



(51) МПК

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/468 (2006.01); C07K 16/32 (2006.01); C07K 2317/30 (2006.01); C07K 2317/524 (2006.01); C07K 2317/526 (2006.01); C07K 2317/64 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015152084, 30.05.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.05.2014Дата регистрации:
28.05.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
31.05.2013 US 61/829,973

(43) Дата публикации заявки: 06.07.2017 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 28.05.2018 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 31.12.2015(86) Заявка РСТ:
CA 2014/050507 (30.05.2014)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/190441 (04.12.2014)Адрес для переписки:
119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулингз Интернэшил Инк.", Строкова Ольга
Владимировна

(72) Автор(ы):

ЭСКОБАР-КАБРЕРА Эрик (CA)

(73) Патентообладатель(и):
ЗАЙМВОРКС ИНК. (CA)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2004/099249 A, 18.11.2004.
RU2325186 C2, 27.05.2008.C2
C9
C3
C4
C5
C6
C5
C2R U
2 6 5 5 4 3 9
C 2

**(54) ГЕТЕРОМУЛЬТИМЕРЫ С УМЕНЬШЕННОЙ ИЛИ ПОДАВЛЕННОЙ ЭФФЕКТОРНОЙ
ФУНКЦИЕЙ**

(57) Реферат:

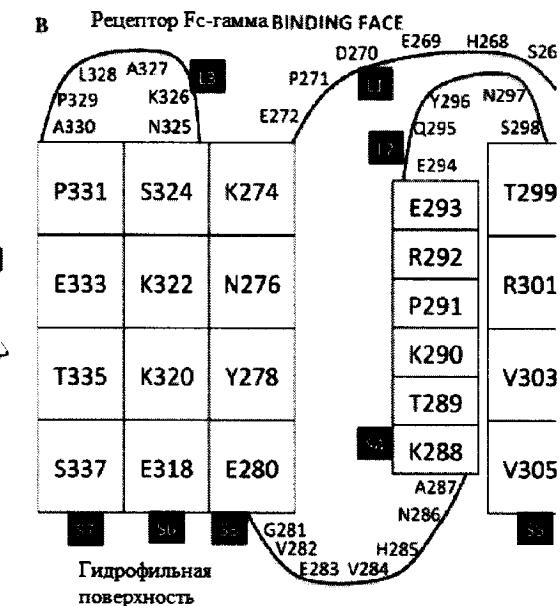
Изобретение относится к биотехнологии. Описаны конструкции гетеромультимера с уменьшенной или подавленной эффекторной функцией. Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложена конструкция гетеромультимера, содержащая конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем каждый полипептид Fc содержит модифицированную нижнюю шарнирную область, причем модифицированная

нижняя шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификацию аминокислоты в положении L234 и/или в положении L235, причем модификация аминокислоты увеличивает суммарный заряд модифицированной нижней шарнирной области первого полипептида Fc при условиях pH, близких к физиологическим, модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификацию аминокислоты, которая отличается от

R U
2 6 5 5 4 3 9 C 2

модификации аминокислоты первого полипептида Fc, и конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIa по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG, и причем нумерация аминокислот соответствует EU-индексу согласно Kabat. Также описан гетеромультимер с уменьшенной или подавленной эффекторной функцией, содержащий конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, отличающийся тем, что первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот E269Q/D270N, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E269K/D270R; или первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L235K/A327K, и второй полипептид Fc не содержит модификацию аминокислот в шарнирной области; причем нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу согласно Kabat, и причем конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIa по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG. Представлен полинуклеотид, кодирующий первый и второй полипептиды Fc указанных гетеромультимеров. Также представлена клетка-хозяин для получения гетеромультимера с уменьшенной или подавленной эффекторной

функцией, содержащая указанный полинуклеотид и соответствующий способ получения гетеромультимера. Представлено применение указанных гетеромультимеров в изготовлении фармацевтической композиции для лечения заболевания или растройства у пациента. Раскрыт способ уменьшения эффекторной функции конструкции Fc IgG, содержащей первый и второй полипептид Fc, включающий модификацию нижней шарнирной области первого и второго полипептида Fc, причем модифицированная нижняя шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификацию аминокислоты в положении L234 и/или в положении L235, причем модификация аминокислоты увеличивает суммарный заряд модифицированной нижней шарнирной области первого полипептида Fc при условиях pH, близких к физиологическим, модифицированная нижняя шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификацию аминокислоты, которая отличается от модификации аминокислоты первого полипептида Fc, и конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIa по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG, и причем нумерация аминокислот соответствует EU-индексу согласно Kabat. 7 н. и 30 з.п. ф-лы, 8 ил., 14 табл., 12 пр.



Фиг. 1А

R U
2 6 5 5 4 3 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 16/468 (2006.01); C07K 16/32 (2006.01); C07K 2317/30 (2006.01); C07K 2317/524 (2006.01); C07K 2317/526 (2006.01); C07K 2317/64 (2006.01)

(21)(22) Application: 2015152084, 30.05.2014

(24) Effective date for property rights:

30.05.2014

Registration date:
28.05.2018

Priority:

(30) Convention priority:

31.05.2013 US 61/829,973

(43) Application published: 06.07.2017 Bull. № 19

(45) Date of publication: 28.05.2018 Bull. № 16

(85) Commencement of national phase: 31.12.2015

(86) PCT application:
CA 2014/050507 (30.05.2014)

(87) PCT publication:
WO 2014/190441 (04.12.2014)

Mail address:
119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Goulingz Interneshl Ink.", Strokova Olga
Vladimirovna

(72) Inventor(s):

ESCOBAR-CABRERA Eric (CA)

(73) Proprietor(s):

ZYMEWORKS INC. (CA)

 R U
2 6 5 5 4 3 9
C 2
C 9
C 3
C 4
C 5
C 6
C 7
R U

 R U
2 6 5 5 4 3 9
C 2

(54) HETEROMULTIMERS WITH REDUCED OR SILENCED EFFECTOR FUNCTION

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: according to an embodiment, present invention provides a heteromultimer construct comprising an IgG Fc construct having a first and a second Fc polypeptide, each Fc polypeptide comprising a modified lower hinge region, wherein the modified lower hinge region of said first Fc polypeptide comprises an amino acid modification in position L234 and/or position L235, wherein the amino acid modification increases the total charge of the modified lower hinge region of the first Fc polypeptide under pH conditions close to physiological, the modified hinge

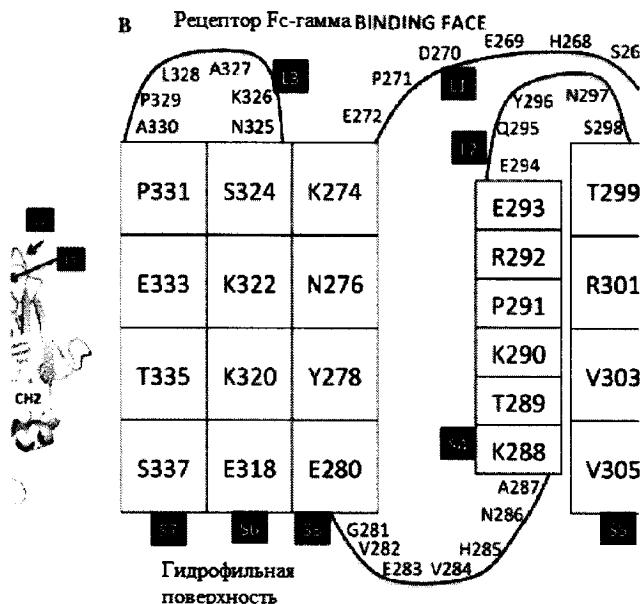
region of the second Fc polypeptide contains an amino acid modification that is different from the amino acid modification of the first Fc polypeptide, and the IgG Fc construct demonstrates reduced binding to receptors Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb and Fc γ RIIIa compared with the corresponding parent IgG Fc construct, and wherein the amino acid numbering corresponds to the EU index according to Kabat. Also described is a heteromultimer with a reduced or silenced effector function comprising an IgG Fc construct, which contains a first and a second Fc polypeptide, characterised in that the first Fc polypeptide comprises E269Q/D270N amino acid

R U 2 6 5 5 4 3 9 C 2

modifications, and the second Fc polypeptide comprises E269K/D270R amino acid modifications; or the first Fc polypeptide comprises L235K/A327K amino acid modifications, and the second Fc polypeptide does not contain an amino acid modification in the hinge region; wherein the numbering of the amino acid residues corresponds to the EU index according to Kabat, and wherein the IgG Fc construct exhibits reduced binding to receptors Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb and Fc γ RIIHa compared to the corresponding parent IgG Fc construct. Disclosed is a polynucleotide encoding the first and second Fc polypeptides of said heteromultimers. Also disclosed is a host cell for producing a heteromultimer with a reduced or silenced effector function, comprising said polynucleotide and a corresponding method for producing a heteromultimer. Disclosed is use of said heteromultimers in the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of a disease or disorder in a patient. Disclosed is a method for reducing the effector function of an IgG Fc construct comprising a first and a second Fc polypeptide, comprising a modification of the lower hinge region of the first and second Fc polypeptide, wherein the modified lower hinge region of said first Fc polypeptide comprises an amino acid modification in position L234 and/or position L235, wherein the amino acid modification increases the total charge of the modified lower hinge region of the first Fc polypeptide under pH conditions close to physiological, the modified lower hinge region of the second Fc polypeptide comprises an amino acid modification that is different from the amino acid modification of the first Fc polypeptide, and the IgG Fc construct demonstrates reduced binding to receptors Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb and Fc γ RIIIa compared with the corresponding parent IgG Fc construct, and wherein the amino acid numbering corresponds to the EU index according to Kabat.

EFFECT: heteromultimer constructs with reduced or silenced effector function are described.

37 cl, 8 dwg, 14 tbl, 12 ex



Фиг. 1А

R U 2 6 5 5 4 3 9 C 2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[001] Данная заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США №61/829973, поданной 31 мая 2013 г, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством отсылки во всех отношениях.

5 ВВЕДЕНИЕ

2.1. Область техники

[002] Настоящее изобретение относится к области разработки терапевтического антитела и, более конкретно, к полипептидам, содержащим гетеродимерную Fc-область, которая была модифицирована для подавления эффекторных функций, опосредованных 10 Fc-областью.

2.2 Уровень техники

[003] Терапевтические антитела были разработаны для лечения множества заболеваний. В некоторых из таких случаев эффективность терапевтического антитела является следствием, по меньшей мере отчасти, способности Fc-области антитела 15 опосредовать одну или более эффекторных функций. Данные эффекторные функции являются следствием взаимодействия антител и комплексов антитело-антитела иммунной системы для стимуляции множества ответов, в том числе антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (complement dependent cytotoxicity, CDC) (обзор приведен в публикациях Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997); Ward and Ghetie, Therapeutic Immunol. 2:77-94 (1995); и Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)). Некоторые эффекторные функции антитела опосредованы Fc-рецепторами (FcR), которые связываются с Fc-областью антитела. FcR 20 классифицируют по их специфичности к изотипам иммуноглобулинов; Fc-рецепторы для антител IgG называют Fc γ R, для антител IgE-Fc ϵ R, для антител IgA-Fc α R и т.д. Fc-область антител также опосредует функции, такие как связывание с FcRn, которые 25 осуществляются независимо от связывания с антигеном и которые придают антителам устойчивость в кровотоке и способность проникать через клеточные барьеры в результате трансцитоза (Ward and Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77-94 (1995)).

30 [004] Однако в случае определенных заболеваний эффекторные функции, опосредованные Fc-областью антитела, могут вызывать нежелательные побочные эффекты. Вследствие этого были предприняты попытки сконструировать антитела с уменьшенными или подавленными эффекторными функциями.

[005] В недавних публикациях были описаны стратегии, которые использовали для 35 конструирования антител с уменьшенной или подавленной эффекторной активностью (см. Strohl, WR (2009), Curr Opin Biotech 20:685-691 и Strohl, WR and Strohl LM, "Antibody Fc engineering for optimal antibody performance" In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge: Woodhead Publishing (2012), pp 225-249). Данные стратегии включают уменьшение эффекторной функции посредством модификации гликозилирования, 40 применения каркасов IgG2/IgG4 или введения мутаций в шарнирную область или CH2-область Fc-области антитела.

[006] Кроме того, в публикации патента США №2011/0212087 (Strohl) описаны антитела и другие молекулы, содержащие Fc, с вариациями в Fc-области, которые уменьшают связывание с Fc γ R (рецепторами Fc-гамма) и наблюдаемую в результате 45 активность и которые можно применять для лечения различных заболеваний и нарушений.

[007] В международной публикации патента № WO 2006/105338 (Xencor) описаны варианты Fc с оптимизированными свойствами, способы получения данных вариантов,

Fc-полипептиды, содержащие варианты Fc с оптимизированными свойствами, и способы применения вариантов Fc с оптимизированными свойствами.

[008] В публикации патента США №2012/0225058 (Xencor) описан вариант Fc родительской конструкции Fc IgG, причем указанный вариант Fc демонстрирует измененное связывание с одним или более FcγR, причем указанный вариант Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную вставку в Fc-области указанной родительской конструкции Fc IgG.

[009] В публикации патента США №2012/0251531 (Genentech) описаны сконструированные полипептиды, содержащие варианты Fc, а также варианты применения указанных полипептидов, и, более конкретно, варианты Fc, демонстрирующие уменьшенную эффекторную функцию. Данные варианты также описаны как приносящие пользу пациенту, страдающему от заболевания, которое можно лечить антителом и при котором желательно уменьшить эффекторную функцию, вызванную антителами.

[0010] Strop с соавт. ((2012) J. Mol. Biol. 420: 204-219) описывают введение заряженных мутаций в коровую шарнирную область и CH3-область IgG1 и IgG2 человека для улучшения образования биспецифичного антитела.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] В настоящем изобретении предложены гетеромультимеры, содержащие

конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем каждый полипептид Fc содержит модифицированную нижнюю шарнирную область, причем: модифицированная нижняя шарнирная область указанного первого полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, модифицированная нижняя шарнирная область указанного второго полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая отличается от по меньшей мере одной модификации аминокислоты указанного первого полипептида Fc, и конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fcγ и с белком C1q по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG.

[0012] Определенные варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором по меньшей мере одна модификация аминокислоты в модифицированной нижней шарнирной области первого полипептида Fc увеличивает суммарный положительный заряд модифицированной нижней шарнирной области, и по меньшей мере одна модификация аминокислоты во втором полипептиде Fc увеличивает общее количество отрицательных зарядов или заряжена нейтрально относительно шарнирной области дикого типа; или по меньшей мере одна модификация аминокислоты в модифицированной нижней шарнирной области первого полипептида Fc увеличивает суммарный отрицательный заряд модифицированной нижней шарнирной области, и по меньшей мере одна модификация аминокислоты во втором полипептиде Fc увеличивает общее количество положительных зарядов.

[0013] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная нижняя шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит две или более модификаций аминокислот.

[0014] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, содержащий конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем каждый полипептид Fc содержит модифицированную шарнирную область, причем: модифицированная шарнирная область указанного первого полипептида Fc содержит

по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая увеличивает суммарный заряд модифицированной шарнирной области первого полипептида Fc при условиях pH, близких к физиологическим, модифицированная шарнирная область указанного второго полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты,

5 которая отличается от по меньшей мере одной модификации аминокислоты указанного первого полипептида Fc, и конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fcγ и с белком C1q по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG.

[0015] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой

10 гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором увеличение суммарного заряда представляет собой увеличение суммарного положительного заряда первого полипептида Fc. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанное увеличение суммарного положительного заряда представляет собой увеличение общего числа положительно заряженных аминокислот в первом полипептиде

15 Fc или уменьшение общего числа отрицательно заряженных аминокислот в первом полипептиде Fc. Определенные варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором по меньшей мере одна модификация аминокислоты в модифицированной шарнирной области указанного первого полипептида Fc увеличивает общее число положительно

20 заряженных аминокислот в указанном первом полипептиде Fc, и по меньшей мере одна модификация аминокислоты в модифицированной шарнирной области указанного второго полипептида Fc увеличивает общее количество отрицательных зарядов в указанном втором полипептиде Fc или заряжена нейтрально.

[0016] Согласно варианту реализации настоящего изобретения увеличение суммарного

25 заряда представляет собой увеличение суммарного отрицательного заряда первого полипептида Fc. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения увеличение суммарного отрицательного заряда представляет собой увеличение общего числа отрицательно заряженных аминокислот или уменьшение общего числа положительно заряженных аминокислот в первом полипептиде Fc. Согласно

30 определенным вариантам реализации настоящего изобретения, когда суммарный отрицательный заряд представляет собой увеличение общего числа отрицательно заряженных аминокислот, по меньшей мере одна модификация аминокислоты во втором полипептиде Fc увеличивает общее количество положительных зарядов.

[0017] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении

35 предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором по меньшей мере одна модификация аминокислоты в модифицированной шарнирной области первого полипептида Fc в сочетании с по меньшей мере одной модификацией аминокислоты во втором полипептиде Fc увеличивает общий положительный заряд конструкции Fc IgG по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG, не содержащей модификаций шарнирной области.

[0018] Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении

предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит две или более модификаций аминокислот.

45 [0019] Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область указанного первого и второго полипептидов Fc содержит две или более модификаций аминокислот.

[0020] Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором по меньшей мере одна модификация аминокислоты в модифицированной шарнирной области первого и второго полипептидов Fc находится в нижней шарнирной области.

5 [0021] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG обладает K_D в отношении Fc γ R IIaH , составляющей более 10 мкМ, K_D в отношении Fc γ R IIaR , составляющей более 10 мкМ, K_D в отношении Fc γ R IIb , составляющей более 10 мкМ, K_D в отношении Fc γ R IIIaF , составляющей более 6 мкМ, K_D в отношении Fc γ R IIIaV , составляющей более 6 мкМ, и K_D в отношении Fc γ R Ia , составляющей более 6,5 нМ.

10 [0022] Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG опосредует уменьшенную эффекторную функцию по сравнению с соответствующей конструкцией Fc IgG, не содержащей модификаций аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция Fc IgG опосредует менее 70%, менее 50%, менее 30% или менее 10% эффекторной функции, что измеряют посредством определения EC₅₀. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция Fc IgG опосредует менее 10%, менее 5%, менее 2% или менее 1% эффекторной функции, что измеряют посредством определения максимального лизиса клеток. Согласно варианту реализации настоящего изобретения эффекторная функция выбрана из ADCC, ADCP (antibody-dependent cell phagocytosis, антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз), CDC или любой комбинации указанных функций.

15 [0023] Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот в положениях L234 и/или L235. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 20 модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот, которые выбраны из L234K, L234R, L234A, L235K, L235R и L235A. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения один из указанных первого или второго полипептидов Fc также содержит модификацию аминокислоты в положении E233. 25 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанная модификация в положении E233 выбрана из E233A, E233K и E233R.

[0024] Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область обоих указанных первого и второго 30 полипептидов Fc содержит модификации аминокислот в положении L234 и/или L235. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модификации в положениях L234 и/или L235 выбраны из L234A, L234K, L234R, L234D, L234E, L235K, L235R, L235E, L235A и L235D. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область первого и/или второго полипептида 35 Fc также содержит модификацию аминокислоты в положении E233. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или обе модификации аминокислот представляют собой независимо E233A или E233D.

[0025] Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении

предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот L234K/L235K, E233A/L234R/L235R, E233K/L234R/L235R или E233K/L234A/L235K.

- 5 [0026] Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область первого или второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234A/L235A, L234D/L235E, E233A/L234D/L235E или E233A/L234K/L235A.
- 10 [0027] Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором: модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234K/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234A/L235A; модифицированная 15 шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234K/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E; модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233A/L234R/L235R, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит 20 модификации аминокислот E233A/L234D/L235E; модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E; или модифицированная шарнирная область первого 25 полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234A/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233A/L234K/L235A.

- [0028] Согласно определенным вариантам реализации в настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором: первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E, и второй полипептид 30 Fc содержит модификации аминокислот L234R/L235R/E233K; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/D265S, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/D265S; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K; первый полипептид 35 Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/K322A, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/K322A; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/P329W, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/P329W; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K/D265S/K322A, и второй 40 полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A; или первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K.

- [0029] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, содержащий 45 конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем: указанный первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот E269Q/D270N, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E269K/D270R; или указанный первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L235K/A327K,

и второй полипептид Fc не содержит модификации в шарнирной или нижней шарнирной области; и причем конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fcγ и с белком C1q по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG.

5 [0030] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG является агликозилированной. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG является дегликозилированной.

10 [0031] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором начало плавления конструкции Fc IgG на термограмме больше или равно 68°C.

[0032] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG 15 содержит CH2-область с температурой плавления, большей или равной температуре плавления соответствующей родительской CH2-области, не содержащей модификаций шарнирной области.

[0033] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG 20 содержит CH2-область с температурой плавления, которая приблизительно на 1-2°C выше температуры плавления родительской CH2-области.

[0034] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG содержит CH2-область с температурой плавления, которая приблизительно на 2-3°C 25 выше температуры плавления родительской CH2-области.

[0035] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG содержит вариант CH3-области, содержащий модификации аминокислот, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc-области вместо гомодимерной Fc- 30 области, когда экспрессируется указанный гетеромультимер. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот CH3 T366L/N390R/K392M/T394W, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот CH3 L351Y/S400E/F405A/Y407V. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первый 35 и/или второй полипептиды Fc содержат модификацию аминокислоты T350V. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимеры, содержащие гетеродимерную Fc-область, отделяют от продуктов экспрессии, содержащих гомодимерную Fc-область, с применением способов очистки на основе заряда.

40 [0036] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, причем указанный гетеромультимер также содержит по меньшей мере одну антиген-связывающую конструкцию, слитую с конструкцией Fc IgG.

[0037] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором по меньшей мере одна антиген-связывающая конструкция выбрана из Fab-фрагмента, scFv, sdAb, антиген-связывающего пептида, белка, слитого с Fc, или белка или его фрагмента, способного к связыванию с антигеном. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения

представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, содержащий одну антиген-связывающую конструкцию. Вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, содержащий две антиген-связывающие конструкции.

5 [0038] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG присоединена к одной или нескольким молекулам токсичного лекарственного препарата.

[0039] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG

10 присоединена к одному или нескольким гетерологичным полипептидам. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более гетерологичных полипептидов выбраны из ферментов и токсинов.

15 [0040] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором IgG представляет собой IgG1.

