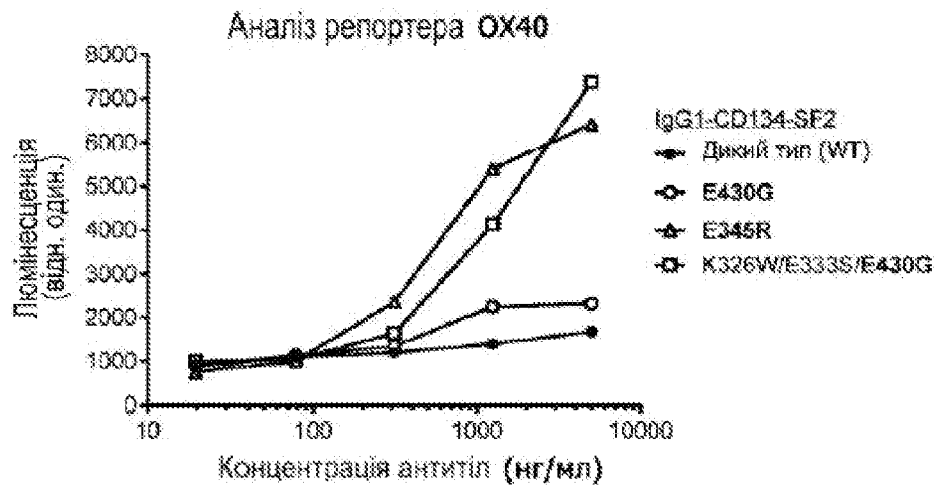
Фіг. 28



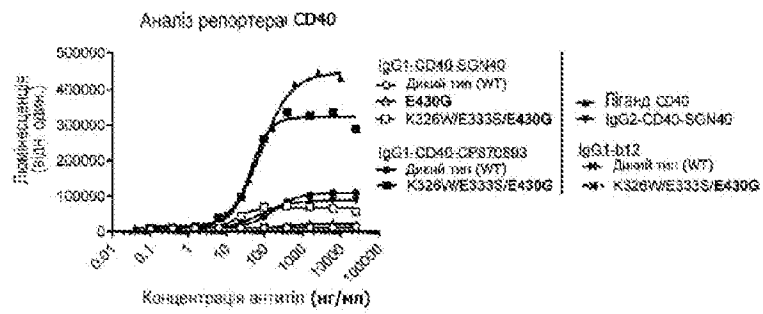
Фіг. 29



Фіг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32

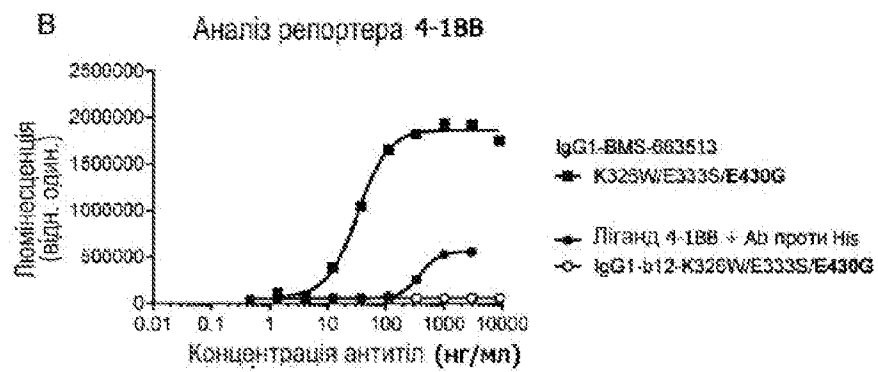
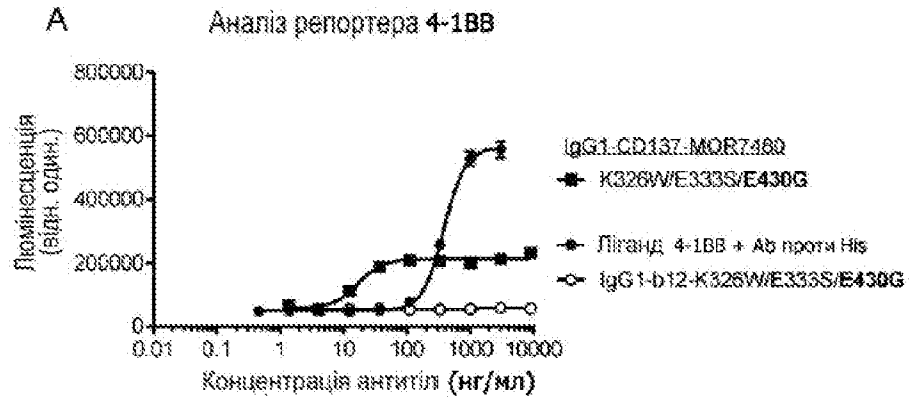