[0041] В настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая первый или второй полипептид Fc гетеромультимера, описанного в настоящей заявке. В настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, описанную в настоящей заявке. В настоящем изобретении предложен способ получения

20 гетеромультимера, описанного в настоящей заявке, причем указанный способ включает следующие этапы: (а) культивирование клетки-хозяина, описанной в настоящей заявке; и (б) выделение гетеромультимера из культуры клетки-хозяина. Определенный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой способ получения гетеромультимера, также включающий этап выделения гетеромультимера с применением

25 способов очистки на основе заряда. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой способ получения гетеромультимера, описанного в настоящей заявке, причем указанный способ очистки на основе заряда представляет собой ионообменную хроматографию.

30 [0042] В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания, включающий предоставление пациенту, который нуждается в таком лечении, эффективного количества фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой 35 применение гетеромультимера, описанного в настоящей заявке, для приготовления лекарственного препарата для лечения заболевания.

[0043] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой применение гетеромультимера, описанного в настоящей заявке, для лечения заболевания у пациента, который нуждается в таком лечении.

40 [0044] В настоящем изобретении предложен способ уменьшения эффекторной функции конструкции антитела, включающий: модификацию нижней шарнирной области первого и второго полипептида Fc, причем: модифицированная нижняя шарнирная область указанного первого полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, модифицированная нижняя шарнирная область указанного второго

45 полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая отличается от по меньшей мере одной модификации аминокислоты указанного первого полипептида Fc, и конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fc γ или с белком C1q по сравнению с соответствующей родительской

конструкцией Fc IgG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модификации приводят к незначительному связыванию с Fc-рецепторами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0045] Данные и другие свойства настоящего изобретения станут более очевидным

5 после следующего подробного описания, в котором содержатся ссылки на прилагаемые чертежи.

[0046] На фигуре 1 представлены участки Fc-области, вовлеченные в связывание с Fc γ R. (A) Кристаллическая структура 3b/Fc (PDB.1E4K), демонстрирующая петли и 10 нижний шарнирный CH2-домен Fc (показан серым цветом), которые вовлечены в связывание с Fc γ R (показан черным цветом). (B) Топология домена CH2. Слои обозначены как S1, S2, S3, S4, S5, S6 и S7; петли обозначены как L1, L2 и L3.

[0047] На фигуре 2 представлены термограммы иллюстративных асимметричных конструкций антитела по сравнению с антителом дикого типа (ДТ). На фигуре 2A 15 представлены термограммы для ДТ и AAC2-AAC6. На фигуре 2B представлена идентичность двух переходов ДТ. Первый переход соответствует развертыванию CH2-домена, второй переход соответствует развертыванию CH3+Fab. На фигуре 2C представлено наложение результатов анализа множества образцов, демонстрирующее, как переход вариантов CH2 смещается к большему значению Tm, что свидетельствует о большей стабильности.

20 [0048] На фигуре 3А представлены иллюстративные результаты, демонстрирующие разделение методом ионообменной хроматографии компонентов, полученных в процессе очистки иллюстративных асимметричных конструкций антитела. На фигуре 3В представлено разделение компонентов с применением градиента pH (верхняя часть) или градиента соли (нижняя часть) с использованием иллюстративного асимметричного 25 варианта AAC4.

[0049] На фигуре 4 представлена способность контрольного варианта (v1051) и иллюстративного гетеромультимера согласно настоящему изобретению (AAC6) опосредовать ADCC.

[0050] На фигуре 5 представлены аминокислотная последовательность Fc-области 30 IgG1 человека (SEQ ID NO: 1); аминокислотная последовательность тяжелой цепи трастузумаба (SEQ ID NO: 2), аминокислотная последовательность легкой цепи трастузумаба (SEQ ID NO: 3), аминокислотная последовательность тяжелой цепи ритуксимаба (SEQ ID NO: 4), аминокислотная последовательность легкой цепи ритуксимаба (SEQ ID NO: 5).

35 [0051] На фигуре 6 представлена способность вариантов AAC9-AAC12, AAC14 и AAC15 опосредовать ADCC на клетках Дауди. На фигуре 6А представлены результаты, полученные для AAC10 и AAC11, по сравнению с контролями, включающими коммерчески доступный ритуксимаб; на фигуре 6В представлены результаты, полученные для AAC12 и AAC14, по сравнению с контролями, включающими 40 коммерчески доступный ритуксимаб; на фигуре 6С представлены результаты, полученные для AAC9 и AAC15, по сравнению с контролями, включающими коммерчески доступный ритуксимаб.

[0052] На фигуре 7 представлена способность вариантов AAC9-AAC12, AAC14 и AAC15 опосредовать CDC на клетках Дауди.

45 [0053] На фигуре 8 представлены последовательности SEQ ID NO: 6-69, поданные в настоящем изобретении.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0054] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, содержащий

конструкцию Fc IgG. Конструкция Fc IgG содержит два полипептида Fc, каждый из которых содержит модифицированную шарнирную область, причем указанная модифицированная шарнирная область содержит асимметричные модификации аминокислот, которые уменьшают или устраняют связывание конструкции Fc IgG с 5 рецепторами Fc γ RIaH, Fc γ RIaR, Fc γ RIb Fc γ RIaF, Fc γ RIaV и Fc γ RIa и с белком фактора комплемента C1q. Такое уменьшение или устранение данного связывания приводит к уменьшению или подавлению эффекторных функций, как правило, опосредованных Fc-областью IgG дикого типа. Как отмечается, модифицированная шарнирная область содержит асимметричные модификации аминокислот, и вследствие этого модификации 10 аминокислот в шарнирной области одной полипептидной конструкции Fc IgG отличаются от модификаций в шарнирной области другого полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенные конструкции антитела являются стабильными и способными к связыванию с FcRn.

[0055] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения

15 модифицированная шарнирная область каждой полипептидной конструкции Fc IgG содержит одну или более модификаций аминокислот, выбранных для увеличения положительного заряда одной полипептидной конструкции Fc IgG по сравнению с другой полипептидной конструкцией Fc IgG. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область каждой 20 полипептидной конструкции Fc IgG содержит одну или более модификаций аминокислот, выбранных для увеличения отрицательного заряда одной полипептидной конструкции Fc IgG по сравнению с другой полипептидной конструкцией Fc IgG.

[0056] Гетеромультимер согласно настоящему изобретению может быть пригодным для разработки терапевтических антител, если эффекторные функции являются

25 нежелательными вследствие возникающих в результате побочных эффектов, например, цитотоксичности. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гетеромультимеры также демонстрируют свойства, облегчающие очистку указанных гетеромультимеров с применением способов на основе заряда.

[0057] В настоящем изобретении предложены конструкции гетеромультимера с

30 уменьшенной или подавленной эффекторной функцией. Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложена конструкция гетеромультимера, содержащая конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем каждый полипептид Fc содержит модифицированную нижнюю шарнирную область, причем:

35 модифицированная нижняя шарнирная область указанного первого полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, модифицированная нижняя шарнирная область указанного второго полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая отличается от по меньшей мере одной модификации аминокислоты указанного первого полипептида Fc, и конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fc γ и с белком C1q

40 по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера демонстрирует незначительное связывание с рецепторами Fc γ по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG, которая не содержит модификации, описанные в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам

45 реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fc γ и незначительное связывание с по меньшей мере одним рецептором Fc γ . Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера, описанная в настоящей заявке,

демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fc γ и незначительное связывание с белком C1q. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит дополнительную модификацию по меньшей мере одной аминокислоты, которая

- 5 находится в области, отличной от нижней шарнирной области. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из указанных первого или второго полипептидов Fc дополнительно содержит модификацию по меньшей мере одной аминокислоты, которая находится в шарнирной области. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из
- 10 указанных первого или второго полипептидов Fc также содержит модификации по меньшей мере одной аминокислоты, которая находится в CH2- или CH3-области.

[0058] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, содержащий конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем каждый полипептид Fc содержит модифицированную шарнирную область, причем:

- 15 модифицированная шарнирная область указанного первого полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая увеличивает суммарный заряд модифицированной шарнирной области первого полипептида Fc при условиях pH, близких к физиологическим, модифицированная шарнирная область указанного второго полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты,
- 20 которая отличается от по меньшей мере одной модификации аминокислоты указанного первого полипептида Fc, и конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fc γ и с белком C1q по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения увеличение суммарного заряда представляет собой увеличение суммарного
- 25 положительного заряда первого полипептида Fc. Согласно варианту реализации настоящего изобретения увеличение суммарного положительного заряда представляет собой увеличение общего числа положительно заряженных аминокислот в первом полипептиде Fc. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения указанное увеличение суммарного заряда представляет собой увеличение суммарного
- 30 отрицательного заряда первого полипептида Fc. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения увеличение суммарного отрицательного заряда представляет собой увеличение общего числа отрицательно заряженных аминокислот в первом полипептиде Fc. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера демонстрирует незначительное связывание
- 35 с рецепторами Fc γ по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG, которая не содержит модификации, описанные в настоящей заявке. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fc γ и незначительное связывание с по меньшей мере одним рецептором Fc γ . Согласно
- 40 варианту реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера, описанная в настоящей заявке, демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fc γ и незначительное связывание с белком C1q. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из указанных первого или второго полипептидов Fc также содержит модификации по меньшей мере одной аминокислоты,
- 45 которая находится в нижней шарнирной области. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из указанных первого или второго полипептидов Fc также содержит модификации по меньшей мере одной аминокислоты, которая находится в CH2- или CH3-области.

[0059] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, предложенный в настоящей заявке, причем одна или более модификаций аминокислот в модифицированной шарнирной области второго полипептида Fc модифицирует число отрицательных или положительных зарядов в шарнирной области или заряжена нейтрально относительно шарнирной области дикого типа. Определенный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит две или более модификаций аминокислот. Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область указанного второго полипептида Fc содержит две или более модификаций аминокислот. Определенные варианты реализации настоящего изобретения представляют собой конструкцию гетеромультимера, описанную в настоящей заявке, в которой одна или более модификаций аминокислот в модифицированной шарнирной области первого и второго полипептидов Fc находятся в нижней шарнирной области (аминокислоты 16-23 SEQ ID NO: 1, см. фигуру 5).

[0060] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG обладает K_D в отношении Fc γ R Π aH, составляющей по меньшей мере приблизительно 10 мкМ, K_D в отношении Fc γ R Π aR, составляющей по меньшей мере приблизительно 10 мкМ, K_D в отношении Fc γ R Π b, составляющей по меньшей мере приблизительно 10 мкМ, K_D в отношении Fc γ R Π aF, составляющей по меньшей мере приблизительно 6 мкМ, K_D в отношении Fc γ R Π aV, составляющей по меньшей мере приблизительно 6 мкМ, и K_D в отношении Fc γ R Π a, составляющей по меньшей мере приблизительно 6,5 нМ. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG обладает K_D в отношении Fc γ R Π aH, составляющей более 10 мкМ, K_D в отношении Fc γ R Π aR, составляющей более 10 мкМ, K_D в отношении Fc γ R Π aF, составляющей более 6 мкМ, K_D в отношении Fc γ R Π aV, составляющей более 6 мкМ, и K_D в отношении Fc γ R Π a, составляющей более 6,5 нМ.

[0061] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации по меньшей мере одной аминокислоты из L234 и L235. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот, которые выбраны из L234K, L234R, L234A, L235K, L235R и L235A. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, причем указанный один из первого и второго полипептидов Fc содержит модификацию аминокислоты в положении E233. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, предложенный в настоящей заявке, причем указанные модификации в положении E233 выбраны из E233A, E233K и E233R. Некоторые варианты реализации

настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот в по меньшей мере одном положении из L234 и L235. Один вариант реализации

- 5 настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, причем указанные модификации в по меньшей мере одном положении из L234 и L235 выбраны из L234A, L234K, L234R, L234D, L234E, L235K, L235R, L235E, L235A и L235D. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная
- 10 шарнирная область второго полипептида Fc также содержит модификацию аминокислоты в положении E233. Согласно варианту реализации настоящего изобретения первый или второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот, которые выбраны из E233A или E233D. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере один из указанных первого или второго
- 15 полипептидов Fc также содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая выбрана из D265S, E269K, K322A, P329W и E333K. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный первый и второй полипептид Fc также содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая выбрана из D265S, E269K, K322A, P329W и E333K.

- 20 [0062] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот L234A/L235K, E233A/L234R/L235R, E233K/L234R/L235R или E233K/L234A/L235K. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой
- 25 гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область первого или второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234A/L235A, L234D/L235E, E233A/L234D/L235E или E233A/L234K/L235A.

- [0063] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc
- 30 содержит модификации аминокислот L234K/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234A/L235K; модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234K/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E; модифицированная
- 35 шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233A/L234R/L235R, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233A/L234D/L235E; модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R, и модифицированная шарнирная область второго полипептида
- 40 Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E; или модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234A/ L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233A/L234K/L235A.

- [0064] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, предложенный в настоящей заявке, причем по меньшей мере один из указанных первого или второго полипептидов Fc также содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая выбрана из D265S, E269K, K322A, P329W и E333K. Например, вариант реализации настоящего изобретения представляет собой

гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234R/L235R/E233K. Другой вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в 5 котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/D265S, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234R/L235R/D265S. Следующий вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K, и второй полипептид Fc 10 содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K. Другой вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/K322A, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/K322A. Еще один вариант реализации настоящего 15 изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/P329W, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/P329W. Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый 20 полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K/D265S/K322A, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A. Следующие варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K/D265S/ 25 K322E/E333K, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K.

[0065] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором: первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234R/L235R/E233K; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/D265S, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234R/L235R/D265S; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/K322A, и 30 второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/K322A; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/P329W, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/P329W; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K/D265S/K322A, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A; или первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K.

[0066] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, содержащий конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем: 45 указанный первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот E269Q/D270N, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E269K/D270R; или указанный первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L235K/A327K, и второй полипептид Fc не содержит модификации в шарнирной или нижней шарнирной

области; и причем конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fcγ и с белком C1q по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG.

[0067] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой

5 гетеромультимер, предложенный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG является агликозилированной. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG является дегликозилированной.

[0068] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой

10 гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором начало плавления конструкции Fc IgG на термограмме больше или равно 68°C. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG содержит CH2-область с температурой плавления, сравнимой с температурой плавления родительской CH2-

15 области. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG содержит CH2-область с температурой плавления, превышающей или приблизительно равной температуре плавления родительской CH2-области. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный

20 в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG содержит CH2-область с температурой плавления, которая приблизительно на 1-2°C выше температуры плавления родительской CH2-области. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG содержит CH2-область с температурой плавления, которая

25 приблизительно на 2-3°C выше температуры плавления родительской CH2-области. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG содержит CH2-область с температурой плавления, которая приблизительно на 5°C выше температуры плавления родительской CH2-области.

30 [0069] В настоящем изобретении предложена конструкция гетеромультимера, в которой конструкция Fc IgG содержит вариант CH3-области, содержащий модификации аминокислот, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc-области.

[0070] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой конструкцию гетеромультимера, описанную в настоящей заявке, в которой один из 35 указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот CH3 T366L/N390R/K392M/T394W, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот CH3 L351Y/S400E/F405A/Y407V.

[0071] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой конструкцию гетеромультимера, описанную в настоящей заявке, в которой конструкция Fc IgG содержит модификации аминокислот, увеличивающие стабильность CH3-области. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первый и второй полипептиды Fc содержат модификацию аминокислот T350V. Согласно определенным 40 вариантам реализации настоящего изобретения любые конструкции антитела с гомодимерными конструкциями Fc четко отделяют от указанного гетеромультимера с применением способов очистки на основе заряда.

[0072] В настоящем изобретении предложены гетеромультимеры, описанные в настоящей заявке, причем указанный гетеромультимер также содержит по меньшей мере одну антиген-связывающую конструкцию, слитую с конструкцией Fc IgG. Согласно

определенным вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна антиген-связывающая конструкция выбрана из Fab-фрагмента, scFv, sdAb, антиген-связывающего пептида, белка, слитого с Fc, или белка или его фрагмента, способного к связыванию с антигеном. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения

5 представляют собой гетеромультимер, содержащий одну антиген-связывающую конструкцию. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, содержащий две антиген-связывающие конструкции. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, в котором конструкция Fc IgG присоединена к одной или нескольким молекулам

10 токсичного лекарственного препарата. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения конструкция Fc IgG присоединена к одному или нескольким гетерологичным полипептидам. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более гетерологичных полипептидов выбраны из ферментов и токсинов.

15 [0073] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором IgG представляет собой IgG1.

[0074] В настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая первый или второй полипептид Fc гетеромультимера, описанного в настоящей заявке. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой клетку-

20 хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту, описанную в настоящей заявке.

Определенные варианты реализации настоящего изобретения представляют собой способ получения гетеромультимера, описанного в настоящей заявке, причем указанный способ включает следующие этапы: (а) культивирование клетки-хозяина, описанной в настоящей заявке; и (б) выделение гетеромультимера из культуры клетки-хозяина.

25 [0075] В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель. Определенные варианты реализации настоящего изобретения представляют собой способ лечения заболевания, включающий предоставление пациенту, который нуждается в таком лечении, эффективного количества

30 фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой применение гетеромультимера, описанного в настоящей заявке, для приготовления лекарственного препарата для лечения заболевания. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой применение терапевтического количества гетеромультимера,

35 описанного в настоящей заявке, для лечения заболевания у пациента, который нуждается в таком лечении.

[0076] В настоящем изобретении предложен способ уменьшения ADCC конструкции антитела, включающий: модификацию нижней шарнирной области первого и второго полипептида Fc, причем модифицированная нижняя шарнирная область указанного

40 первого полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, модифицированная нижняя шарнирная область указанного второго полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая отличается от по меньшей мере одной модификации аминокислоты указанного первого полипептида Fc, и конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами

45 Fc γ или с белком C1q по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG. Определенные варианты реализации настоящего изобретения представляют собой способ уменьшения ADCC, причем указанные модификации приводят к незначительному связыванию с Fc-рецепторами.

Определения

[0077] Если не указано обратное, все технические и научные термины в настоящей заявке имеют те же значения, которые общепринято понимаются специалистом в области техники, к которой относится предмет настоящего изобретения. В случае если в

- 5 настоящей заявке присутствует множественность определений терминов, определяющими являются определения, приведенные в данном разделе. Если приводится ссылка на адрес URL или другой подобный идентификатор или адрес, то подразумевается, что такие идентификаторы могут быть изменены, и конкретная информация в интернете, представляющая интерес, может появляться и исчезать, но
- 10 аналогичную информацию можно найти посредством поиска в интернете. Ссылка на данную информацию свидетельствует о наличии и широком распространении такой информации.

[0078] Следует понимать, что предшествующее общее описание и последующее подробное описание приведены исключительно с целью примера и пояснения и не

- 15 ограничивают любой заявляемый предмет изобретения. В настоящей заявке использование единственного числа включает множественное число, если конкретно не указано обратное.

[0079] Термин «родительский СН2-домен» относится к полипептиду СН2-домена Fc-области, содержащему аминокислотную последовательность, в которой отсутствует

- 20 одна или более модификаций аминокислот в шарнирной области первого и второго полипептидов Fc, раскрытых в настоящей заявке, но которая может содержать одну или более модификаций дисульфидов шарнира, добавленных СН2-дисульфидов, модификаций гликозилирования или различных стабильностей СН3-домена, и которая отличается эффекторной функцией от СН2-домена гетеромультимеров согласно
- 25 настоящему изобретению. Родительский СН2-домен может содержать нативную последовательность Fc-области или Fc-область с предсуществующими модификациями аминокислотной последовательности (такими как добавления, делеции и/или замены).

[0080] Термин «агликазилированные антитела» относится к антителам или гетеромультимерам, которые не гликозилируются в ходе экспрессии.

- 30 Агликазилированные антитела можно получить в результате экспрессии в системах, в которых отсутствует путь гликозилирования млекопитающих, таких как *E. coli*, или в результате введения мутации в один или более сайтов гликозилирования, такой как N297.

[0081] Термин «дегликозилированные антитела» относится к антителам или гетеромультимерам, которые изначально были гликозилированы в ходе экспрессии, но впоследствии подверглись биохимической реакции, такой как, например, обработка ферментом PNGase F (пептид-N-гликозидаза F), в результате чего гликан был удален.

- 35 [0082] Термин «аминокислота с нейтральной боковой цепью» относится к аминокислоте, содержащей боковую цепь, в которой отсутствует заряд при нейтральном значении pH. Все аминокислоты, за исключением лизина, аргинина, аспартата, глутамата и гистидина, считаются нейтральными. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в зависимости от структурного окружения, в котором находятся
- 40 данные аминокислоты, лизин, аргинин, аспартат, глутамат и гистидин также считаются нейтральными. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин «аминокислота с нейтральной боковой цепью» относится к аминокислоте, содержащей боковую цепь, в которой отсутствует общий заряд при физиологических значениях pH.

[0083] Термин «аминокислота с положительно заряженной боковой цепью» относится к полярной аминокислоте, содержащей боковую цепь, которая является

протонированной и вследствие этого положительно заряженной при нейтральных значениях рН. Данные аминокислоты часто называют основными. Примеры аминокислот с положительно заряженной боковой цепью включают лизин, аргинин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в зависимости от структурного окружения, в котором находится данная аминокислота, гистидин также может являться протонированным, и его боковая цепь может быть положительно заряженной. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин «аминокислота с положительно заряженной боковой цепью» относится к аминокислоте, содержащей боковую цепь, которая является положительно заряженной при физиологических значениях рН.

[0084] «Аминокислота с отрицательно заряженной боковой цепью» представляет собой полярную аминокислоту, боковая цепь которой депротонирована и вследствие этого отрицательно заряжена при нейтральных значениях рН. Данные аминокислоты часто называют кислыми. Примеры аминокислот с отрицательно заряженными боковыми цепями включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин «аминокислота с отрицательно заряженной боковой цепью» относится к аминокислоте, содержащей боковую цепь, которая отрицательно заряжена при физиологических значениях рН.

[0085] Термин «аффинность связывания», как правило, относится к силе итоговой суммы нековалентных взаимодействий между единичным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и партнером связывания (например, антигеном или Fc γ R). Аффинность молекулы X в отношении партнера Y можно, как правило, выразить в виде константы диссоциации (K_d или K_D). Аффинность можно измерять с помощью общепринятых способов, известных в данной области техники, в том числе способов, описанных в настоящей заявке. Низкоаффинные антитела связываются с антигеном (или Fc γ R) слабо и имеют тенденцию легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела связываются с антигеном (или Fc γ R) более сильно и дольше остаются связанными.

[0086] Термин «Fc-область» (или кристаллизующийся фрагмент) используют для обозначения C-концевой области антитела. Fc-область состоит из двух идентичных фрагментов белка, полученных из второго и третьего константных доменов двух тяжелых цепей антитела: Цепи А и Цепи В. Второй и третий константные домены известны как CH2-домен и CH3-домен, соответственно. CH2-домен содержит последовательность CH2-домена Цепи А и последовательность CH2-домена Цепи В. CH3-домен содержит последовательность CH3-домена Цепи А и последовательность CH3-домена Цепи В. В настоящей заявке Fc-область включает шарнирную область, как определено ниже.

[0087] Термин «последовательность Fc-области» используют для обозначения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина. «Последовательность Fc-области» может представлять собой последовательность нативной Fc-области или вариант последовательности Fc-области. Хотя границы последовательности Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, последовательность Fc-области тяжелой цепи IgG человека обычно определена фрагментом от аминокислотного остатка в положении Cys226 или Pro230 до карбоксильного конца IgG.

[0088] «Последовательность CH2-домена» последовательности Fc-области IgG человека (также называемая последовательностью домена «Cy2») обычно соответствует участку от приблизительно аминокислоты 231 до приблизительно аминокислоты 340. Последовательность домена CH2 уникальна тем, что данная последовательность не

половину спаривается с последовательностью другого домена. Напротив, между последовательностями двух CH2-доменов интактной нативной молекулы IgG вклиниваются две N-связанные разветвленные углеводные цепи. Было высказано предположение, что углевод может предоставить заместитель для спаривания домен-домен и способствует стабилизации домена CH2. Burton, Molec. Immunol. 22: 161-206 (1985).

[0089] «Последовательность CH3-домена» содержит фрагмент остатков, которые являются С-концевыми по отношению к последовательности CH2-домена в последовательности Fc-области (т.е. от приблизительно аминокислотного остатка 341 до приблизительно аминокислотного остатка 447 IgG).

[0090] «Функциональная Fc-область» обладает «эффекторными функциями» нативной Fc-области. Примеры «эффекторных функций» включают связывание с C1q; комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание с Fc-рецептором; антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую 15 регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т.д. Такие эффекторные функции, как правило, требуют, чтобы Fc-область находилась в сочетании со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела). Данные эффекторные функции можно оценить с применением различных вариантов анализа, например, раскрытых в настоящей заявке.

[0091] «Последовательность нативной Fc-области» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, обнаруженной в природе. Нативная последовательность Fc-областей человека включает нативную последовательность Fc-области IgG1 человека (аллотипы не A и A); нативную последовательность Fc-области IgG2 человека; нативную последовательность Fc-области 25 IgG3 человека; и нативную последовательность Fc-области IgG4 человека, а также существующие в природе варианты указанных последовательностей.

[0092] «Последовательность варианта Fc-области» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности нативной Fc-области «одной или несколькими модификациями аминокислот», как определено в настоящей 30 заявке. Последовательность варианта Fc-области содержит по меньшей мере одну замену аминокислоты по сравнению с нативной последовательностью Fc-области или с последовательностью Fc-области родительского полипептида, например, от приблизительно одной до приблизительно десяти замен аминокислот, и предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти замен аминокислот в нативной 35 последовательности Fc-области или в последовательности Fc-области родительского полипептида. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения последовательность варианта Fc-области в настоящей заявке идентична по меньшей мере приблизительно на 80% последовательности нативной Fc-области и/или последовательности Fc-области родительского полипептида, и наиболее 40 предпочтительно идентична по меньшей мере приблизительно на 90% указанной последовательности, более предпочтительно идентична по меньшей мере приблизительно на 95% указанной последовательности.

[0093] Термины «Fc-рецептор» или «FcR» используются для описания рецептора, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительный FcR представляет 45 собой нативный FcR человека. Более того, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения FcR представляет собой рецептор, который связывается с антителом IgG (гамма рецептор, Fc γ R) и включает рецепторы подклассов Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) и Fc γ RIII (CD16), в том числе аллельные варианты и формы

данных рецепторов, которые подверглись альтернативному сплайсингу. Рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA («активирующий рецептор») и Fc γ RIIB («ингибирующий рецептор»), которые содержат аналогичные аминокислотные последовательности, отличающиеся преимущественно цитоплазматическими доменами. Активирующий

5 рецептор Fc γ RIIA содержит в цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM). Ингибирующий рецептор Fc γ RIIB содержит в цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM), (см. обзор M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)).

10 Обзор FcR приведен в публикациях Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); и de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Другие FcR, в том числе те из них, которые будут обнаружены в будущем, охватываются в настоящей заявке термином «FcR». Термин «FcR» также включает неонатальный рецептор, FcRn, отвечающий за перенос материнских IgG в плод (Guyer 15 et al., J. Immunol. 1 17:587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)). Термин «Fc γ R» не включает FcRn.

20 [0094] Термины «антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» и «ADCC» относятся к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифичные цитотоксические клетки, экспрессирующие FcR (например, клетки естественные киллеры (Natural Killer, NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связавшееся антитело на клетке-мишени и после этого вызывают лизис клетки-мишени. Среди первичных клеток, опосредующих ADCC, клетки NK экспрессируют Fc γ RIII и низкие уровни Fc γ RIIC, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Данные об экспрессии FcR на гематopoэтических клетках обобщены в таблице 3 на странице 464 публикации Ravetch 25 and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991).

[0095] «Эффекторные клетки человека» представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или более FcR и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно, такие клетки экспрессируют по меньшей мере Fc γ RIII и осуществляют эффекторную функцию ADCC. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют 30 ADCC, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), клетки естественные киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; причем МКПК и клетки NK являются предпочтительными. Эффекторные клетки можно выделить из нативного источника таких клеток, например, из крови или МКПК, как описано в настоящей заявке.

35 [0096] Гетеромультимер со «значительно уменьшенной», «подавленной», «незначительной» или «устраненной» аффинностью связывания с Fc γ R и аффинностью связывания с C1q представляет собой гетеромультимер, обладающий уменьшенной активностью связывания с Fc γ R и активностью связывания с C1q по сравнению с родительским полипептидом или с полипептидом, содержащим последовательность 40 нативной Fc-области. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гетеромультимер со «значительно уменьшенной», «подавленной», «незначительной» или «устраненной» аффинностью связывания с Fc γ R и аффинностью связывания с C1q представляет собой также гетеромультимер со «значительно уменьшенной», «подавленной», «незначительной» или «устраненной» активностью 45 ADCC, ADCP и CDC по сравнению с родительским полипептидом или с полипептидом, содержащим последовательность нативной Fc-области. Гетеромультимер, который «демонстрирует уменьшенное или необнаруживаемое связывание» с Fc γ R, связывается со всеми Fc γ R с меньшей аффинностью, чем родительский полипептид. Такие варианты,

демонстрирующие уменьшенное связывание с Fc γ R, могут обладать небольшим или не поддающимся оценке связыванием с Fc γ R. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вариант демонстрирует 0-20% связывания с Fc γ R по сравнению с нативной Fc-областью IgG, например, что определено в примерах в настоящей заявке 5 или что измеряют посредством изменения константы равновесия. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вариант демонстрирует 0-10% связывания с Fc γ R по сравнению с нативной Fc-областью IgG. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вариант демонстрирует 0-5% связывания с Fc γ R по сравнению с нативной Fc-областью IgG. Согласно одному варианту реализации настоящего 10 изобретения вариант демонстрирует 0-1% связывания с Fc γ R по сравнению с нативной Fc-областью IgG.

[0097] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер со «значительно уменьшенным», «подавленным», «незначительным» или «устраненным» связыванием с Fc γ R IIaH обладает K_D в отношении Fc γ R IIaH , превышающей 5 мкМ, что измеряют методом ППР (поверхностного плазмонного резонанса). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер со «значительно уменьшенным», «подавленным», «незначительным» или «устраненным» связыванием с Fc γ R IIaR обладает K_D в отношении Fc γ R IIaR , превышающей 10 мкМ, что измеряют методом ППР (поверхностного плазмонного 15 резонанса). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер со «значительно уменьшенным», «подавленным», «незначительным» или «устраненным» связыванием с Fc γ R IIb обладает K_D в отношении Fc γ R IIb , превышающей 30 мкМ, что измеряют методом ППР (поверхностного плазмонного резонанса). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения 20 гетеромультимер со «значительно уменьшенным», «подавленным», «незначительным» или «устраненным» связыванием с Fc γ R IIIaF обладает K_D в отношении Fc γ R IIIaF , превышающей 20 мкМ, что измеряют методом ППР (поверхностного плазмонного резонанса). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер со «значительно уменьшенным», «подавленным», «незначительным» 25 или «устраненным» связыванием с Fc γ R IIIaV обладает K_D в отношении Fc γ R IIIaV , превышающей 6 мкМ, что измеряют методом ППР (поверхностного плазмонного резонанса). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер со «значительно уменьшенным», «подавленным», «незначительным» 30 или «устраненным» связыванием с Fc γ R Ia обладает K_D в отношении Fc γ R Ia , превышающей 6,5 нМ, что измеряют методом ППР (поверхностного плазмонного резонанса).

[0098] Гетеромультимер, который «опосредует антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) в присутствии эффекторных клеток человека более эффективно», чем родительское антитело, представляет собой гетеромультимер, 40 который по существу более эффективно опосредует ADCC *in vitro* или *in vivo*, когда количества гетеромультимера и родительского антитела, применяемые в анализе, по существу одинаковы. Как правило, такие полипептиды можно обнаружить с применением анализа ADCC *in vitro*, раскрытоого в настоящей заявке, однако можно 45 также применять другие анализы или способы определения активности ADCC, например, модель на животных и т.д. Предпочтительный полипептид от приблизительно в 1,5 раза до приблизительно в 100 раз, например, от приблизительно в два раза до приблизительно в пятьдесят раз более эффективно опосредует ADCC, чем родительский

полипептид, например, в анализе *in vitro*, раскрытом в настоящей заявке.

[0099] Термины «родительское антитело», «родительский полипептид» или «полипептид, содержащий нативную Fc-область», относятся к конструкции, которая не содержит модификаций аминокислот в шарнирной области. Согласно одному

5 варианту реализации настоящего изобретения родительское антитело представляет собой антитело, которое не содержит модификаций аминокислот в шарнирной области и содержит модификации CH3-домена, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc-области.

[00100] Термин «модификация аминокислоты» относится к изменению

10 последовательности аминокислот в определенной аминокислотной последовательности. Примеры модификаций включают замену, вставку и/или делецию аминокислот. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения модификации аминокислот в настоящей заявке представляют собой замену. «Модификация аминокислоты в» указанном положении, например, Fc-области, относится к замене или 15 делеции указанного остатка или к вставке по меньшей мере одного аминокислотного остатка, смежного с указанным остатком. Под вставкой, «смежной» с указанным остатком, подразумевают вставку в пределах от одного до двух остатков от указанного остатка. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения вставка является N-концевой или C-концевой относительно указанного остатка.

20 [00101] Термин «замена аминокислоты» относится к замещению по меньшей мере одного существующего аминокислотного остатка в определенной аминокислотной последовательности другим отличным «заменяющим» аминокислотным остатком. Заменяющие остаток или остатки могут представлять собой «существующие в природе аминокислотные остатки» (т.е. кодируемые генетическим кодом), которые выбраны

25 из группы, включающей: аланин (Ala); аргинин (Arg); аспарагин (Asn); аспарагиновую кислоту (Asp); цистеин (Cys); глутамин (Gln); глутаминовую кислоту (Glu); глицин (Gly); гистидин (His); изолейцин (Ile); лейцин (Leu); лизин (Lys); метионин (Met); фенилаланин (Phe); пролин (Pro); серин (Ser); треонин (Thr); триптофан (Trp); тирозин (Tyr); и валин (Val). Предпочтительно, заменяющий остаток представляет собой остаток, отличный

30 от цистеина. Замена одним или несколькими несуществующими в природе аминокислотными остатками в настоящей заявке также включена в определение «замена аминокислоты». Термин «несуществующий в природе аминокислотный остаток» относится к остатку, отличному от существующих в природе аминокислотных остатков, перечисленных выше, способному ковалентно связываться с прилежащим

35 аминокислотным остатком (остатками) в полипептидной цепи. Примеры несуществующих в природе аминокислотных остатков включают норлейцин, орнитин, норвалин, гомосерин и другие аналоги аминокислотных остатков, такие как описанные в публикации Ellman et al. Meth. Enzym. 202:301-336 (1991). Для получения таких несуществующих в природе аминокислотных остатков можно применять процедуры,

40 описанные в публикациях Noren et al. Science 244: 182 (1989) и Ellman et al., ссылка выше. Вкратце, данные процедуры включают активацию химическим способом супрессорной тРНК несуществующих в природе аминокислотных остатков с последующей транскрипцией и трансляцией РНК *in vitro*.

[00102] Термин «вставка аминокислоты» относится к встраиванию по меньшей мере 45 одной аминокислоты в определенную аминокислотную последовательность. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения вставка состоит из вставки одного или двух аминокислотных остатков. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения вставка представляют собой «пептидные вставки»

большего размера, например, вставку от приблизительно трех до приблизительно пяти или даже более приблизительно десяти аминокислотных остатков. Согласно данным вариантам реализации настоящего изобретения встроенный остаток (остатки) являются существующими в природе или несуществующими в природе, как описано выше.

5 [00103] Термин «делеция аминокислоты» относится к удалению по меньшей мере одного аминокислотного остатка из определенной аминокислотной последовательности.

[00104] «Шарнирная область», как правило, определяется последовательностью от Glu216 до Pro238 IgG1 человека, в которой остатки от Cys226 до Pro230 образуют «коровую» шарнирную область (Burton, Molec. Immunol. 22: 161-206 (1985)), тогда как

10 остатки от Ala231 до Pro238 образуют «нижнюю» шарнирную область. Остатки от Glu216 до Thr225 образуют «верхнюю» шарнирную область. Шарнирные области других изотипов IgG можно выровнять с последовательностью IgG1 путем размещения первого и последнего остатков цистеина, образующих S-S связи между тяжелыми цепями, в одинаковые положения.

15 [00105] «C1q» представляет собой мультимер полипептидов, который содержит сайт связывания с Fc-областью иммуноглобулина. C1q вместе с двумя сериновыми протеазами, C1r и C1s, образует комплекс C1, первый компонент пути комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). C1q человека можно заказать коммерческим способом, например, в Quidel, San Diego, Calif.

20 [00106] Термин «связывающий домен» относится к области полипептида, которая связывается с другой молекулой. В случае FcR связывающий домен может содержать часть полипептидной цепи FcR (например, α -цепи FcR), отвечающей за связывание с Fc-областью. Один пригодный связывающий домен представляет собой внеклеточный домен цепи FcRa.

25 [00107] Термин «антитело» используется в наиболее широком смысле и конкретно включает моноклональные антитела (в том числе полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антитела при условии, что указанные фрагменты демонстрируют желаемую биологическую активность.

30 [00108] «Фрагменты антитела», как определено в настоящей заявке, содержат часть интактного антитела, как правило, включая по меньшей мере одну антиген-связывающую или вариабельную область интактного антитела или Fc-область антитела. Примеры фрагментов антитела включают линейные антитела; одноцепочечные молекулы антитела; и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов

35 антитела. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения фрагменты антитела сохраняют по меньшей мере часть шарнирной области и необязательно CH1-область тяжелой цепи IgG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагменты антитела сохраняют полную константную область тяжелой цепи IgG и содержат легкую цепь IgG.

40 [00109] Термин «моноклональное антитело» в настоящей заявке относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, входящие в популяцию, идентичны, за исключением возможных существующих в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах.

45 Моноклональные антитела являются высоко специфичными, направленными против единственного сайта антигена. Более того, в отличие от общепринятых (поликлональных) препаратов антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты на антигене.

Определение «моноклональное» указывает на свойство антитела, как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и данное определение не следует рассматривать как указание на то, что антитело должно быть получено каким-либо конкретным способом. Согласно определенным вариантам реализации настоящего

- изобретения моноклональные антитела, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, получены способом гибридомы, впервые описанным в публикации Kohler et al., Nature 256:495 (1975), или могут быть получены способами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США №4,816,567). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения «моноклональные антитела» выделены из фаговых библиотек антител с применением методик, описанных, например, в публикациях Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991).

- [00110] Моноклональные антитела в настоящей заявке конкретно включают «химерные» антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, полученных от конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как оставшаяся цепь (цепи) идентичны или гомологичны соответствующим последовательностям антител, полученных от другого вида или принадлежащим к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител при условии, что указанные фрагменты демонстрируют желаемую биологическую активность (патент США №4,816,567; и публикация Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

- [00111] «Нарушение» представляет собой любое состояние, при котором лечение вариантом полипептида является благоприятным. Нарушение включает хронические и острые нарушения или заболевания, в том числе патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающего к нарушениям, о которых идет речь. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения нарушение представляет собой рак.

- [00112] Термин «метка» в настоящей заявке относится к обнаруживаемому соединению или композиции, конъюгированной напрямую или опосредованно с полипептидом. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения метка является обнаруживаемой сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки). Согласно некоторым другим вариантам реализации настоящего изобретения метка катализирует химическое изменение соединения-субстрата или композиции-субстрата, которое является обнаруживаемым. Иллюстративный вариант реализации настоящего изобретения включает ферментативную метку, катализирующую химическое изменение соединения-субстрата или композиции-субстрата, которое является обнаруживаемым.

- [00113] «Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, обнаруженную и отделенную от по меньшей мере одной посторонней молекулы нуклеиновой кислоты, с которой указанная молекула обычно связана в природном источнике нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы, находящейся в форме или окружении, в которых ее обнаруживают в природе. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты вследствие этого отличаются от молекулы нуклеиновой кислоты, как она существует в природных клетках. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает молекулы нуклеиновой кислоты, содержащиеся в клетках, которые, как правило, экспрессируют полипептид и где, например, расположение молекулы нуклеиновой кислоты на хромосоме отличается от расположения в природных клетках.

[00114] Термин «контрольные последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Контрольные последовательности, подходящие для прокариот, включают, например, промотор, необязательно последовательность оператора и сайт связывания рибосомы. Известно, что в эукариотических клетках используются промоторы, сигналы полигаденилирования и энхансеры.

[00115] Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», если она находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты.

10 Например, ДНК предпоследовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде белка-предшественника, участвующего в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы облегчать трансляцию. Как правило, термин «функционально связанный» означает, что связанные последовательности ДНК являются непрерывными, а в случае секреторной лидерной последовательности - непрерывными и находящимися в рамке считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть непрерывными.

15 20 Связывание осуществляется посредством лигирования в соответствующих сайтах рестрикции. Если такие сайты отсутствуют, используют синтетические адаптеры олигонуклеотидов или линкеры в соответствии с общепринятой практикой.

[00116] В настоящей заявке выражения «клетка», «линия клеток» и «культура клеток» используются взаимозаменяющими, и все указанные определения включают потомство.

25 Таким образом, термины «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичную из рассматриваемых клеток, а также культуры, полученные от нее, вне зависимости от количества пассажей. Также следует понимать, что все потомство не может являться в точности идентичным по содержанию ДНК вследствие преднамеренных или случайных мутаций. В данные термины включается мутантное

30 потомство, которое обладает той же функцией или биологической активностью, скрининг которых осуществляли в исходной трансформированной клетке. В случаях, где предполагаются различные обозначения, это будет очевидно из контекста.

[00117] Фраза «низкоаффинный рецептор» означает рецептор, который обладает слабой аффинностью связывания с лигандом, представляющим интерес, например, обладает константой диссоциации, составляющей приблизительно 50 нМ, или худшей аффинностью. Примеры низкоаффинных рецепторов включают Fc γ RII и Fc γ RIII.

[00118] Под «Fc-слиянием» в настоящей заявке подразумеваются белок, в котором один или более полипептидов функционально связаны с Fc-областью или ее производным. Fc-слияние в настоящей заявке является синонимом терминов «иммunoадгезин», «Ig-слияние», «Ig химера» и «рецепторный глобулин» (иногда «рецептор-глобулин»), как используется в данной области техники (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). Fc-слияние объединяет область Fc иммуноглобулина с партнером по слиянию, который, как правило, может представлять собой любой белок или малую молекулу. Роль части Fc-слияния, отличной от Fc, т.е. партнера по слиянию, состоит в опосредовании связывания с мишенью; вследствие этого партнер по слиянию представляет собой функциональный аналог вариабельной области антитела. Практически любой белок или малая молекула могут быть связаны с Fc для получения Fc-слияния. Партнеры

по слиянию, являющиеся белками, могут включать, но не ограничиваются ими, область рецептора, связывающую мишень, молекулу адгезии, лиганд, фермент, цитокин, хемокин или какой-либо другой белок или домен белка. Низкомолекулярные партнеры по слиянию могут включать любое терапевтическое средство, направляющее Fc-слияние к терапевтической мишени. Такие мишени могут представлять собой любую молекулу, предпочтительно внеклеточный receptor, вовлеченный в заболевание. Два семейства receptorов поверхности, которые являются мишениями множества одобренных низкомолекулярных лекарственных препаратов, представляют собой receptorы, объединенные с G-белком (GPCR), и ионные каналы, в том числе .+, Na+, Ca+ каналы.

Около 70% всех лекарственных препаратов, в настоящее время представленных на рынке по всему миру, нацелены на GPCR. Таким образом, Fc-белки, описанные в настоящей заявке, могут быть слиты с малой молекулой, нацеленной на, например, один или более receptorов GABA, пуринергических receptorов, адренергических receptorов, гистаминергических receptorов, опиоидных receptorов, хемокиновых receptorов, глутаматных receptorов, никотиновых receptorов, 5HT (серотониновых) receptorов и эстрогеновых receptorов. Партнер по слиянию может представлять собой низкомолекулярный миметик белка, нацеленного на терапевтически пригодную мишень. Конкретные примеры лекарственных препаратов, которые могут выступать в виде партнеров Fc-слияния, можно найти в публикации L.S. Goodman et al., Eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw-Hill, New York, ed. 9, 1996). Партнеры по слиянию включают не только малые молекулы и белки, которые связываются с известными мишениями существующих лекарственных препаратов, но также орфанные receptorы, которые еще не применяют в качестве мишеней лекарственных препаратов. Соперничество между геномным и протеомным проектами стало движущей силой разработки новых лекарственных препаратов, и данные проекты позволили обнаружить орфанные receptorы. Существует огромный потенциал исследования данных новых молекул в качестве мишеней лекарственных препаратов и разработки белков и терапевтических средств на основе малых молекул, направленных на данные мишени. Такие белки и терапевтические средства на основе малых молекул рассматриваются в качестве партнеров Fc-слияния, в котором применяется конструкция Fc IgG, описанная в настоящей заявке. Множество линкеров, определенных и описанных ниже, можно применять для ковалентного связывания Fc с партнером по слиянию для получения Fc-слияния.