Fig. 33

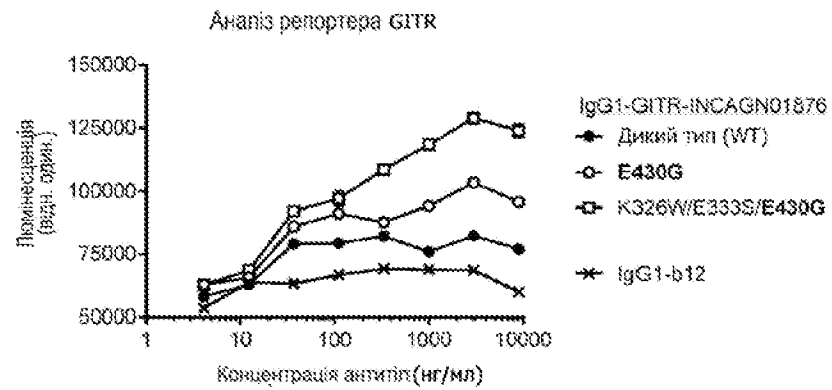
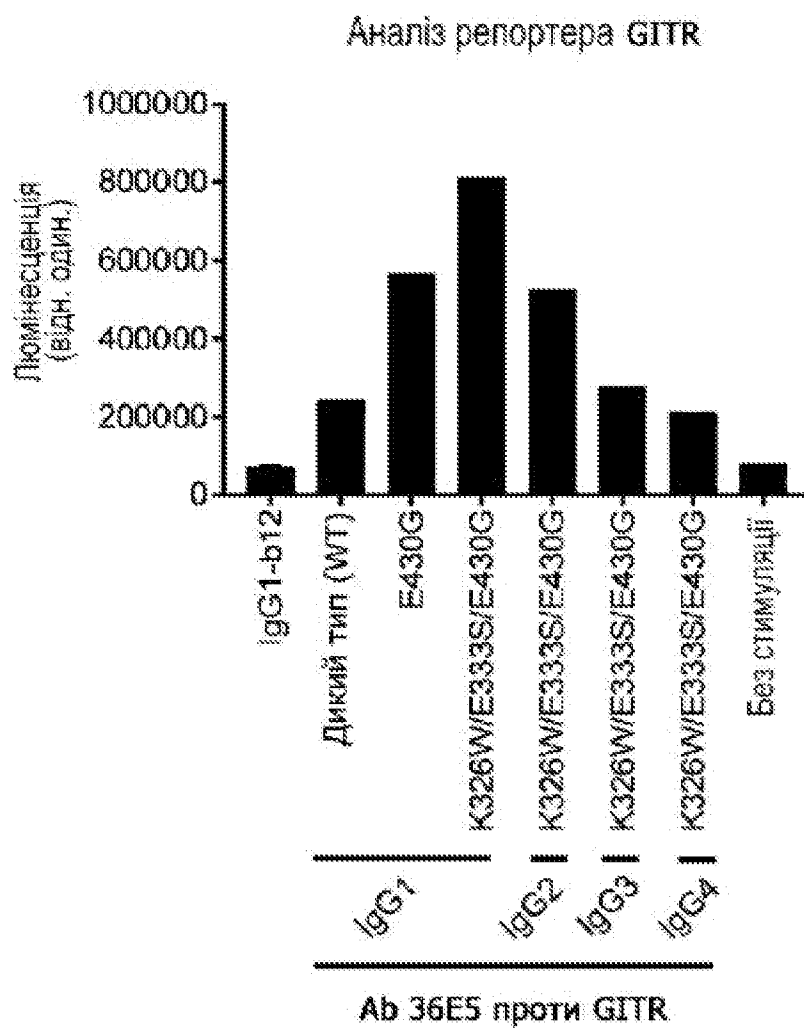


Fig. 34



Фіг. 35