[00119] Под «антигеном-мишенью» в настоящей заявке подразумеваются молекулы, с которой специфически связывается вариабельная область данного антитела. Антиген-мишень может представлять собой белок, углевод, липид или другое химическое соединение.

[00120] Под «клеткой-мишенью» в настоящей заявке подразумеваются клетку, которая экспрессирует антиген-мишень.

[00121] Повсюду в настоящей спецификации и формуле изобретения нумерация остатков в тяжелой цепи иммуноглобулина приведена согласно EU-индексу, как в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (19 1), непосредственно включенной в настоящую заявку посредством ссылки. Термин «EU-индекс согласно Kabat» относится к нумерации остатков антитела IgG1 человека согласно EU.

1. Гетеромультимеры, содержащие конструкцию Fc IgG

[00122] В настоящем изобретении предложены конструкции гетеромультимера с уменьшенной или подавленной эффекторной функцией. Согласно варианту реализации

в настоящем изобретении предложена конструкция гетеромультимера, содержащая конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем каждый полипептид Fc содержит модифицированную шарнирную область, причем:

5 модифицированная шарнирная область указанного первого полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, модифицированная шарнирная область указанного второго полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая отличается от по меньшей мере одной модификации аминокислоты указанного первого полипептида Fc, и конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fc γ и с белком C1q

10 по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG.

[00123] В настоящем изобретении предложены конструкции гетеромультимера с уменьшенной или подавленной эффекторной функцией. Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложена конструкция гетеромультимера, содержащая конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем каждый

15 полипептид Fc содержит модифицированную нижнюю шарнирную область, причем: модифицированная нижняя шарнирная область указанного первого полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, модифицированная нижняя шарнирная область указанного второго полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая отличается от по меньшей мере одной

20 модификации аминокислоты указанного первого полипептида Fc, и конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fc γ и с белком C1q по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения конструкция

гетеромультимера демонстрирует незначительное связывание с рецепторами Fc γ по

25 сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG, которая не содержит модификации, описанные в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fc γ и незначительное связывание с по

30 меньшей мере одним рецептором Fc γ . Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера, описанная в настоящей заявке, демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fc γ и незначительное связывание с белком C1q.

[00124] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, содержащий конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем каждый

35 полипептид Fc содержит модифицированную шарнирную область, причем: модифицированная шарнирная область указанного первого полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, увеличивающую суммарный заряд модифицированной шарнирной области первого полипептида Fc при условиях pH, близких к физиологическим, модифицированная шарнирная область указанного второго

40 полипептида Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая отличается от по меньшей мере одной модификации аминокислоты указанного первого полипептида Fc, и конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fc γ и с белком C1q по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

45 изобретения увеличение суммарного заряда представляет собой увеличение суммарного положительного заряда первого полипептида Fc. Согласно варианту реализации настоящего изобретения увеличение суммарного положительного заряда представляет собой увеличение общего числа положительно заряженных аминокислот в первом

полипептиде Fc. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения указанное увеличение суммарного заряда представляет собой увеличение суммарного отрицательного заряда первого полипептида Fc. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения увеличение суммарного отрицательного заряда

- 5 представляет собой увеличение общего числа отрицательно заряженных аминокислот в первом полипептиде Fc. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера демонстрирует незначительное связывание с рецепторами Fc γ по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG, которая не содержит модификации, описанные в настоящей заявке. Согласно
- 10 конкретным вариантам реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера демонстрирует уменьшенное связывание со всеми рецепторами Fc γ и незначительное связывание с по меньшей мере одним рецептором Fc γ . Согласно варианту реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера, описанная в настоящей заявке, демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fc γ и
- 15 незначительное связывание с белком C1q.

[00125] В настоящем изобретении предложены гетеромультимеры, содержащие конструкцию Fc IgG, причем указанная конструкция Fc IgG содержит первый и второй полипептид Fc, причем каждый полипептид Fc содержит модифицированную шарнирную область, причем модифицированная шарнирная область указанного первого

- 20 полипептида Fc содержит одну или более модификаций аминокислот, которые увеличивают количество положительных зарядов в модифицированной шарнирной области первого полипептида Fc, причем модифицированная шарнирная область указанного второго полипептида Fc содержит одну или более модификаций аминокислот, отличающихся от одной или нескольких модификаций аминокислот указанного первого
- 25 полипептида Fc, и причем конструкция Fc IgG не связывается с рецепторами Fc γ или с белком C1q.

1.1 Fc-область и шарнирная область

[00126] Гетеромультимеры содержат конструкцию Fc IgG (Fc-область), которая содержит шарнирную область. Fc-область антитела, как правило, содержит две

- 30 полипептидные цепи, каждая из которых содержит C-концевой фрагмент полипептида тяжелой цепи IgG. Соответственно, конструкция Fc IgG содержит два полипептида Fc, каждый из которых получен из полипептида тяжелой цепи IgG и включает области, опосредующие связывание с Fc γ R, комплементом и FcRn, а также шарнирную область.

[00127] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения

- 35 гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, полученную из полипептида тяжелой цепи IgG человека. В данной области техники известны несколько подтипов полипептидов тяжелой цепи IgG человека, которые включают IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Известно, что среди данных подтипов IgG человека IgG1, IgG2 и IgG3 активируют комплемент, а IgG1 и IgG3 опосредуют эффекторную функцию ADCC (антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность) более эффективно, чем IgG2 и IgG4. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, полученную из полипептида тяжелой цепи IgG1 человека. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи IgG1 человека известна в данной области техники (см., например учетный номер IMGT J00228). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, полученную из полипептида тяжелой цепи IgG3 человека. Последовательность тяжелой цепи IgG3 человека известна в данной области техники (см., например, учетный номер IMGT X03604). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения
- 40
- 45

гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, полученную из полипептида тяжелой цепи IgG4 человека. Последовательность тяжелой цепи IgG4 человека известна в данной области техники (см., например, учетный номер IMGT K01316). Аминокислотная последовательность Fc-области IgG1 человека, включая шарнирную область, показана на фигуре 5 (SEQ ID NO: 1).

[00128] Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер может содержать Fc область IgG, полученную из аллотипа IgG. Аллотипы IgG известны в данной области техники (см., например, Jefferies et al. (2009) Mabs 1(4): 332-338).

[00129] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения Fc-область IgG получают из гуманизированного моноклонального антитела, обладающего терапевтическим потенциалом, которое выбрано из: алемтузумаба, аполизумаба, аселизумаба, атилизумаба, бапинеузумаба, бевацизумаба, биватузумаба, кантузумаба, цеделизумаба, цертолизумаба пегола, цидфузитузумаба, цидтузумаба, даклизумаба,

екулизумаба, эфализумаба, эпратузумаба, эрлизумаба, фелвизумаба, фонтолизумаба, гемтузумаба озогамицина, инотузумаба озогамицина, ипилимумаба, лабетузумаба, лингузумаба, матузумаба, меполизумаба, мотовизумаба, натализумаба, нимотузумаба, ноловизумаба, нумавизумаба, окрелизумаба, омализумаба, паливизумаба, пасколизумаба, пекфузитузумаба, пектузумаба, пертузумаба, пекселизумаба,

раливизумаба, ранибизумаба, ресливизумаба, реслизумаба, ресивизумаба, ровелизумаба, руплизумаба, сибротузумаба, сиплизумаба, сонтузумаба, такатузумаба тетраксетана, тадокизумаба, тализумаба, тефибазумаба, токилизумаба, торализумаба, трастузумаба, тукотузумаба цемолейкина, тукуситузумаба, умавизумаба, уртоксазумаба и визилизумаба.

[00130] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения Fc-область IgG получают из терапевтического антитела, такого как, например, ритуксимаб.

[00131] Каждый полипептид Fc конструкции Fc IgG содержит по меньшей мере часть Fc-области полипептида тяжелой цепи IgG, включая шарнирную область. Fc-область полипептидов IgG включает сайты связывания множества рецепторов, которые опосредуют эффекторные функции Fc-области. Примеры таких рецепторов включают Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa. Fc-область также содержит область, которая связывается с белком фактора комплемента C1q.

[00132] Fc-область тяжелой цепи полипептида IgG1 человека содержит аминокислоты 216-447 тяжелой цепи IgG1 (см. SEQ ID NO: 2, фигура 5). Длина и последовательность шарнирной области IgG человека варьирует в зависимости от изотипа IgG, как показано в таблице 1 ниже.

[00133] Таблица 1: Сравнение аминокислотных последовательностей шарнирной области IgG человека

IgG	Длина	CH1	«Верхняя» шарнирная область	«Коровая» шарнирная область	«Нижняя» шарнирная область (CH2)
IgG1	15	VDKRV	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGGP
IgG2	12	VDKTV	ELK CCVE	CPPCP	APPVAGP
IgG3	62	VDKRV	ELKTPLGDTTH T	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) x3	APELLGGP
IgG4	12	VDKRV	ESKYGPP	CPSCP	APELLGGP

[00134] Шарнирная область полипептида IgG1 содержит аминокислотные остатки с 216 по 238, тогда как нижняя шарнирная область полипептида IgG1 человека содержит аминокислотные остатки с 231 по 238.

[00135] Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения каждый полипептид Fc конструкции Fc IgG содержит аминокислоты с 216 по 447 тяжелой цепи IgG1 человека, причем указанный первый полипептид Fc содержит по меньшей мере одну модификацию в шарнирной области, содержащей аминокислотные остатки с 216 по 238, и указанный второй полипептид Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в шарнирной области, отличающуюся от по меньшей мере одной модификации аминокислоты в первом полипептиде Fc. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения каждый полипептид Fc конструкции Fc IgG содержит аминокислоты с 231 по 447 тяжелой цепи IgG1 человека, причем указанный первый полипептид Fc содержит по меньшей мере одну модификацию в нижней шарнирной области, содержащей аминокислотные остатки с 231 по 238, и указанный второй полипептид Fc содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в нижней шарнирной области, отличающуюся от по меньшей мере одной модификации аминокислоты в первом полипептиде Fc.

1.1.2 Модификации аминокислот в модифицированной шарнирной области

[00136] Первый и второй полипептиды Fc конструкций Fc IgG содержат модифицированную шарнирную область, которая асимметрично модифицирована для получения гетеромультимеров со значительно уменьшенной или устраниенной 35 эффекторной функцией. Термины «первый» и «второй» в отношении полипептида Fc, которые можно применять взаимозаменяя, предусматривают, что каждая конструкция Fc IgG содержит один первый полипептид Fc и один второй полипептид Fc. Модификации аминокислот вводят в шарнирную область первого и второго полипептидов Fc асимметричным способом, как более подробно описано ниже.

[00137] Гетеромультимеры содержат первый и второй полипептид Fc, содержащие модификации аминокислот коровой области, описанные в следующих разделах.

[00138] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго 45 полипептидов Fc содержит модификации по меньшей мере одной аминокислоты из L234 и L235. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго

полипептидов Fc содержит модификации аминокислот, которые выбраны из L234K, L234R, L234A, L235K, L235R и L235A. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, причем указанный один из первого и второго полипептидов Fc также содержит модификацию

- 5 аминокислоты в положении E233. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, предложенный в настоящей заявке, причем указанные модификации в положении E233 выбраны из E233A, E233K и E233R. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная
- 10 шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот в по меньшей мере одном из положений L234 и L235. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, причем указанные модификации по меньшей мере одного остатка из L234 и L235 выбраны из L234A, L234K, L234R,
- 15 L234D, L234E, L235K, L235R, L235E, L235A и L235D. Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc также содержит модификацию аминокислоты в положении E233. Согласно варианту реализации настоящего изобретения первый или второй полипептид Fc содержит
- 20 модификации аминокислот, которые выбраны из E233A или E233D.

[00139] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот L234A/L235K, L234K/L235K, E233A/L234R/L235R, E233K/L234R/L235R или E233K/L234A/L235K. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область первого или второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234A/L235A, L234D/L235E, E233A/L234D/L235E или E233A/L234K/L235A.

- 30 [00140] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234K/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234A/L235K; модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит
- 35 модификации аминокислот L234K/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234A/L235A; модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234K/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E; модифицированная
- 40 шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233A/L234R/L235R, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233A/L234D/L235E; модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R, и модифицированная шарнирная область второго полипептида
- 45 Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E; или модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234A/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233A/L234K/L235A.

[00141] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит первый и второй полипептиды, содержащие модификации аминокислот коровой области, и содержит следующие дополнительные модификации аминокислот. Таким образом, некоторые варианты реализации настоящего изобретения 5 представляют собой гетеромультимер, предложенный в настоящей заявке, в котором по меньшей мере один из указанных первого или второго полипептидов Fc также содержит по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая выбрана из D265S, E269K, K322A, P329W и E333K. Например, вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в 10 котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234R/L235R/E233K. Другой вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/D265S, и второй полипептид Fc содержит модификации 15 аминокислот L234R/L235R/D265S. Следующий вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/ E269K, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/ L235R/E269K. Другой вариант реализации настоящего изобретения представляет собой 20 гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/K322A, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/K322A. Еще один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый полипептид Fc содержит модификации 25 аминокислот L234D/L235E/P329W, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/P329W. Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/ L235E/E269K/D265S/K322A, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот 30 E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A. Следующие варианты реализации настоящего изобретения представляют собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/ E269K/D265S/K322E/E333K, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K.

[00142] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором: первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234R/L235R/E233K; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/ L235E/D265S, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234R/ L235R/D265S; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/ E269K, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/ L235R/E269K; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/ K322A, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/ L235R/K322A; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/ P329W, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/ L235R/P329W; первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/ E269K/D265S/K322A, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A; или первый полипептид Fc содержит 45

модификации аминокислот L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K.

Первый полипептид Fc

- [00143] Каждый из двух полипептидов Fc конструкции Fc IgG содержит модифицированную шарнирную область. Модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит одну или более модификаций аминокислот, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной области данного полипептида Fc. Под «увеличением положительного заряда модифицированной шарнирной области» подразумевают, что модифицированная шарнирная область с одной или несколькими модификациями аминокислот обладает общим положительным зарядом, превышающим заряд немодифицированной шарнирной области дикого типа. Модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит одну или более модификаций аминокислот, которые отличаются от одной или нескольких модификаций аминокислот другого полипептида Fc. В настоящей заявке асимметричные модификации аминокислот представляют собой любые модификации, при которых аминокислота в конкретном положении одного полипептида (например, «первого полипептида») отличается от аминокислоты в том же положении второго полипептида (например, «второго полипептида»). Это может быть результатом модификации только одной из двух аминокислот первого или второго полипептида конструкции Fc IgG или модификации обеих аминокислот двумя различными аминокислотами.

[00144] Например, если первый полипептид Fc содержит модификацию аминокислоты L235K, модификации аминокислот, которые отличаются, будут включать модификации других аминокислот в шарнирной области, таких как L234 или E233, или модификации L235, отличные от L235K, такие как L235A или L235D. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит одну или более модификаций аминокислот, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной области первого полипептида Fc, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит одну или более модификаций аминокислот, отличных от двух или нескольких модификаций аминокислот указанного первого полипептида Fc. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область указанного первого полипептида Fc содержит две или более модификаций аминокислот, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной области первого полипептида Fc, и модифицированная шарнирная область указанного второго полипептида Fc содержит одну или более модификаций аминокислот, отличающихся от одной или нескольких модификаций аминокислот указанного первого полипептида Fc. Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область указанного первого полипептида Fc содержит две или более модификаций аминокислот, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной области первого полипептида Fc, и модифицированная шарнирная область указанного второго полипептида Fc содержит две или более модификаций аминокислот, отличных от двух или нескольких модификаций аминокислот указанного первого полипептида Fc.

[00145] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, если модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит одну модификацию аминокислот, модификацию аминокислот осуществляют для замены аминокислоты с нейтральной или отрицательно заряженной боковой цепью

аминокислотой с положительно заряженной боковой цепью. Например, L234 или L235 шарнирной области можно заменить на Lys (K), Orn (O) или Arg (R). Таким образом, в вариантах реализации, в которых модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит одну модификацию аминокислот, на Lys, 5 Orn или Arg можно заменить следующие аминокислотные остатки нижней шарнирной области IgG1 человека: A231, P232, E233, L234, L235, G236, G237 или P238.

[00146] В вариантах реализации, в которых модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит две или более модификаций аминокислот, общий результат комбинации модификаций представляет собой увеличение положительного 10 заряда модифицированной шарнирной области. Данное общее увеличение положительного заряда может являться следствием комбинаций модификаций аминокислот, замещающих аминокислоты с отрицательно заряженными или нейтральными боковыми цепями аминокислотами с положительно заряженными боковыми цепями или нейтральными боковыми цепями. Например, согласно одному 15 варианту реализации настоящего изобретения две или более модификаций аминокислот, которые увеличивают положительный заряд нижней шарнирной области первого полипептида Fc конструкции Fc IgG на основе IgG1, могут представлять собой модификации, которые выбраны из E233K, E233R, E233A, L234K, L234R, L234A, L235K, L235R и L235A, при условии, что комбинация двух или нескольких модификаций 20 аминокислот увеличивает положительный заряд модифицированной шарнирной области. Аналогично, другие модификации аминокислот в пределах шарнирной области могут быть введены при условии, что такие модификации увеличивают положительный заряд шарнирной области.

[00147] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения

25 модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот в положениях L234 или L235, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной области. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот в положениях L234, L235 или E233, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной 30 области. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот в положениях L234 и L235, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной области. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот в положениях L234, L235 или E233, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной 35 области. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот в положениях L234 и E233, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной области. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот в положениях L234, L235 40 или E233, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной области. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот в положениях L234 и E233, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной области. Согласно другому варианту реализации 45 настоящего изобретения модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот в положениях L234, L235 и E233, которые увеличивают положительный заряд модифицированной шарнирной области.

[00148] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первый полипептид Fc конструкции Fc IgG содержит модифицированную шарнирную область,

содержащую модификации аминокислот L234A/L235K, E233A/L234R/L235R, E233K/L234R/L235R или E233K/L234A/L235K.

Второй полипептид Fc

[00149] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения

- 5 модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит одну или более модификаций аминокислот, которые отличаются от модификаций аминокислот первого полипептида Fc и которые увеличивают отрицательный заряд модифицированной шарнирной области или которые заряжены нейтрально относительно шарнирной области дикого типа. Под «увеличением
- 10 отрицательного заряда модифицированной шарнирной области» подразумевают, что модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc конструкции Fc IgG с одной или несколькими модификациями аминокислот обладает общим отрицательным зарядом, который является большим, чем заряд немодифицированной шарнирной области дикого типа. Под термином «заряжена нейтрально» подразумевают, что одна
- 15 или более модификаций аминокислот не приводят к изменению общего заряда модифицированной шарнирной области второго полипептида Fc конструкции Fc IgG по сравнению с зарядом шарнирной области дикого типа. Таким образом, модификации аминокислот второго полипептида конструкции Fc IgG включают комбинации модификаций аминокислот, которые заменяют аминокислоты с нейтральной боковой
- 20 цепью аминокислотами с отрицательно заряженной боковой цепью, положительно заряженной боковой цепью или другой нейтральной боковой цепью, и/или модификации аминокислот, которые заменяют аминокислоты с отрицательно заряженной боковой цепью аминокислотами с нейтральной боковой цепью. Комбинации данных модификаций аминокислот являются подходящими при условии, что такие комбинации приводят к
- 25 увеличению отрицательного заряда модифицированной шарнирной области или заряжены нейтрально по сравнению с шарнирной областью дикого типа.

[00150] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения второй полипептид Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот в положениях L234 или L235. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения второй полипептид Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот в положениях L234 и L235. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения второй полипептид Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот, которые выбраны из L234A, L234K, L234R, L234D, L234E, L235K, L235R, L235E, L235A и L235D.

- [00151] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения второй полипептид Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот в положениях L234 и/или L235 и E233. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения второй полипептид Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот, которые выбраны из L234A, L234K, L234R, L234D, L234E, L235K, L235R, L235E, L235A, L235D, E233A и E233D.

- [00152] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc конструкции Fc IgG содержит модификации аминокислот L234A/L235A, L234D/L235E, E233A/L234D/L235E или E233A/L234K/L235A.

2. Другие модификации конструкции Fc IgG

- [00153] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гетеромультимеры согласно настоящему изобретению содержат дополнительные модификации, описанные ниже.

[00154] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения

гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, содержащую модифицированные полипептиды Fc, которые были дополнительно модифицированы для способствования образованию гетеродимерной Fc-области. Такие дополнительно модифицированные полипептиды Fc пригодны для получения гетеромультимеров в контексте

- 5 биспецифичных антител. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептиды Fc содержат вариант CH3-доменов, содержащий модификации аминокислот, которые способствуют образованию гетеродимерных Fc-областей. Подходящие варианты CH3-доменов известны в данной области техники и включают, например, варианты, описанные в международной публикации патента № WO 2012/
- 10 058768 и в патентах США №5,821,333 и 7,695,936. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер согласно настоящему изобретению содержит конструкцию Fc IgG, в которой один из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот CH3T366L/N390R/K392M/T394W, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот CH3 L351Y/S400E/F405A/Y407V.

- 15 [00155] Дополнительные способы модификации полипептидов Fc для способствования образованию гетеродимерной Fc описаны в международной публикации патента № WO 96/027011 («выступ во впадину»), в публикациях Gunasekaran et al. (Gunasekaran K. et al. (2010) J Biol Chem. 285, 19637-46, электростатическая конструкция для достижения селективной гетеродимеризации), Davis et al. (Davis, JH. et al. (2010) Prot Eng Des Sel; 23 (4): 195-202, технология конструирования домена с обменом слоями (strand exchange engineered domain, SEED)) и Moore et al (2011) Mabs 3:6, 546-557.
- 20

- [00156] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, дополнительно содержащую модификации аминокислот, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc-области. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, дополнительно содержащую модификации аминокислот в CH3-области каждого полипептида Fc, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc-области.

- 25 [00157] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, дополнительно содержащую модификации аминокислот, увеличивающие стабильность конструкции Fc IgG, что определяют посредством измерения температуры плавления CH2-домена. Подходящие модификации аминокислот известны в данной области техники и включают, например, модификации, описанные в международной заявке на патент № PCT/CA2012/050780.
- 30
- 35 Более конкретно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, содержащую модификации аминокислот T350V как в первом полипептиде Fc, так и во втором полипептиде Fc.

- [00158] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, содержащий конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем:
- 40 указанный первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот E269Q/D270N, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E269K/D270R; или указанный первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L235K/A327K, и второй полипептид Fc не содержит модификации в шарнирной или нижней шарнирной области; и причем конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание со всеми
- 45 рецепторами Fc γ и с белком C1q по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG.

[00159] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения Fc представляет собой конструкцию Fc IgG1 и конструкцию Fc IgG2, и конструкцию Fc

IgG3 или конструкцию Fc IgG4.

[00160] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция Fc IgG содержит по меньшей мере один CH3-домен, содержащий по меньшей мере одну модификацию аминокислоты, которая способствует образованию гетеродимерной Fc, обладающей стабильностью, сопоставимой со стабильностью гомодимерной Fc дикого типа. Примеры модификаций описаны ниже. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димеризованные CH3-домены гетеродимерной Fc имеют температуру плавления (Tm), которую измеряют методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), составляющую приблизительно 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 77,5, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 или 85°C или более. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения димерная Fc представляет собой гетеродимер с чистотой более приблизительно 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% при получении; или Fc представляет собой гетеродимер с чистотой более приблизительно 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% при экспрессии или при экспрессии в единичной клетке.

[00161] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит одну или более модификаций по меньшей мере в одной из последовательностей CH3. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит одну или более модификаций в по меньшей мере одной из последовательностей CH2.

[00162] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc представляет собой Fc, описанную в заявке на патент PCT/CA2011/001238, поданной 4 ноября 2011 г, или в заявке на патент PCT/CA2012/050780, поданной 2 ноября 2012 г, полное описание каждой из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте во всех отношениях.

[00163] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения конструкция Fc, описанная в настоящей заявке, содержит гетеродимерную Fc, содержащую модифицированный CH3-домен, который был асимметрично модифицирован. Гетеродимерная Fc может содержать два полипептида константного домена тяжелых цепей: первый полипептид тяжелой цепи и второй полипептид тяжелой цепи, которые можно применять взаимозаменяя при условии, что Fc содержит один первый полипептид тяжелой цепи и один второй полипептид тяжелой цепи. Как правило, первый полипептид тяжелой цепи содержит первую последовательность CH3, и второй полипептид тяжелой цепи содержит вторую последовательность CH3.

[00164] Две последовательности CH3, которые содержат одну или более модификаций аминокислот, введенных асимметричным способом, как правило, при димеризации двух последовательностей CH3 приводят к образованию гетеродимерной Fc вместо гомодимера. В настоящей заявке термин «асимметричные модификации аминокислот» относится к любой модификации, в которой аминокислота в конкретном положении первой последовательности CH3 отличается от аминокислоты в том же положении второй последовательности CH3, и первая и вторая последовательности CH3 предпочтительно спариваются с образованием гетеродимера вместо гомодимера. Данная гетеродимеризация может являться результатом модификации только одной из двух аминокислот в том же соответствующем положении аминокислот в каждой последовательности; или результатом модификаций обеих аминокислот в каждой последовательности в том же соответствующем положении в каждой первой и второй последовательности CH3. Первая и вторая последовательность CH3 гетеродимерной Fc может содержать одну или более одной асимметричных модификаций аминокислот.

[00165] В таблице X приведены аминокислотные последовательности Fc последовательности IgG1 человека, соответствующие аминокислотам с 231 по 447 полноразмерной тяжелой цепи IgG1 человека. Последовательность CH3 содержит аминокислоты 341-447 полноразмерной тяжелой цепи IgG1 человека. Как правило, Fc может содержать две непрерывные последовательности тяжелой цепи (A и B), способные к димеризации. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения одна или обе последовательности Fc содержат одну или более мутаций, или модификаций в следующих положениях: L351, F405, Y407, T366, K392, T394, T350, S400 и/или N390, согласно нумерации EU. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит 5 мутантную последовательность, представленную в таблице X. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит мутации Варианта 1 A-B. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит мутации Варианта 2 A-B. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит мутации Варианта 3 A-B. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит мутации Варианта 4 A-B. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит мутации Варианта 5 A-B.

Таблица X: Примеры последовательности Fc и модификаций CH3

20	Последовательность Fc IgG1 человека 231-447 (нумерация согласно EU)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQP REPQVYT LPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:70)	
25	Вариант последовательности Fc IgG1 (231-447)	Цепь	Мутации
	1	A	L351Y_F405A_Y407V
	1	B	T366L_K392M_T394W
	2	A	L351Y_F405A_Y407V
	2	B	T366L_K392L_T394W
	3	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
	3	B	T350V_T366L_K392L_T394W
	4	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
	4	B	T350V_T366L_K392M_T394W
	5	A	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
	5	B	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

35 [00166] Первая и вторая последовательности CH3 могут содержать мутации аминокислот, описанные в настоящей заявке, в отношении аминокислот с 231 по 447 полноразмерной тяжелой цепи IgG1 человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc содержит модифицированный CH3-домен с первой последовательностью CH3, содержащей модификации аминокислот в положениях F405 и Y407, и второй последовательностью CH3, содержащей модификацию аминокислоты в положении T394. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc содержит модифицированный CH3-домен с первой последовательностью CH3, содержащей одну или более модификаций аминокислот, которые выбраны из L351Y, F405A и Y407V, и второй последовательностью CH3, содержащей одну или более модификаций аминокислот, которые выбраны из T366L, T366I, K392L, K392M и T394W.

[00167] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения конструкция Fc содержит гетеродимерную Fc, которая содержит модифицированный CH3-домен с

первой последовательностью СН3, содержащей модификации аминокислот в положениях L351, F405 и Y407, и второй последовательностью СН3, содержащей модификации аминокислот в положениях T366, K392 и T394, и одной из первой или второй

- 5 последовательностей СН3, дополнительно содержащей модификацию аминокислоты в положении Q347, и другой последовательностью СН3, дополнительно содержащей модификацию аминокислоты в положении K360. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc содержит модифицированный СН3-домен с первой последовательностью СН3, содержащей модификации аминокислот в положениях L351, F405 и Y407, и второй последовательностью СН3, содержащей
- 10 модификации аминокислот в положениях T366, K392 и T394, с одной из первой или второй последовательностями СН3, дополнительно содержащими модификацию аминокислоты в положении Q347, и другой последовательностью СН3, дополнительно содержащей модификацию аминокислоты в положении K360, и одной или обеими из указанных последовательностей СН3, дополнительно содержащими модификацию
- 15 аминокислоты T350V.

[00168] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения конструкция Fc, предложенная в настоящей заявке, содержит гетеродимерную Fc, содержащую модифицированный СН3-домен с первой последовательностью СН3, содержащей модификации аминокислот в положениях L351, F405 и Y407, и второй

- 20 последовательностью СН3, содержащей модификации аминокислот в положениях T366, K392 и T394, и одной из указанных первой или второй последовательностей СН3, дополнительно содержащей модификацию аминокислоты D399R или D399K, и с другой последовательностью СН3, содержащей одну или более из T411E, T411D, K409E, K409D, K392E и K392D. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения
- 25 гетеродимерная Fc содержит модифицированный СН3-домен с первой последовательностью СН3, содержащей модификации аминокислот в положениях L351, F405 и Y407, и второй последовательностью СН3, содержащей модификации аминокислот в положениях T366, K392 и T394, и одной из указанных первой или второй последовательностей СН3, которая дополнительно содержит модификацию
- 30 аминокислоты D399R или D399K, и другой последовательностью СН3, содержащей одну или более из T411E, T411D, K409E, K409D, K392E и K392D, причем одна или обе из указанных последовательностей СН3 дополнительно содержат модификацию аминокислоты T350V.

[00169] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения

- 35 гетеродимерная Fc содержит модифицированный СН3-домен с первой последовательностью СН3, содержащей модификации аминокислот в положениях L351, F405 и Y407, и второй последовательностью СН3, содержащей модификации аминокислот в положениях T366, K392 и T394, причем одна или обе из указанных последовательностей СН3 дополнительно содержат модификацию аминокислоты
- 40 T350V.

[00170] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc содержит модифицированный СН3-домен, содержащий следующие модификации аминокислот, где «А» представляет модификации аминокислот в

- 45 последовательности первого СН3 и «В» представляет модификации аминокислот в последовательности второго СН3: A:L351Y_F405A_Y407V, B:T366L_K392M_T394W, A:L351Y_F405A_Y407V, B:T366L_K392L_T394W, A:T350V_L351Y_F405A_Y407V, B: T350V_T366L_K392L_T394W, A:T350V_L351Y_F405A_Y407V, B: T350V_T366L_K392M_T394W, A:T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V и/или B:T350V_T

366L_N390R_K392M_T394W.

[00171] Одна или более асимметричных модификаций аминокислот могут способствовать образованию гетеродимерной Fc, в которой гетеродимерный CH3-домен обладает стабильностью, сравнимой со стабильностью гомодимерного CH3-

5 домена дикого типа. Согласно варианту реализации настоящего изобретения одна или более асимметричных модификаций аминокислот способствуют образованию гетеродимерного Fc-домена, причем гетеродимерный Fc-домен обладает стабильностью, сравнимой со стабильностью гомодимерного Fc-домена дикого типа. Согласно варианту реализации настоящего изобретения одна или более асимметричных модификаций

10 аминокислот способствуют образованию гетеродимерного Fc-домена, причем гетеродимерный Fc-домен обладает стабильностью, определяемой посредством измерения температуры плавления (Tm) в исследовании методом дифференциальной сканирующей калориметрии, и причем указанная температура плавления отличается не более чем на 4°C от температуры, наблюданной для соответствующего

15 симметричного гомодимерного Fc-домена дикого типа. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит одну или более модификаций по меньшей мере в одной из последовательностей CH3, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc со стабильностью, сопоставимой со стабильностью гомодимерной Fc дикого типа.

[00172] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения стабильность 20 CH3-домена можно оценить посредством измерения температуры плавления CH3-домена, например, методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Таким образом, согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения CH3-домен обладает температурой плавления приблизительно 68°C или более. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения CH3-домен обладает

25 температурой плавления приблизительно 70°C или более. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения CH3-домен обладает температурой плавления приблизительно 72°C или более. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения CH3-домен обладает температурой плавления приблизительно 73°C или более. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения CH3-домен

30 обладает температурой плавления приблизительно 75°C или более. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения CH3-домен обладает температурой плавления приблизительно 78°C или более. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения димеризованные последовательности CH3 имеют температуру плавления (Tm) приблизительно 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 77,5, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 или 35 85°C или более.

[00173] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция Fc, содержащая гетеродимерную Fc, которая дополнитель но содержит модифицированные последовательности CH3, может быть получена с чистотой по 40 меньшей мере приблизительно 75%, по сравнению с гомодимерными Fc в экспрессированном продукте. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc получена с чистотой более приблизительно 80%.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc получена с чистотой более приблизительно 85%. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc получена с чистотой более приблизительно 45 90%. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc получена с чистотой более приблизительно 95%. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc получена с чистотой более приблизительно 97%. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc

представляет собой гетеродимер с чистотой более приблизительно 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% при экспрессии. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc представляет собой гетеродимер с чистотой более приблизительно 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% при экспрессии в единичной клетке.

[00174] Дополнительные способы модификации мономерных полипептидов Fc для способствования образованию гетеродимерной Fc описаны в международной публикации патента № WO 96/027011 («выступ во впадину»), в публикациях Gunasekaran et al. (Gunasekaran K. et al. (2010) J Biol Chem. 285, 19637-46, электростатическая

10 конструкция для достижения селективной гетеродимеризации), Davis et al. (Davis, JH. et al. (2010) Prot Eng Des Sel; 23(4): 195-202, технология конструирования домена с обменом слоями (strand exchange engineered domain, SEED) и Labrijn et al [Efficient generation of stable bi-specific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. Labrijn AF, Meesters JL, de Goeij BE, van den Bremer ET, Neijssen J, van Kampen MD, Strumane K, Verploegen S, Kundu A, Gramer MJ, van 15 Berkel PH, van de Winkel JG, Schuurman J, Parren PW. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Mar 26; 110(13):5145-50.

3. Функциональные характеристики гетеромультимеров

[00175] Гетеромультимеры согласно настоящему изобретению демонстрируют значительно уменьшенное/устраненное связывание с Fc γ R и с C1q. Кроме того, согласно 20 определенным вариантам реализации настоящего изобретения гетеромультимеры также демонстрируют дополнительные желательные свойства, такие как стабильность, способность связываться с FcRn и свойства, облегчающие очистку желаемых продуктов экспрессии от нежелательных продуктов или примесей.

[00176] Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение включает

25 гетеромультимер, содержащий конструкцию Fc IgG, которая не связывается измеряется с рецепторами Fc γ R, но связывается с FcRn, что делает данную конструкцию желательным кандидатом для вариантов применения, в которых период полужизни антитела *in vivo* является важным, тогда как эффекторные функции (такие как CDC, ADCP и ADCC) не являются необходимыми или являются вредными.

30 [00177] Способы определения способности гетеромультимеров, содержащих конструкцию Fc IgG, связываться с Fc γ R или C1q, известны в данной области техники и описаны в других разделах настоящей заявки.

За. Уменьшенное/устраненное связывание с Fc γ R и комплементом

[00178] Гетеромультимеры согласно настоящему изобретению демонстрируют 35 уменьшенное/устраненное связывание с Fc γ R и C1q по сравнению с родительским полипептидом. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер согласно настоящему изобретению демонстрирует K_D в отношении Fc γ R и C1q, которая по меньшей мере в 5 раз выше, чем K_D родительского полипептида.

40 Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер согласно настоящему изобретению демонстрирует K_D в отношении Fc γ R и C1q, которая по меньшей мере в 10 выше, чем K_D родительского полипептида, что измеряют посредством анализов связывания, известных в данной области техники. Анализы связывания, известные в данной области техники, включают, но не ограничиваются 45 ими, анализы на основе FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, резонансный перенос энергии флуоресценции) и BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer, резонансный перенос энергии биолюминесценции), AlphaScreen™ (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay, гомогенный анализ усиленной за счет эффекта сближения

люминесценции), сцинтилляционный анализ сближения, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, твердофазный иммуносорбентный анализ), ППР (поверхностный плазмонный резонанс, также известный как BiacoreTM), изотермическую титрационную калориметрию, дифференциальную сканирующую калориметрию, гель-электрофорез и хроматографию, в том числе гель-фильтрацию. В данных и других способах можно использовать определенный партнер по слиянию или метку антитела. В анализах можно применять множество способов обнаружения, включая, но не ограничиваясь ими, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки.

[00179] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения

5 гетеромультимер, содержащий конструкцию Fc IgG, обладает K_D в отношении Fc γ RIIaH, составляющей более 5 мкМ, K_D в отношении Fc γ RIIaR, составляющей более 10 мкМ, K_D в отношении Fc γ RIIb, составляющей более 30 мкМ, K_D в отношении Fc γ RIIIaF, составляющей более 20 мкМ, K_D в отношении Fc γ RIIIaV, составляющей более 6 мкМ, 10 и K_D в отношении Fc γ RIa, составляющей более 6,5 нМ, что измеряют методом 15 поверхности плазмонного резонанса (ППР). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер, содержащий конструкцию Fc IgG, обладает K_D в отношении Fc γ RIIaH, составляющей более 10 мкМ, K_D в отношении Fc γ RIIaR, составляющей более 10 мкМ, K_D в отношении Fc γ RIIb, составляющей более 10 мкМ, 20 K_D в отношении Fc γ RIIIaF, составляющей более 6 мкМ, K_D в отношении Fc γ RIIIaV, составляющей более 6 мкМ, K_D в отношении Fc γ RIa, составляющей более 30 нМ, и не связывается с C1q, что измеряют методом поверхности плазмонного резонанса (ППР).

25 [00180] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимеры, содержащие конструкцию Fc IgG, не демонстрируют обнаруживаемые уровни ADCC, ADCP и CDC, что измеряют с помощью стандартных анализов. Неограничивающие примеры стандартных анализов для исследования 30 эффекторной функции включают анализы, описанные в примерах, приведенных в настоящей заявке.

3b. Стабильность

[00181] Биофизические свойства гетеромультимеров, в том числе, например, стабильность, оценивают с применением множества способов, известных в данной области техники. Стабильность белка можно определить посредством измерения 35 термодинамического равновесия между свернутым состоянием (прошедшим фолдинг) и развернутым состоянием (с нарушенным фолдингом). Например, гетеромультимеры согласно настоящему изобретению могут быть развернуты с применением химического денатурирующего средства, нагревания или pH, и данный переход можно контролировать с применением способов, включающих, но не ограниченных ими, 40 спектроскопию кругового диахроизма, флуоресцентную спектроскопию, спектроскопию на основе поглощения, ЯМР-спектроскопию, калориметрию и протеолиз. Как понимает специалист в данной области техники, кинетические параметры переходов между свернутым и развернутым состояниями также можно контролировать с применением 45 указанных, а также других методик. Растворимость и общую структурную целостность гетеромультимера можно количественно или качественно определить с применением широкого диапазона способов, известных в данной области техники.

[00182] Способы, которые можно применять для характеристики биофизических свойств гетеромультимеров, включают гель-электрофорез, изоэлектрическое

фокусирование, капиллярный электрофорез, хроматографию, такую как эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография и обращенно-фазовая 5 высокоэффективная жидкостная хроматография, пептидное картирование, олигосахаридное картирование, масс-спектрометрию, спектроскопию на основе поглощения в ультрафиолетовой области, флуоресцентную спектроскопию, спектроскопию кругового дихроизма, изотермическую титрационную калориметрию, дифференциальную сканирующую калориметрию, аналитическое 10 ультрацентрифугирование, динамическое рассеивание света, протеолиз и перекрестное сшивание, измерение мутности, анализы оседания на фильтре, иммунологические 15 анализы, анализы связывания флуоресцентных красителей, анализы окрашивания белка, микроскопию и обнаружение агрегатов методом ELISA или другим анализом связывания. Можно также использовать структурный анализ с применением кристаллографических методик на основе рентгеновских лучей и ЯМР-спектроскопии. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения стабильность и/или 20 растворимость можно измерять путем определения количества белкового раствора после некоторого определенного периода времени. В данном анализе на белок можно воздействовать или можно не воздействовать определенными экстремальными условиями, например, увеличенной температурой, низким pH или присутствием денатурирующего вещества. Поскольку для осуществления функции, как правило, 25 необходим стабильный растворимый и/или свернутый надлежащим образом/структурированный белок, вышеуказанные функциональные анализы и анализы связывания также позволяют провести такие измерения. Например, можно проанализировать способность раствора, содержащего гетеромультимер, связываться с антигеном-мишенью, затем воздействовать на данный раствор повышенной 30 температурой в течение одного или нескольких определенных периодов времени, а затем снова проанализировать способность раствора связываться с антигеном. Поскольку развернутый и агрегированный белок, как ожидается, не способен к связыванию с антигеном, количество оставшейся активности является мерой стабильности и растворимости антитела.

[00183] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимеры, содержащие конструкцию Fc IgG, являются стабильными, что измеряют посредством определения температуры плавления одного или нескольких 35 доменов гетеромультимера, содержащих конструкцию Fc IgG. Температуру плавления гетеромультимеров можно определить с применением способов, известных в данной области техники и описанных более подробно в других разделах настоящей заявки. Например, температуру плавления гетеромультимеров можно определить методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), и получить термограммы гетеромультимера. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем начало плавления конструкции 40 Fc IgG на термограмме больше или равно 65°C. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем начало плавления конструкции Fc IgG на термограмме больше или равно 66°C. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем начало плавления конструкции Fc IgG на термограмме 45 больше или равно 68°C. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем начало плавления конструкции Fc IgG на термограмме больше или равно 70°C.

[00184] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем конструкция Fc IgG содержит CH2-домен с температурой плавления, большей или равной температуре плавления CH2-домена родительского полипептида или антитела. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, 5 причем конструкция Fc IgG содержит CH2-домен с температурой плавления, которая приблизительно на 1-2°C выше температуры плавления родительского CH2-домена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем конструкция Fc IgG содержит CH2-домен с температурой плавления, которая приблизительно на 2-3°C выше температуры 10 плавления родительского CH2-домена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем конструкция Fc IgG содержит CH2-домен с температурой плавления, которая приблизительно на 1-2°C выше температуры плавления родительского CH2-домена, причем гетеромультимер содержит модификации аминокислот, примерами которых 15 являются AAC4 и AAC5. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем конструкция Fc IgG содержит CH2-домен с температурой плавления, которая приблизительно на 2-3°C выше температуры плавления родительского CH2-домена, причем гетеромультимер содержит модификации аминокислот, примерами которых являются AAC2, AAC9, AAC10, AAC11, 20 AAC12, AAC13, AAC14 и AAC15. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем конструкция Fc IgG содержит CH2-домен с температурой плавления, которая приблизительно на 4°C выше температуры плавления родительского CH2-домена, причем гетеромультимер содержит модификацию аминокислоты, примером которой является AAC6.

25 3с. Связывание с FcRn

[00185] Как известно в данной области техники, связывание с FcRn вызывает поступление антитела, которое подверглось эндоцитозу, из эндосомы назад в кровоток (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766). Данный процесс в сочетании с затрудненной фильтрацией в почках 30 в связи с большим размером полноразмерной молекулы приводит к благоприятным периодам полужизни антитела в сыворотке, варьирующим от одной до трех недель. Связывание Fc с FcRn также играет ключевую роль в переносе антитела. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимеры согласно настоящему изобретению способны к связыванию с FcRn.

35 4. Структура гетеромультимера

4а. Антиген-связывающие домены

[00186] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер согласно настоящему изобретению состоит исключительно из конструкции Fc IgG. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения 40 гетеромультимер согласно настоящему изобретению содержит конструкцию Fc IgG и один или более антиген-связывающих доменов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер согласно настоящему изобретению содержит конструкцию Fc IgG и один антиген-связывающий домен. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер согласно настоящему изобретению 45 содержит конструкцию Fc IgG и два антиген-связывающих домена. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер согласно настоящему изобретению содержит конструкцию Fc IgG и три антиген-связывающих домена. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер

согласно настоящему изобретению содержит конструкцию Fc IgG и четыре антиген-связывающих домена. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер согласно настоящему изобретению содержит конструкцию Fc IgG и до шести антиген-связывающих доменов.

5 [00187] Антиген-связывающие домены могут являться слитыми с конструкцией Fc IgG с помощью способов, известных в данной области техники.

[00188] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер согласно настоящему изобретению содержит конструкцию Fc IgG, содержащую по меньшей мере один антиген-связывающий домен, причем указанный 10 по меньшей мере один антиген-связывающий домен выбран из Fab-фрагмента, scFv, sdAb, антиген-связывающего пептида, белка, слитого с Fc, или домена белка, способного к связыванию с антигеном.

[00189] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, содержащую по меньшей мере один 15 антиген-связывающий домен, причем по меньшей мере один антиген-связывающий домен связывается с антигеном-мишенью, который выбран из а-цепи (CD25) ИЛ-2R, амилоида бета, EpCAM, CD3, BLyS (или BAFF), CD11a, CD20, CD22, CD23, CD3, CD4, CD52, CD80, CTLA-4, EGFR, F белка PCB (респираторно-синцитиального вируса), G250, гликопroteина IIb/IIIa R, HER2, рецептора HER2/neu, Hsp90, IgE антитела, ИЛ-12/ИЛ-20, ИЛ-1 β , ИЛ-5, рецептора ИЛ-6, интегрина альфа-4/бета-1, муцина 16/CA-125, RAN L, ФНО альфа, VEGF-A и других терапевтически предпочтительных мишений.

[00190] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй 25 полипептид Fc, причем каждый полипептид Fc содержит модифицированную шарнирную область, причем указанный гетеромультимер получен из гуманизированного моноклонального антитела, обладающего терапевтическим потенциалом, которое выбрано из: алемтузумаба, аполизумаба, аселизумаба, атилизумаба, бапинеузумаба, бевацизумаба, биватузумаба мертанзина, кантузумаба мертанзина, цеделизумаба, цертолизумаба пегола, цидфузитузумаба, цидтузумаба, даклизумаба, экулизумаба, 30 эфализумаба, эпратузумаба, эрлизумаба, фелвизумаба, фонтолизумаба, гемтузумаба озогамицина, инотузумаба озогамицина, ипилимумаба, лабетузумаба, линтузумаба, матузумаба, меполизумаба, мотовизумаба, натализумаба, нимотузумаба, ноловизумаба, нумавизумаба, окрелизумаба, омализумаба, паливизумаба, пасколизумаба, пекфузитузумаба, пектузумаба, пертузумаба, пекселизумаба, 35 раливизумаба, ранибизумаба, ресливизумаба, реслизумаба, ресивизумаба, ровелизумаба, руплизумаба, сибротузумаба, сиплизумаба, сонтузумаба, такатузумаба тетраксетана, тадокизумаба, тализумаба, тефебазумаба, токилизумаба, торализумаба, трастузумаба, тукотузумаба цемолейкина, тукуситузумаба, умавизумаба, уртоксазумаба и визилизумаба.

40 [00191] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, полученную из терапевтического антитела, такого как, например, ритуксимаб или трастузумаб.

4b. Конъюгаты антитело-лекарственный препарат

[00192] Также предусмотрено, что гетеромультимер согласно настоящему 45 изобретению может содержать одну или более молекул токсичного лекарственного препарата, связанных с конструкцией Fc IgG и/или с другими доменами гетеромультимера. Молекулы токсичного лекарственного препарата включают вещества, которые ингибируют или предотвращают функцию клеток и/или вызывают

разрушение клеток. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения одна или более молекул токсичного лекарственного препарата могут быть связаны с гетеромультимером, содержащим конструкцию Fc IgG. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения одна или более молекул токсичного лекарственного препарата могут быть связаны с гетеромультимером, содержащим конструкцию Fc IgG и по меньшей мере один антиген-связывающий домен. Подходящие молекулы токсичного лекарственного препарата, которые могут быть связаны с конструкцией Fc IgG, выбраны из радиоактивных изотопов (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² и радиоактивных изотопов Lu), химиотерапевтических средств и токсинов, таких как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, в том числе фрагменты и/или варианты указанных токсинов.

[00193] Подходящие химиотерапевтические средства, которые могут быть связаны с конструкцией Fc IgG, выбраны из группы, включающей алкилирующие средства, такие как тиотепа и CYTOXAN® циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфаорамид и триметилоломеламин; ацетогенины (в особенности буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (в том числе синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (в том числе его адозелезиновые, карзелезиновые и бизелезиновые синтетические аналоги); подофиллотоксин; подофилловую кислоту; тенипозид; криптофицины (в особенности криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (в том числе синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, меклоретамин, гидрохлорид оксида меклоретамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндиновые антибиотики (например, калихеамицин, в особенности калихеамицин гамма 1I и калихеамицин омега 1I (см., например, Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); динемицин, в том числе динемицин A; эсперамицин; а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые эндиновые хромофоры-антибиотики), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (в том числе ADRIAMYCIN®, морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин, липосомальную форму для инъекций доксорубицина-HCl (DOXIL®) и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин C, миофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), теграфур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотилон и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги,

такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пириимидиновые аналоги, такие как анцитабин, азаситидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолона, эпитетиостанол, мепитиостан, тестолактон;

5 анти-адреналовые соединения, такие как аминоглютетимид, митотан, трилостан; средства, восполняющие фолиевую кислоту, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; деффофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин;

10 майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогузон; митоксанtron; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирапубицин; лозоксанtron; 2- этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецины (в особенности Т-2 токсин,

15 верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; винdezин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипобромуан; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); тиотепу; таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL®), состав паклитаксела на основе наночастиц, полученный генноинженерными методами из альбумина (ABRAXANE™), и доцетаксел (TAXOTERE®); хлоранбуцил; 6-тиогуанин;

20 меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®), платина, этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксанtron; винкристин (ONCOVIN®); оксиплатин, лейковорин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как

25 ретиноевая кислота; фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных веществ; а также комбинации двух или более вышеуказанных веществ, такие как CHOP (аббревиатура, обозначающая комбинированную терапию циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном); и FOLFOX (аббревиатура, обозначающая схему лечения оксалиплатином (ELOXATIN™) вместе с 5-FU и лейковорином).

4c. Гетерологичные пептиды или полипептиды

[00194] Также предполагается, что гетеромультимеры согласно настоящему изобретению содержат конструкцию Fc IgG, которая присоединена к одному или нескольким гетерологичным пептидам или полипептидам. Один или более 35 гетерологичных пептидов или полипептидов выбраны из, например, обнаруживаемого маркера, члена пары лиганд-рецептор, члена пары фермент-субстрат и члена пары резонансного переноса энергии флуоресценции.

5. Способы получения и очистки гетеромультимеров

[00195] Как описано выше, гетеромультимер согласно настоящему изобретению содержит конструкцию Fc IgG, содержащую первый и второй полипептид Fc. Оба полипептида Fc можно легко получить с применением технологии рекомбинантной ДНК, известной в данной области техники, согласно вариантам реализации, в которых гетеромультимер содержит Fc-область IgG саму по себе, или согласно вариантам реализации, в которых гетеромультимеры также содержат один или более антиген-45 связывающих доменов или гетерологичных белков. Разработка нуклеиновой кислоты, кодирующей такие молекулы, соответствует общим знаниям специалиста в данной области техники. Для способов на основе рекомбинантной нуклеиновой кислоты, синтеза нуклеиновой кислоты, культуры клеток, введения трансгена и экспрессии

рекомбинантных белков можно применять стандартные методики, такие как, например, методики, описанные в руководствах Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 3rd ed., 2001); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2nd ed., 1989); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., John Wiley and Sons, New York, 4th ed., 1999); и Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press, Washington, D.C., 2nd ed., 1998).

[00196] Как указано в других разделах настоящей заявки, нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности полипептидов Fc, полученных из тяжелой цепи IgG, известны в данной области техники или могут быть легко определены с применением методов секвенирования нуклеиновой кислоты и/или белка. Способы генетического слияния гетерологичных белков или молекул токсичного лекарственного препарата, описанных в настоящей заявке, с полипептидами Fc известны в данной области техники, и некоторые из них описаны ниже и в разделе «Примеры».

[00197] Векторы экспрессии и клетки-хозяева, подходящие для экспрессии полипептидов Fc и, при необходимости, полипептидов, кодирующих антиген-связывающие домены, также хорошо известны в данной области техники, как описано ниже.

5.1 Векторы и клетки-хозяева

[00198] Рекомбинантная экспрессия полипептидов гетеромультимера предполагает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, кодирующий необходимые полипептиды. После получения полинуклеотида, кодирующего полипептид, вектор для получения полипептида можно получить посредством технологии рекомбинантной ДНК с применением методик, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, способы получения белка посредством экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, описаны в настоящей заявке. Способы, хорошо известные специалистам в данной области техники, можно применять для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие полипептид, и соответствующие сигналы, контролирующие транскрипцию и трансляцию. Данные способы включают, например, методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетической рекомбинации *in vivo*. Таким образом, в настоящем изобретении предложены векторы, способные к репликации, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды гетеромультимера, функционально связанную с промотором.

[00199] Вектор экспрессии переносят в клетку-хозяин с применением общепринятых методик, после чего трансфицированные клетки культивируют с применением общепринятых методик получения полипептида для применения в способе согласно настоящему изобретению. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения полипептид для применения в способе коэкспрессируют в клетке-хозяине для экспрессии молекулы целого иммуноглобулина, как подробно описано ниже.

[00200] Для экспрессии полипептидов можно применять множество систем экспрессии хозяин-вектор. Такие системы хозяин-вектор экспрессии представляют собой переносчики, посредством которых кодирующие последовательности, представляющие интерес, могут быть получены и затем очищены, а также представляют собой клетки, которые могут после трансформации или трансфекции соответствующими кодирующими последовательностями нуклеотидов экспрессировать полипептиды *in situ*. Такие системы включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной ДНК

бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующие полипептидные последовательности; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии дрожжей, содержащими последовательности, кодирующие модифицированную тяжелую и легкую цепь; системы 5 клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусными), содержащие последовательности, кодирующие полипептид; системы клеток растений, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вируса мозаики цветной капусты, CaMV; вируса мозаики табака, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными 10 векторами экспрессии (например, Ti-плазмидой), содержащие последовательности, кодирующие полипептид; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS, CHO, ВНК, HEK-293, NSO и 3T3), несущие рекомбинантные конструкции экспрессии, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний 15 промотор аденоовириуса; 7.5K промотор вируса коровьей оспы). Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения клетки бактерий, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки используют для экспрессии полипептида, который представляет собой рекомбинантное антитело или молекулы слитого белка. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO), в 20 сочетании с вектором, таким как главный элемент промотора немедленно-раннего гена цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную систему экспрессии антител (Foecking et al., 1986, Gene 45:101; и Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2). Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих тяжелую и легкую цепи 25 иммуноглобулина каждого гетеродимера, регулируется конститутивным промотором, индуциальным промотором или тканеспецифичным промотором.

[00201] В клетках-хозяевах млекопитающих можно применять множество систем экспрессии на основе вирусов. В случаях применения в качестве вектора экспрессии аденоовириуса, последовательности, кодирующие модифицированные тяжелую и легкую 30 цепь, представляющие интерес, можно лигировать в комплекс контроля транскрипции/трансляции аденоовириуса, например, поздний промотор и трехкомпонентную лидерную последовательность. Данный химерный ген можно затем встроить в геном аденоовириуса посредством рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка в несущественную область генома вируса (например, область E1 или E3) приводит к получению рекомбинантного 35 вируса, который является жизнеспособным и способным к экспрессии полипептида в инфицированных хозяевах (например, см. публикацию Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). Для эффективной трансляции встроенных последовательностей, кодирующих антитело, могут также потребоваться специфичные сигналы инициации. Данные сигналы включают кодон инициации ATG и смежные 40 последовательности. Более того, кодон инициации должен находиться в рамке считывания желаемой кодирующей последовательности, чтобы гарантировать трансляцию полной вставки. Данные экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут быть получены из множества источников, как природных, так и синтетических. Эффективность экспрессии можно увеличить путем введения 45 соответствующих энхансерных элементов транскрипции, терминаторов транскрипции и т.д. (см., например, публикацию Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544).

[00202] Экспрессию полипептидов гетеромультимеров можно контролировать с помощью любого промоторного или энхансерного элемента, известного в данной

области техники. Промоторы, которые можно применять для контроля экспрессии гена, кодирующего полипептид, включают, но не ограничиваются ими, область раннего промотора SV40 (Bernoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310), промотор, содержащийся в 3'-длинном концевом повторе вируса саркомы Payса (Yamamoto, et al., 1980, *Cell* 22:787-797), промотор тимидинкиназы герпеса (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445), регуляторные последовательности гена металлотионеина (Brinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42), промотор тетрациклина (Tet) (Gossen et al., 1995, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551); прокариотические векторы экспрессии, такие как промотор β -лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731) или tac-промотор (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25; см. также публикацию "Useful proteins from recombinant bacteria" in *Scientific American*, 1980, 242:74-94); векторы экспрессии растений, содержащие область промотора нопалинсинтетазы (Herrera-Estrella et al., *Nature* 303:209-213) или 35S РНК-промотора вируса мозаики цветной капусты (Gardner et al., 1981, *Nucl. Acids Res.* 9:2871) и промотор 15 фотосинтетического фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы (Herrera-Estrella et al., 1984, *Nature* 310:115-120); промоторные элементы дрожжей или других грибов, такие как промотор Gal 4, промотор ADC (алкогольдегидрогеназы), промотор PGK (фосфоглицеролкиназы), промотор щелочной фосфатазы и следующие транскрипционные контролльные области животных, демонстрирующие 20 тканеспецифичность и используемые для получения трансгенных животных: контрольная область гена эластазы I, проявляющая активность в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); контрольная область гена инсулина, проявляющая активность в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 25 1985, *Nature* 315:115-122), контрольная область гена иммуноглобулина, проявляющая активность в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444), контрольная область опухоли молочной железы мышей, проявляющая активность в тестикularных клетках, клетках молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, 30 *Cell* 45:485-495), контрольная область гена альбумина, проявляющая активность в печени (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276), контрольная область гена альфа-фетопротеина, проявляющая активность в печени (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 235:53-58); контрольная область гена 1-антитрипсина, проявляющая активность в печени (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 35 1:161-171), контрольная область гена бета-глобина, проявляющая активность в миелоидных клетках (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46: 89-94; контрольная область гена основного белка миелина, проявляющая активность в клетках олигодендроцитах мозга (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); контрольная область гена легкой цепи миозина-2, проявляющая активность в скелетной мускулатуре 40 (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); нейрон-специфичная енолаза (NSE), проявляющая активность в нейронных клетках (Morelli et al., 1999, *Gen. Virol.* 80:571-83); контрольная область гена нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), проявляющая активность в нейронных клетках (Tabuchi et al., 1998, *Biochem. Biophysic. Res. Com.* 253: 818-823); промотор глиофилилярного кислого белка (GFAP), проявляющий активность 45 в астроцитах (Gomes et al., 1999, *Braz J Med Biol Res* 32(5): 619-631; Morelli et al., 1999, *Gen. Virol.* 80:571-83), а также контрольная область гена гонадотропин-высвобождающего гормона, проявляющая активность в гипоталамусе (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

[00203] Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или модифицирует и процессирует продукт гена конкретным желаемым способом. Экспрессию, контролируемую определенными промоторами, можно увеличить в присутствии определенных индукторов; таким

5 образом, можно контролировать экспрессию сконструированного генно-инженерным способом слитого белка. Более того, различные клетки-хозяева имеют характерные и специфичные механизмы трансляционного и пост-трансляционного процессинга и модификации (например, гликозилирование, фосфорилирование белков). Можно выбрать соответствующие линии клеток или системы хозяина, чтобы гарантировать 10 желаемые модификации и процессинг экспрессированного чужеродного белка.

Например, экспрессия в бактериальной системе позволит получить негликозилированный продукт, а экспрессия в дрожжах позволит получить гликозилированный продукт. Можно применять эукариотические клетки-хозяева, обладающие клеточным аппаратом для надлежащего процессинга первичного

15 транскрипта (например, гликозилирования и фосфорилирования) продукта гена. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, HEK-293, 3T3, WI38, NSO и в особенности нейрональные линии клеток, такие как, например, клетки SK-N-AS, SK-N-FI, SK-N-DZ нейробластомы человека (Sugimoto et al., 1984, J. Natl. Cancer Inst. 73: 51-57), клетки SK-N-SH

20 нейробластомы человека (Biochim. Biophys. Acta, 1982, 704: 450-460), клетки Daoy мозжечковой медуллобластомы человека (He et al., 1992, Cancer Res. 52: 1144-1148), клетки DBTRG-05MG глиобластомы (Kruse et al., 1992, In Vitro Cell. Dev. Biol. 28A: 609-614), клетки IMR-32 нейробластомы человека (Cancer Res., 1970, 30: 2110-2118), клетки 1321 N1 астроцитомы человека (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74: 4816), клетки MOG-

25 G-CCM астроцитомы человека (Br. J. Cancer, 1984, 49: 269), клетки U87MG глиобластомы-астроцитомы человека (Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1968, 74: 465-486), клетки A172 глиобластомы человека (Olopade et al., 1992, Cancer Res. 52: 2523-2529), клетки C6 глиомы крысы (Benda et al., 1968, Science 161: 370-371), клетки Neuro-2a нейробластомы мыши (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1970, 65: 129-136), клетки NB41A3 нейробластомы мыши

30 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1962, 48: 1184-1190), клетки SCP хориоидного сплетения овцы (Bolin et al., 1994, J. Virol. Methods 48: 211-221), клетки G355-5, клетки PG-4 нормальных астроцитов кота (Haapala et al., 1985, J. Virol. 53: 827-833), клетки Mpf головного мозга хорька (Trowbridge et al., 1982, In Vitro 18: 952-960) и линии нормальных клеток, таких как, например, клетки CTX TNA2 нормальной коры головного мозга крысы (Radany

35 et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6467-6471), такие как, например, клетки CRL7030 и Hs578Bst. Более того, различные системы экспрессии вектор/хозяин могут в различной степени влиять на реакции процессинга.

[00204] Для длительной высокопродуктивной наработки рекомбинантных белков часто предпочтительна стабильная экспрессия. Например, можно сконструировать 40 линии клеток, стабильно экспрессирующие полипептид согласно настоящему изобретению (например, антитело или слитый белок). Вместо применения векторов экспрессии, содержащих вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева можно трансформировать ДНК, контролируемой соответствующими контрольными элементами экспрессии (например, последовательностями промотора, энхансера,

45 терминаторов транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.), и селектируемым маркером. После введения чужеродной ДНК сконструированным клеткам позволяют расти в течение 1-2 дней на обогащенной среде, а затем переносят на селективную среду. Селектируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает резистентность к селекции

и позволяет клеткам стабильно встраивать плазмиду в хромосомы и расти с образованием колоний, которые, в свою очередь, можно клонировать и развивать в линии клеток.

[00205] Можно применять множество систем селекции, включая, но не ограничиваясь

ими, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al., 1977, Cell 11:223), гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026) и аденин фосфорибозилтрансферазы (Lowy et al., 1980, Cell 22: 817), которые можно применять в клетках tk-, hgprt- или aprt-, соответственно. Также резистентность к антиметаболитам можно применять как основу для селекции по гену dhfr, придающему резистентность к метотрексату (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); гену gpt, придающему резистентность к миокофеноловой кислоте (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); гену neo, придающему резистентность к аминогликозиду G-418 (Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); и гену hygro, придающему резистентность к гигромицину (Santerre et al., 1984, Gene 30:147).

[00206] Способы получения конъюгатов антитело-лекарственный препарат известны в данной области техники, и описание таких способов можно найти в публикации патента США №2011/0200596.

5.2 Очистка гетеромультимеров

[00207] При применении рекомбинантных методик гетеромультимеры могут быть получены внутри клеток или могут секретироваться непосредственно в среду. Если гетеромультимер получают внутриклеточно, на первом этапе дисперсный дебрис клеток-хозяев или лизированных фрагментов удаляют, например, посредством центрифугирования или ультрафильтрации. Если гетеромультимер секретируется в среду, супернатанты от таких систем экспрессии, как правило, сначала концентрируют с применением коммерчески доступных фильтров для концентрирования белка, например, устройства для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. На любом из последующих этапов можно добавить ингибитор протеазы, такой как ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид) для ингибирования протеолиза, а также антибиотики для предотвращения образования посторонних загрязняющих веществ.

[00208] Композицию гетеромультимеров, полученную из клеток, можно очистить с применением, например, хроматографии с гидроксиапатитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является предпочтительной методикой очистки. Пригодность белка A для применения в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа любой Fc-области иммуноглобулина, которая присутствует в гетеромультимере. Белок A можно применять для очистки антител на основе тяжелых цепей γ1, γ2 или γ4 человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуют применять для всех изотипов мыши и для γ3 человека (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). Матрица, к которой присоединяют аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стирендивинил)бензен, позволяют использовать большие скорости потока и более короткие времена обработки по сравнению со скоростью потока и временем обработки, которые можно использовать с применением агарозы.

Если гетеромультимеры содержат CH3-домен, для очистки используют смолу Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Также доступны другие методики очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на оксиде кремния, хроматография на

Непарин-SEPHAROSE™, хроматография на анион- или катион-обменной смоле (такой как колонка с полиаспаргиновой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ и осаждение сульфатом аммония, в зависимости от гетеромультиглобулина, который необходимо выделить.

5 [00209] После проведения любого этапа (этапов) предварительной очистки смесь, содержащую гетеромультиглобулин, представляющий интерес, а также загрязняющие вещества, можно разделить методом хроматографии на основе гидрофобного взаимодействия с низким pH с применением элюирующего буфера с pH в диапазоне приблизительно 2,5-4,5, которую предпочтительно проводят при низких концентрациях 10 соли (например, от приблизительно 0-0,25 M соли).

[00210] Гетеромультиглобулины согласно настоящему изобретению содержат асимметричные модификации аминокислот в первом и втором полипептидах Fc конструкции Fc IgG. Соответственно, вследствие присущих полипептидам Fc свойств, когда полипептиды Fc экспрессируются вместе, полученные в результате продукты 15 будут включать гомодимеры первого полипептида Fc, гомодимеры второго полипептида Fc и гетеродимеры первого и второго полипептидов.

[00211] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения после экспрессии гетеромультиглобулины очищают или выделяют. Способы экспрессии описаны в других разделах настоящей заявки. Белки можно выделить или очистить множеством 20 способов, известных специалистам в данной области техники. Стандартные способы очистки включают методики хроматографии, в том числе ионообменную хроматографию, хроматографию на основе гидрофобного взаимодействия, аффинную хроматографию, хроматографию с разделением на основе размеров молекул, или гель-фильтрацию, и обращенно-фазовую хроматографию, которую проводят при 25 атмосферном давлении или при высоком давлении с применением систем, таких как ЖХБР (жидкостная хроматография быстрого разрешения) и ВЭЖХ. Способы очистки также включают методики электрофореза, иммунологические методики, методики осаждения, диализа и хроматофокусирования. Также пригодны методики ультрафильтрации и диафильтрации в сочетании с концентрированием белка. Как 30 хорошо известно в данной области техники, множество природных белков связываются с Fc и антителами, и данные белки могут найти применение в настоящем изобретении для очистки гетеромультиглобулинов. Например, бактериальные белки A и G связываются с Fc-областью. Аналогично, бактериальный белок L связывается с областью Fab некоторых антител, что, безусловно, свойственно антигену-мишени антитела. Часто 35 очистку можно провести с помощью конкретного партнера по слиянию. Например, антитела можно очистить с применением смолы глутатиона, если применяют слияние с GST, Ni+2-аффинной хроматографии, если применяют His-метку, или с применением иммобилизованного антитела против flag, если применяют метку flag. Общие указания относительно подходящих методик очистки, см., например, в руководстве Protein 40 Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994, включенном в настоящую заявку во всей своей полноте посредством ссылки. Необходимая степень очистки варьирует в зависимости от варианта выделения или применения антител. В некоторых случаях необходимость в какой-либо очистке отсутствует. Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, если антитела 45 секрециируются, выделение можно проводить непосредственно из среды. Как хорошо известно в данной области техники, некоторые способы селекции не включают очистку белков. Таким образом, например, если библиотеку антител получают в библиотеке фагового дисплея, очистку белка можно не проводить.

[00212] Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимеры содержат конструкцию Fc IgG, и, если экспрессия указанной конструкции Fc IgG приводит к образованию смеси конструкций Fc IgG с гомодимерными Fc-областями и конструкций Fc IgG с гетеродимерными Fc-областями, 5 конструкции Fc IgG с гомодимерными Fc-областями четко отделяют от конструкций Fc IgG с гетеродимерными Fc-областями с применением способов очистки на основе заряда, таких как, например ионообменная хроматография.

[00213] Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимеры, содержащие конструкцию Fc IgG, описанную в настоящей заявке, 10 могут также содержать вариант CH3-области, содержащий модификации аминокислот, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc-области скорее, чем образованию гомодимерной Fc-области. Экспрессия данных гетеромультимеров может привести к образованию смеси гетеромультимеров, содержащих гомодимерные Fc-области и гетеродимерные Fc-области. Такие смеси также можно разделить с 15 применением способов очистки на основе заряда, как указано выше. Иллюстративные варианты, которые можно очистить таким способом, включают AAC3, AAC4 и AAC5.

6. Исследование гетеромультимеров

6.1 Связывание с Fc γ R, FcRn и C1q

[00214] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения для

20 того, чтобы убедиться, что сохраняются исключительно желаемые свойства, анализируют активности полученного иммуноглобулина, опосредованные Fc. Для подтверждения уменьшения/истощения активностей CDC и/или ADCC можно провести анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo*. Способы оценки эффекторной функции описаны в публикации Jiang et al. (2011) *Nature Reviews Drug Discovery* 10:101-111.

25 Например, можно провести анализы связывания с Fc-рецептором (FcR), чтобы убедиться, что связывание гетеромультимера с Fc γ R отсутствует (вследствие этого, вероятно, отсутствует активность ADCC), но сохраняется способность к связыванию с FcRn. Среди первичных клеток, опосредующих ADCC, клетки NK экспрессируют исключительно Fc γ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII.

30 Данные об экспрессии FcR на гематопоэтических клетках обобщены в таблице 3 на странице 464 публикации Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Пример анализа *in vitro* для оценки активности ADCC молекулы, представляющей интерес, описан в патентах США №5,500,362 или 5,821,337. Эффекторные клетки, пригодные для таких анализов, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК)

35 и клетки естественные киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнительно, активность ADCC молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, на модели на животных, например, такой, которая описана в публикации Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998). Анализы связывания с C1q можно также провести для подтверждения того, что гетеромультимер не способен связываться с C1q, и в следствие

40 этого у него отсутствует активность CDC. Для оценки активации комплемента можно провести анализ CDC, например, как описано в публикации Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). Анализ связывания с FcRn и определение клиренса/периода полужизни *in vivo* можно также провести с применением способов, известных в данной области техники.

45 [00215] Связывание с Fc γ R и C1q также можно измерить методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) или способами на основе ELISA. Связывание с Fc γ R также можно измерять методом FACS (fluorescence activated cell sorting, сортировка флуоресцентно-активированных клеток). Коммерчески доступные методы анализа

также можно использовать для измерения способности гетеромультимеров к связыванию с FcγR или C1q.

6.2 Стабильность

[00216] Температурную стабильность гетеромультимеров можно определить согласно

способам, известным в данной области техники. Температура плавления конструкции Fc IgG свидетельствует о температурной стабильности последней. Температуру плавления конструкции Fc IgG можно измерять с применением методик, таких как дифференциальная сканирующая калориметрия (Chen et al (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) Immunol Lett 68:47-52). В качестве альтернативы, температурную стабильность конструкции Fc IgG можно измерять с применением метода кругового дихроизма (Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9).

[00217] Методология определения Tm родительского CH2-домена хорошо описана в данной области техники (см., например, публикацию Ionescu et al (2008) J Pharm Sci 97 (4):1414-26). Вкратце, плавление Fc-области IgG1 вызывает два перехода: один соответствует плавлению CH2-домена, а второй соответствует плавлению CH3-домена. Данные переходы не зависят от присутствия Fab, но могут маскироваться переходом Fab. Как правило, плавление Fc IgG1 образует переход с Tm, составляющей 71°C, для CH2-домена, и переход с Tm, составляющей 82°C, для CH3-домена. На Tm CH2-домена влияет состояние гликозилирования последнего, природа шарнирной области и внутренняя стабильность CH3-домена. Известно, что агликазилирование и дегликозилирование уменьшают Tm CH2-домена на 10°C. Также известно, что удаление дисульфидов шарнирной области уменьшает Tm CH2-домена более чем на 10°C. Изменения в CH3-домене, которые делают стабильность последнего ниже стабильности CH2-домена, вероятно, вызывают изменения в Tm CH2-домена, но данный эффект сложнее предсказать.

7. Фармацевтические композиции

[00218] В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие гетеромультимеры согласно настоящему изобретению. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество гетеромультимера и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регуляторным органом федеральной власти или власти штата, или приведенный в фармакопее США или в другой общепризнанной фармакопее в качестве вещества для применения у животных и, более конкретно, у человека. Термин «носитель» относится к разбавителю, вспомогательному средству, вспомогательному веществу или наполнителю, вместе с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе масла, полученные из бензина, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и подобные масла. Вода является предпочтительным носителем, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерола также можно применять в качестве жидких носителей, в особенности для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, гель оксида кремния, стеарат натрия, глицеролмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерол, пропилен, гликоль, воду, этанол и подобные вещества. Композиция, при необходимости, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих

средств, или буферных средств для поддержания рН. Данные композиции могут иметь форму растворов, суппозитория, эмульсии, таблеток, пиллюль, капсул, порошков, препаратов с замедленным высвобождением и подобные формы. Композиция может быть приготовлена в состав в виде суппозитория с традиционными связывающими веществами

- 5 и носителями, такими как триглицериды. Состав для перорального введения может включать стандартные носители, такие как маннитол, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д. фармацевтической чистоты. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в руководстве "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin. Такие композиции содержат терапевтически
- 10 эффективное количество соединения, предпочтительно, в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя для получения формы для соответствующего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения.

[00219] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения композиция, содержащая гетеромультимер, приготовлена в состав согласно

- 15 общепринятым процедурам в виде фармацевтической композиции, приспособленной для внутривенного введения человеку. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости, композиция может также содержать солюбилизирующее средство и анестезирующее средство местного действия, такое как лигнокайн, чтобы облегчить
- 20 боль в месте инъекции. Как правило, компоненты доставляют по отдельности или смешивают вместе в единичной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или не содержащего воду концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, на котором указано количество активного компонента. Если композицию будут вводить посредством инфузии, ее
- 25 можно разливать в бутылку для инфузий, содержащую стерильную воду или солевой раствор фармацевтического качества. Если композицию будут вводить посредством инъекции, можно предоставить ампулу со стерильной водой для инъекции или солевым раствором, так что компоненты могут быть смешаны перед введением.

[00220] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения

- 30 композиции, описанные в настоящей заявке, приготовлены в состав в виде нейтральной формы или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как анионы, полученные из хлористоводородной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные с катионами, такими как катионы, полученные из натрия, калия, аммиака, кальция, изопропиламина гидроксида железа, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

[00221] Количество композиции, описанной в настоящей заявке, которое будет эффективным при лечении, ингибировании и предотвращении заболевания или нарушения, связанного с нарушением экспрессии и/или активности терапевтического

- 40 белка, можно определить с помощью стандартных клинических методик. Кроме того, для определения оптимальных диапазонов доз можно необязательно применять анализы *in vitro*. Точная доза для применения в составе также зависит от пути введения и тяжести заболевания или нарушения, и должна быть определена в соответствии с мнением практикующих врачей и исходя из состояния каждого пациента. Эффективные дозы
- 45 экстраполируют из кривых доза-ответ, полученных *in vitro* или в системах исследования на моделях на животных.

8. Способы лечения/применения

[00222] Гетеромультимеры, полученные посредством любого из вышеописанных

способов, можно применять для диагностики, лечения, обнаружения или модулирования заболеваний человека или конкретных патологий клеток, тканей, органов, жидкостей или, в общем смысле, хозяина. Как сообщается в настоящей заявке, модификации Fc-области антитела, белка, слитого с Fc, или Fc-фрагмента для уменьшения или устранения

5 связывания с рецептором Fc-гамма и указанных эфекторных функций, при которых гетеромультимер сохраняет исходные свойства направленного воздействия, позволяют получить антитела и конструкции Fc IgG с превосходящим спектром активностей, биофизических свойств, стабильностью и способностью длительно удерживаться в организме хозяина.

10 [00223] Заболевания или патологии, которые могут поддаваться лечению с применением композиции, предложенной в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими: неврологические расстройства, такие как, но не ограничиваясь ими, болезнь Альцгеймера, включая невропатическую боль; дерматологическое заболевание; метаболические заболевания; остеоартрит; и состояния, являющиеся 15 результатом ожогов или травмы; сердечно-сосудистые нарушения, включая, но не ограничиваясь ими, инфаркт миокарда, застойную сердечную недостаточность, инсульт, ишемический инсульт и кровотечение; а также общие иммуноопосредованные нарушения, в том числе ревматическую болезнь, псориаз и склеродерму.

[00224] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения 20 гетеромультимеры согласно настоящему изобретению применяют для лечения заболеваний, при которых антитела применяют для нацеливания на молекулы поверхности клетки, когда исчерпание данных молекул, которое является следствием опосредованной Fc γ R эфекторной функции, оказывает побочные эффекты.

[00225] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения 25 гетеромультимеры согласно настоящему изобретению применяют для улучшения индекса безопасности антител, образующих иммунные комплексы со своими мишениями.

[00226] В публикации Strohl, WR and Strohl LM, "Antibody Fc engineering for optimal antibody performance" In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge: Woodhead Publishing (2012), pp 225-249 приведено описание преимуществ применения антител, лишенных 30 Fc γ R- и комплемент-опосредованных эфекторных функций, для лечения заболевания. Предполагают, что гетеромультимеры, содержащие конструкции Fc IgG согласно настоящему изобретению, пригодны для получения антител, лишенных Fc γ R- и комплемент-опосредованных эфекторных функций, для лечения заболевания.

9. Наборы

35 [00227] В настоящем изобретении дополнительно предложены наборы, содержащие один или более гетеромультимеров. Отдельные компоненты набора будут упакованы в отдельные контейнеры, и к такими контейнерам может быть присоединено указание в форме, установленной государственным органом, регулирующим производство, применения или продажу фармацевтических или биологических препаратов, причем 40 данное указание отражает одобрение указанным органом производства, применения или продажи. Набор может необязательно содержать инструкции или указания, описывающие способ применения или режим введения пар гетеродимеров.

[00228] Если один или более компонентов набора предложены в виде растворов, например, в виде водного раствора или стерильного водного раствора, аппарат 45 контейнера сам по себе может представлять собой ингалятор, шприц, пипетку, капельницу или другие подобные аппараты, из которых раствор можно вводить субъекту или применять вместе и смешивать с другими компонентами набора.

[00229] Компоненты набора могут также быть предложены в высушенней или

лиофилизованной форме, и набор может дополнительно содержать подходящий растворитель для восстановления лиофилизированных компонентов. Вне зависимости от количества или типа контейнеров наборы согласно настоящему изобретению также могут содержать инструмент для способствования введению композиции пациенту.

- 5 Такой инструмент может представлять собой ингалятор, устройство для назального введения спрея, шприц, пипетку, зажим, измерительную ложку, капельницу или аналогичные средства доставки, одобренные в медицине.

- [00230] Следует понимать, что примеры и варианты реализации, описанные в настоящей заявке, приведены исключительно с целью иллюстрации, и что различные модификации или изменения данных примеров и вариантов могут быть предложены специалистами в данной области техники и будут относиться к духу и границам настоящей заявки, и буду включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

- Ниже приведены примеры для иллюстрации применения настоящего изобретения на практике. Данные примеры не призваны ограничить или определить полный объем настоящего изобретения.

Пример 1: Получение и экспрессия конструкций антитела (гетеромультимеров)

- Были получены следующие конструкции антитела. Все конструкции антитела были созданы на основе последовательности антитела против Her2 дикого типа - трастузумаба (см. фигуру 5, SEQ ID NO: 2 - аминокислотная последовательность тяжелой цепи трастузумаба дикого типа, SEQ ID NO: 3 - аминокислотная последовательность легкой цепи трастузумаба дикого типа) со следующими модификациями, добавленными в CH3-домен тяжелой цепи, которые были введены для способствования образованию гетеродимера Fc-домена с увеличенной стабильностью по сравнению с доменом CH3, не содержащим мутаций аминокислот.

Цепь А: T350V/L351Y/S400E/F405A/Y407V и

Цепь В: T350V/T366L/N390R/K392M/T394W

[00231] Данную конструкцию с вышеуказанными модификациями обозначают v791.

- Все последовательности, описанные в настоящей заявке, пронумерованы с применением системы нумерации EU.

- [00232] На основе v791 были сконструированы дополнительные варианты с модификациями аминокислот в шарнирной области и/или CH2-домене тяжелой цепи, как показано в таблице A1. Все варианты содержали последовательность легкой цепи трастузумаба, которая приведена в SEQ ID NO: 67 (аминокислоты) и/или SEQ ID NO: 34 (ДНК).

Таблица A1: Асимметричные конструкции антитела на основе трастузумаба

Вариант	Тяжелая цепь А	SEQ ID No.: (аминокислоты/ДНК)	Тяжелая цепь В	SEQ ID No.: (аминокислоты/ДНК)
5 1051/контроль	L234A/L235A	6/7	L234A/L235A	8/9
10 AAC1	L234A/L235A	6/7	--	20/21
AAC2	L234A/L235A	6/7	L234K/L235K	22/23
AAC3	L234D/L235E	10/11	L234K/L235K	22/23
15 AAC4	E233A/L234D/L235E	12/13	E233A/L234R/L235R	24/25
AAC5	L234D/L235E	10/11	E233K/L234R/L235R	26/27
AAC6	E233A/L234K/L235A	14/15	E233K/L234A/L235K	28/29
AAC7	E269Q/D270N	16/17	E269K/D270R	30/31
AAC8	--	18/19	L235K/A327K	32/33

1051 представляет собой контрольный вариант, описанный в публикации Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 20:685-691.

20 AAC1 представляет собой другой контрольный вариант, который является асимметричной версией 1051, в которой только одна из тяжелых цепей содержит двойную мутацию L234/L235.

AAC2-AAC8 представляют собой асимметричные конструкции.

25 [00233] Антитела и контроли клонировали и экспрессировали следующим образом. v791 получали путем сайт-направленного мутагенеза с применением стандартных способов. Итоговую ДНК субклонировали в вектор pTT5 (см. международную публикацию патента № WO 2009/137911). Экспрессию проводили в 2 мл, или 50 мл, или 500 мл клеток СНО ЗЕ7. Клетки СНО трансфицировали в экспоненциальной фазе роста (1,5-2 миллиона клеток/мл) полиэтиленимином молекулярной массой 25 кДа в 30 концентрации 1 мг/мл (ПЭИ, Polysciences) при соотношении ПЭИ : ДНК 2,5:1. (Raymond C. et al. A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. Methods. 55(1):44-51 (2011)). Для определения оптимального диапазона концентрации для образования гетеродимеров ДНК трансфицировали в оптимальных соотношениях ДНК тяжелой цепи А (HC-A), легкой цепи (LC) и тяжелой 35 цепи В, позволяющих образование гетеродимера (например, соотношение HC-A/HC-B/ LC = 25:25:50%). Трансфицированные клетки собирали через 5-6 дней вместе с культуральной средой, собранной после центрифугирования при 4000 об./мин., и очищали с применением фильтра с диаметром пор 0,45 мкм.

40 [00234] Протоколы очистки: Очищенную культуральную среду наносили на колонку MabSelect SuRe (GE Healthcare) с белком А и промывали 10 объемами колонки буфера ФБР, pH 7,2. Антитело элюировали 10 объемами колонки цитратного буфера, pH 3,6, и получали смешанные фракции, содержащие антитело, нейтрализованное TRIS, pH 11. Антитело, очищенное с помощью белка А, затем очищали методом гель-фильтрации (ЭХ, эксклюзационная хроматография). Для проведения анализа методом гель-фильтрации 45 3,5 мг смеси антитела концентрировали до объема 1,5 мл, наносили на колонку Sephadex 200 HiLoad 16/600 200 pg (GE Healthcare) и анализировали с применением системы ЖХБР AKTA Express FPLC при скорости потока 1 мг/мин. Буфер ФБР, pH 7,4 использовали при скорости потока 1 мл/мин. Фракции, соответствующие очищенному антителу,

собирали, концентрировали до концентрации ~1 мг/мл и хранили при температуре -80°C.

[00235]

В таблице А2 обобщены выходы экспрессии для различных образцов.

5

Вариант	Экспрессия в 50 мл, белок А, выход [мг/л]	Экспрессия в 50 мл, ЭХ, выход [мг/л]	Экспрессия в 500 мл, белок А, выход [мг/л]	Экспрессия в 500 мл, ЭХ, выход [мг/л]
ДТ	30	н/о*	н/о	н/о
1051/контроль	48	20	48	23
AAC1	н/о	н/о	н/о	н/о
AAC2	63	24	н/о	н/о
AAC3	39	20	н/о	н/о
AAC4	42	26	н/о	н/о
AAC5	44	16	н/о	н/о
AAC6	31	13	15	10
AAC7	н/о	н/о	н/о	н/о
AAC8	н/о	н/о	н/о	н/о

25

*н/о = не определено

[00236] Большинство образцов продемонстрировали уровни экспрессии, аналогичные ДТ или контролю.

30

Пример 2: Асимметричные конструкции антитела на основе трастузумаба не связываются с Fc γ R

35

[00237] Способность асимметричных конструкций антитела к связыванию с Fc γ RIIaH, Fc γ RIIaR, Fc γ RIIb Fc γ RIIIaF, Fc γ RIIIaV и Fc γ RIa оценивали методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

40

[00238] Аффинность Fc γ R в отношении Fc антитела измеряли методом ППР с помощью системы ProteOn XPR36 при температуре 25°C с применением 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3,4 мМ EDTA и 0,05% Tween 20, pH 7,4. Рекомбинантный HER-2 захватывали на активированном сенсорном датчике GLM посредством инъектирования 4,0 мкг/мл в 10 мМ NaOAc (pH 4,5) со скоростью 25 мкМ/мин. до тех пор, пока было иммобилизовано приблизительно 3000 резонансных единиц (RU), после чего проводили гашение оставшихся активных групп. 40 мкг/мл очищенных антител на основе HER-2/neu опосредованно захватывали при инъектировании со скоростью 25 мкл/мин. в течение 240 с (что приводило к захвату приблизительно 500 RU), с последующей инъекцией буфера для получения стабильной базовой линии. Fc γ R инъектировали со скоростью 60 мкл/мин. в течение 120 с с фазой диссоциации 180 с для получения набора сенсограмм связывания. Полученные в результате значения k_D определяли на основании изотерм связывания с применением модели Equilibrium Fit с приведенными значениями, которые являются средними двух или трех независимых анализов.

45

[00239] Соотношение Ка связывания *in vitro*, которое определяли методом ППР, для каждого варианта относительно ДТ представлено в таблице В.

Таблица В: Соотношения K_a связывания с рецепторами Fc γ , которое определяли методом ППР, относительно трастузумаба дикого типа

Вариант	2aH ¹	2aR ²	2b ³	3aF ⁴	3aV ⁵	1a ⁶
ДТ	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
контроль/105						
1	0,06	0,18	0,52	0,29	0,10	0,01
AAC1	н/о*	н/о	н/о	0,87	0,71	0,48
AAC2	ОС	ОС	ОС	НИЗКОЕ	НИЗКОЕ	НИЗКОЕ
AAC3	ОС	ОС	ОС	НИЗКОЕ	НИЗКОЕ	НИЗКОЕ
AAC4	ОС	ОС	ОС	НИЗКОЕ	НИЗКОЕ	НИЗКОЕ
AAC5	ОС	ОС	ОС	НИЗКОЕ	НИЗКОЕ	НИЗКОЕ
AAC6	ОС	ОС	ОС	ОС	НИЗКОЕ	НИЗКОЕ
AAC7	н/о	н/о	н/о	НИЗКОЕ	НИЗКОЕ	0,15
AAC8	н/о	н/о	н/о	0,19	0,10	0,13

*н/о = не определено

1. Kd 2ah составила 0,48 мкМ. Рецептор анализировали в концентрации 10 мкМ. НИЗКОЕ означает, что $K_d >> 10$ мкМ, ОС означает $K_d >> 100$ мкМ, где $>>$ означает «намного больше».

2. Kd 2ar составила 0,87 мкМ. Рецептор анализировали в концентрации 10 мкМ. НИЗКОЕ означает, что $K_d >> 10$ мкМ, ОС означает $K_d >> 100$ мкМ.

3. Kd 2b составила 3,4 мкМ. Рецептор анализировали в концентрации 10 мкМ. НИЗКОЕ означает, что $K_d >> 10$ мкМ, ОС означает $K_d >> 100$ мкМ.

4. Kd 3af составила 1,9 мкМ. Рецептор анализировали в концентрации 6 мкМ.

НИЗКОЕ означает, что $K_d >> 6$ мкМ, ОС означает $K_d >> 60$ мкМ.

5. Kd 3av составила 0,60 мкМ. Рецептор анализировали в концентрации 6 мкМ. НИЗКОЕ означает, что $K_d >> 6$ мкМ, ОС означает $K_d >> 60$ мкМ.

6. Kd 1a составила 0,65 нМ. Рецептор анализировали в концентрации 30 нМ. НИЗКОЕ означает, что $K_d >> 30$ нМ, ОС означает $K_d >> 300$ нМ.

[00240] Все варианты продемонстрировали значительно меньшее связывание со всеми рецепторами. В большинстве случаев связывание было необнаруживаемым или не поддавалось количественному определению вследствие низкой аффинности.

Пример 3: Асимметричные конструкции антитела на основе трастузумаба не связываются с C1q

[00241] Способность асимметричных конструкций антитела к связыванию с C1q исследовали следующим образом. C1q человека заказывали в GenWay Biotech (San Diego, CA). Антитела для иммобилизации на датчик для ППР были такими, как описано в примере 2. 30 нМ C1q инъектировали над вариантами MAT, захваченными на поверхность ППР с HER2, с применением стандартных протоколов, которые также описаны в примере 2. Результаты представлены в таблице С ниже.

Таблица С: Результаты анализа связывания с C1q

Вариант	C1q ¹
ДТ	да
Контроль/1051	ОС
AAC1	частичное
AAC2	ОС
AAC3	ОС
AAC4	ОС
AAC5	ОС
AAC6	ОС
AAC7	ОС
AAC8	ОС

15 1. C1q представляет собой гексамер гетеротримеров с потенциальной стехиометрией МАТ : C1q, составляющей 6:1. Кинетика связывания была очень сложной, и соответствующую Kd невозможно было определить. Рецептор исследовали в концентрации 30 нМ. «Частичное» означает уменьшенное связывание, «ОС» означает отсутствие обнаруживаемого связывания

20 [00242] Все варианты продемонстрировали необнаруживаемое связывание с C1q, за исключением AAC1, который продемонстрировал уменьшенное, но обнаруживаемое связывание с C1q.

Пример 4: Асимметричные конструкции антитела на основе трастузумаба связываются с FcRn

25 [00243] Способность асимметричных антител к связыванию с FcRn исследовали методом ППР следующим образом.

[00244] Захватывающую поверхность датчика для ППР получали с применением поликлональных антител козы против IgG человека. Варианты захватывали из супернатантов в вертикальном направлении. Поток FcRn в максимальной концентрации 1 мкМ с 3-кратными серийными разведениями пропускали в горизонтальном направлении. В двукратных анализах при pH 6 были получены аналогичные результаты. Однократный анализ при pH 7,4 проводили для проверки отсутствия связывания. Результаты представлены в таблице D ниже.

35

40

45

Таблица D: Связывание с FcRn

Вариант	FcRn ¹
ДТ	Да
Контроль/1051	Да
AAC1	н/о*
AAC2	Да
AAC3	Да
AAC4	Да
AAC5	Да
AAC6	Да
AAC7	н/о
AAC8	н/о

*н/о = не определено

1. Связывание с FcRn измеряли при pH 6,5 и 7,4. Варианты со связыванием ДТ при pH 6,5 и отсутствием обнаруживаемого связывания при pH 7,4 обозначены «Да»

Пример 5: Асимметричные конструкции антитела являются термостабильными

[00245] Температурную стабильность CH2-доменов асимметричных конструкций антитела определяли с применением дифференциальной сканирующей калориметрии следующим образом. Каждую конструкцию антитела очищали, как описано в примере 1, разводили до концентрации 0,2 мг/мл в ФБР, и 400 мкл полученного раствора использовали для анализа ДСК с помощью системы VP-Capillary DSC (GE Healthcare).

[00246] В начале каждого анализа ДСК пять холостых инъекций буфера проводили для стабилизации базовой линии, и инъекцию буфера проводили перед инъекцией каждой конструкции антитела в качестве сравнения. Каждый образец сканировали в диапазоне от 20 до 100°C со скоростью 60°C/ч, в режиме с низкой обратной связью, с фильтрацией в течение 8 сек., в режиме preTstat в течение 5 мин. и при давлении азота 70 пси.

[00247] Полученные в результате термограммы преобразовывали в таблицы и анализировали с применением программного обеспечения Origin 7.

[00248] Температурные кривые разворачивания исследованных гетеродимеров представлены на фигуре 2. Температуры плавления исследованных гетеродимеров представлены в таблице Е ниже.

[00249]

Таблица Е: Температурная стабильность гетеромультимеров

Вариант	Начало Тм (ДТ ~66,5С) ¹	Тм (ДТ ~71,0С) ²
Контроль/1051	66,5	71,8
AAC1	н/о	н/о*
AAC2	70,5	74
AAC3	65,8	71,5
AAC4	66,7	72,8
AAC5	67,0	72,9
AAC6	68,7	75,0
AAC7	н/о	н/о
AAC8	н/о	н/о

*н/о = не определено

1. Начало Тм определяли визуально как первую точку, в которой термограмма на фигуре 2 значительно поднималась над базовой линией.

2. Тм измеряли посредством деконволюции с применением недвухуровневой модели первого перехода на термограммах, представленных на фигуре 2.

[00248] Данные результаты свидетельствуют, что множество конструкций обладают большим началом Тм и Тм CH2-домена по сравнению с контрольным ДТ.

Пример 6: Очистка асимметричных конструкций антитела на основе трастузумаба [00249] Избранные асимметричные конструкции антитела экспрессировали и очищали методом СВЭЖХ ИОХ (сверхэффективная жидкостная хроматография - ионообменная хроматография) следующим образом.

[00250] Цепь А и Цепь В вариантов 791 (гетеродимер ДТ), AAC3 (L234D/L235E[Цепь А]Л234K/L235K[Цепь В]) и AAC5 (L234D/L235E[Цепь А]ЛЕ233K/L234K/L235K[Цепь В]) экспрессировали в соотношениях 1:0 (А), 1:1 (С) и 0:1 (Е) в культурах СНО объемом 50 мл. Соотношения А и Е позволили получить гомодимеры Цепи А и Цепи В, соответственно. Все образцы очищали методом на основе белка А, а затем методом

эксклюзационной хроматографии (ЭХ) с применением колонки Superdex 200 16/600 в буфере ФБР перед анализом образцов методом СВЭЖХ ИОХ. Анализ методом СВЭЖХ ИОХ проводили в следующих условиях (градиент pH): Растворители: А, 0,1 М NaH₂PO₄, pH 4,44; В, 0,1 М Na₂HPO₄, pH 9,20; С, вода MilliQ; D, 0,5 М Ацетат Na, pH 9,13 (кат.

№03-Dec-12). Исходный буфер: 18% А, 2% В, 68% С, 12% D=20 mM NaPO₄, 60 mM Ацетат

Na, pH~5,9; Градиент: до 2% А, 18% В, 68% С, 12% D=20 mM NaPO₄, 60 mM Ацетат Na, pH~7,9 в 7,2 объемах колонки. Скорость потока: 0,3 мл/мин. Температура: 30°C. Давление: ~4200 пси. Колонка: Agilent BioMAb, 4,6×50 мм, частицы 1,7 мкм, SN USDJA01061.

[00251] Результаты представлены на фигуре 3А. Подписаны графики для соотношений А, С и Е, которые соответствуют гомодимерам или гетеродимерам. Повторные анализы, в случае их проведения, также показаны.

[00252] На фигуре 3А показано, что введение асимметричных зарядов в нижнюю шарнирную область приводит к получению конструкции, которая не только обладает меньшим связыванием с рецептором (пример 3) и большей температурной стабильностью (пример 5), но также может быть очищена от примесей гомодимера методом ионообменной хроматографии.

[00253] Разделение одного варианта, AAC4, исследовали в двух условиях. Образец элюировали при градиенте pH, как описано выше, или при градиенте соли следующим

образом: Растворители: А 0,1 М NaH₂PO₄, pH 4,44; В 0,1 М Na₂HPO₄, pH 9,20; С вода MilliQ; D 0,5 М NaCl. Исходный буфер: 18% А, 2% В, 68% С, 12% D=20 мМ NaPO₄, 60 мМ NaCl, pH~5,9. Градиент соли до 18% А, 2% В, 0% С, 80% D (=20 мМ NaPO₄, 400 мМ NaCl, pH~5,9) в 7,2 объемах колонки.

⁵ [00254] Результаты представлены на фигуре 3В. Фигура демонстрирует, что разделение гомодимеров и гетеродимеров с помощью градиента соли было аналогичным разделению при градиенте pH.

¹⁰ Пример 7: Асимметричные конструкции антитела на основе трастузумаба не стимулируют ADCC (антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность) на клетках SK-BR-3

¹⁵ [00255] Исследовали способность иллюстративного варианта стимулировать ADCC на клетках SK-BR-3 для оценки того, вызывает ли отсутствие измеряемого связывания с Fc_γR неспособность опосредовать эффекторную функцию, которую измеряли посредством определения ADCC. Клетки SK-BR-3 экспрессируют на своей поверхности HER2 и вследствие этого связываются с трастузумабом, что позволяет клеткам NK в присутствии трастузумаба опосредовать ADCC. Активность AA6 в данном анализе сравнивали с активностью контрольного варианта, представленной в таблице А, и с активностью положительного контроля - трастузумаба.

²⁰ [00256] Используемые линии клеток: линия клеток SK-BR-3 (ATCC#HTB-30), NK92/ CD16a(158V/V)

Устройство для обнаружения: FlexStation3, Molecular Devices.

Антитело положительного контроля: Herceptin™ (Трастузумаб).

²⁵ [00257] Культура клеток. Замороженные клетки оттаивали посредством аккуратного вращения виалы на водяной бане при температуре 37°C. Через 1-2 мин. среда в виале полностью растяла. Виалу снаружи протирали 70% этианолом. Затем суспензию клеток переносили в центрифужную пробирку объемом 15 мл, после чего добавляли 5 мл предварительно нагретой полной среды. После центрифугирования в течение 3-5 мин. при 500 g супернатант отсасывали. Добавляли 10 мл полной среды, и клетки ресуспендировали посредством многократного пипетирования вверх и вниз.

³⁰ Жизнеспособность клеток определяли с помощью окрашивания трипановым синим. Затем суспензию клеток высевали на культуральные матрасы. Клетки инкубировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение ночи.

³⁵ [00258] Клетки поддерживали при условиях 37°C/5% CO₂ и регулярно субкультивировали в подходящей среде с добавлением 10% ЭБС (эмбриональной бычьей сыворотки) согласно протоколу ATCC.

⁴⁰ [00259] Образец антитела и стандарта доставляли в сухой транспортной таре и хранили при температуре -20°C до проведения исследования. Образец и стандарт после оттаивания на льду хранили при температуре 4°C. Образец и стандарт разводили средой MEM, не содержащей феноловый красный (с добавлением 1% ЭБС и 1% Pen/Strep), и применяли для проведения анализов.

[00260] Буфер для анализа ADCC состоял из 98% среды MEM, не содержащей феноловый красный, 1% Pen/Strep и 1% ЭБС.

[00261] Клетки NK92/Fc_γ3a(158V/V) поддерживали обычным путем.

⁴⁵ [00262] Клетки-мишени собирали посредством центрифугирования при 800 об./мин. в течение 3 мин., промывали средой для анализа один раз и центрифугировали; среду над осадком полностью удаляли. Клетки аккуратно суспендировали со средой для анализа для получения раствора отдельных клеток. Количество клеток-мишней корректировали для получения 4-кратного исходного раствора клеток (10000 клеток

в 50 мкл среды для анализа). Исследуемые соединения были получены в концентрациях, представляющих интерес. На 96-луночные планшеты для анализа высевали 50 мкл 4-кратного исходного раствора клеток-мишеней и добавляли 50 мкл 4-кратных разбавителей образца. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение

- 5 30 мин. в инкубаторе для культивирования клеток. Для запуска реакции добавляли 100 мкл эффекторных клеток (E/T=5:1, т.е. 50000 эффекторных клеток на лунку) и аккуратно перемешивали путем горизонтального встряхивания. К контролям клеток без эффекторных клеток добавляли Triton X-100 и антитело в конечной концентрации 1% для лизиса клеток-мишеней, полученная смесь выступала в качестве контроля
- 10 максимального лизиса; к контролям клеток без эффекторных клеток добавляли буферы для анализа и антитело, полученная смесь выступала в качестве контроля минимального высвобождения LDH. Клетки-мишени, которые инкубировали с эффекторными клетками без присутствия антител, использовали в качестве фонового контроля неспецифичного высвобождения LDH, когда обе клетки инкубировали вместе. Планшет инкубировали
- 15 в инкубаторе при условиях 37°C/5%CO₂ в течение 4-6 часов. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью набора LDH. Данные относительно поглощения при ОП (оптической плотности) 492 нм и ОП 650 нм получали на приборе Flexstation 3.

[00263] Данные при ОП 492 нм за вычетом фонового сигнала (ОП 650 нм) анализировали для изучения высвобождения LDH. Процент лизиса клеток рассчитывали

20 согласно формуле:

Лизис клеток % = 100*(1 - (ОПданные для образца - ОПпухолевые клетки плюс эффекторные клетки)/(ОПмаксимальное высвобождение - ОПминимальное высвобождение))

[00264] Результаты представлены на фигуре 4 и свидетельствуют, что в данном анализе иллюстративный гетеромультимер AA6 способен к подавлению активности ADCC.

Пример 8: Получение и экспрессия конструкций антитела на основе антитела против CD20 Ритуксимаба (гетеромультимеры)

[00265] Были получены следующие конструкции антитела. Все конструкции антитела

30 были получены на основе последовательности антитела против CD20 дикого типа - ритуксимаба (см. фигуру 5, SEQ ID NO: 4 - аминокислотная последовательность тяжелой цепи ритуксимаба дикого типа, SEQ ID NO: 5 - аминокислотная последовательность легкой цепи ритуксимаба дикого типа) со следующими модификациями, добавленными в CH3-домен тяжелой цепи, которые были введены для способствования образованию

35 гетеродимерного Fc-домена с увеличенной стабильностью по сравнению с доменом CH3, не содержащим мутаций аминокислот:

Цепь А: T350V/L351Y/F405A/Y407V и

Цепь В: T350V/T366L/K392L/T394W

[00266] Данную конструкцию с вышеуказанными мутациями обозначали v1261.

[00267] Дополнительные варианты были сконструированы на основе v1261 с

40 модификациями аминокислот в шарнирной области и/или CH2-домене тяжелой цепи, как показано в таблице F. Все варианты дополнительно содержали последовательность легкой цепи, которая приведена в SEQ ID NO: 68 (аминокислоты) и/или SEQ ID NO: 69 (ДНК).

[00268]

Таблица F: Асимметричные конструкции антитела на основе ритуксимаба

Вариант	Цепь А	SEQ ID No.: (аминокислоты/ДНК)	Цепь В	SEQ ID No.: (аминокислоты/ДНК)
Контроль, Ритуксимаб ДТ 1261	--	35/36	--	37/38
AAC9	L234D / L235E	39/40	E233K / L234R / L235R	41/42
AAC10	L234D / L235E+D265S	43/44	E233K / L234R / L235R+D265S	45/46
AAC11	L234D / L235E+E269K	47/48	E233K / L234R / L235R+E269K	49/50
AAC12	L234D / L235E+K322A	51/52	E233K / L234R / L235R+K322A	53/54
AAC13	L234D / L235E+P329W	55/56	E233K / L234R / L235R +P329W	57/58
AAC14	L234D / L235E+E269K+D265S+K322A	59/60	E233K / L234R / L235R +E269K+D265S+K322A	61/62
AAC15	L234D / L235E +E269K+D265S +K322E+E333K	63/64	E233K / L234R / L235R +E269K+D265S+K322E+E333K	65/66

[00269] Антитела и контроли клонировали и экспрессировали следующим образом. V1261 получали путем сайт-направленного мутагенеза с применением стандартных способов. Итоговую ДНК субклонировали в вектор pTT5 (см. международную публикацию патента № WO 2009/137911). Экспрессию проводили в 50 мл или 250 мл клеток СНО 3Е7. Клетки СНО трансфицировали в экспоненциальной фазе роста (1,5-2 миллиона клеток/мл) водным полиэтиленимином молекулярной массой 25 кДа в концентрации 1 мг/мл (ПЭИ, Polysciences) при соотношении ПЭИ : ДНК 2,5:1. (Raymond C. et al. A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. Methods. 55(1):44-51 (2011)). ДНК трансфицировали в оптимальных соотношениях ДНК тяжелой цепи А (HC-A), легкой цепи (LC) и тяжелой цепи В (соотношение HC-A/HC-B/LC = 30:30:40%). Трансфицированные клетки собирали через 5-6 дней вместе с культуральной средой, собранной после центрифугирования при 4000 об./мин., и очищали с применением фильтра с диаметром пор 0,45 мкм.

[00270] Протоколы очистки: Очищенную культуральную среду наносили на колонку MabSelect SuRe (GE Healthcare) с белком А и промывали 10 объемами колонки буфера ФБР, pH 7,2. Антитело элюировали 10 объемами колонки цитратного буфера, pH 3,6, и получали смешанные фракции, содержащие антитело, нейтрализованное TRIS, pH 11. Антитело, очищенное с помощью белка А, затем очищали методом гель-фильтрации

(ЭХ). Для проведения анализа методом гель-фильтрации 3,5 мг смеси антитела концентрировали до объема 1,5 мл, наносили на колонку Sephadex 200 HiLoad 16/600 200 pg (GE Healthcare) и анализировали с применением системы ЖХБР АКТА Express FPLC при скорости потока 1 мг/мин. Буфер ФБР, pH 7,4, использовали при скорости потока 1 мл/мин. Фракции, соответствующие очищенному антителу, собирали, концентрировали до концентрации ~1 мг/мл и хранили при температуре -80°C.

Выходы экспрессии являлись следующими:

Таблица G – выходы экспрессии

Вариант	Экспрессия в 50 мл, белок A, выход [мг/л]	Экспрессия в 50 мл, ЭХ, выход [мг/л]	Экспрессия в 250 мл, белок A, выход [мг/л]	Экспрессия в 250 мл, ЭХ, выход [мг/л]
Контроль, Ритуксимаб ДТ 1261			28	15
AAC9	11	6	8	3
AAC10	12	5	24	11
AAC11	12	3	24	9
AAC12	11	4	11	9
AAC13	15	5	7	3
AAC14	10	3	13	11
AAC15	18	5	8	3

[00271] Принимая во внимание вариабельность выхода от серии к серии, все образцы экспрессировались хорошо на уровнях, сравнимых с уровнем экспрессии контрольного Ритуксимаба ДТ.

Пример 9: Асимметричные конструкции антитела на основе ритуксимаба не связываются с FcγR

[00272] Способность асимметричных конструкций антитела на основе ритуксимаба к связыванию с FcγRПaH, FcγRПaR, FcγRПb, FcγRПaF и FcγRПaV оценивали методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

[00273] Аффинность FcγR в отношении Fc антитела измеряли методом ППР с помощью системы ProteOn XPR36 при температуре 25°C с применением ФБР, содержащего 3,4 mM EDTA и 0,05% Tween 20, pH 7,4, в качестве буфера для анализа. Поликлональные антитела козы против IgG были иммобилизованы на активированном NHS/EDC сенсорном датчике GLC посредством инъектирования 4,0 мкг/мл в 10 mM NaOAc (pH 4,5) при скорости потока 25 мкл/мин. до тех пор, пока было иммобилизовано приблизительно 3000 резонансных единиц (RU), после чего проводили гашение оставшихся активных групп этаноламином. 40 мкг/мл очищенных антител на основе ритуксимаба опосредованно захватывали посредством инъектирования при скорости 25 мкл/мин. в течение 240 с (что приводило к захвату приблизительно 500 RU) в направлении лиганда, с последующей инъекцией буфера для получения стабильной базовой линии в направлении аналита. Затем FcγR инъектировали при скорости 50 мкл/мин. в течение 120 с с фазой диссоциации 180 с для получения набора сенсограмм связывания. Полученные в результате значения Kd (аффинности) определяли в ходе двойного сравнения сенсограмм с применением модели Equilibrium Fit программного обеспечения Proteon Manager. Приведенные значения являются средними результатов

двух или трех независимых анализов.

[00274] Соотношение Ка связывания *in vitro*, которое определяли методом ППР, для каждого варианта относительно ДТ, представлено в таблице Н.

5 Таблица Н: Соотношения Ка связывания с рецепторами Fc γ , которое определяли методом ППР, относительно трастузумаба дикого типа

Вариант	CD16aF	CD16aV	CD32b	CD32aH	CD32aR
Трастузумаб	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Контроль, Ритуксимаб ДТ 1261	1,36	1,34	1,85	1,87	1,47
AAC9	OC	0,08	OC	OC	OC
AAC10	OC	НИЗКОЕ	OC	OC	OC
AAC11	OC	НИЗКОЕ	OC	OC	OC
AAC12	OC	0,08	OC	OC	OC
AAC13	OC	НИЗКОЕ	OC	OC	OC
AAC14	OC	НИЗКОЕ	OC	OC	OC
AAC15	OC	НИЗКОЕ	OC	OC	OC

[00275] Мутации, способствующие образованию гетеродимера контрольного Ритуксимаба ДТ 1261, незначительно увеличивали аффинность в отношении рецепторов по сравнению с гомодимерным трастузумабом ДТ. Мутанты, содержащие мутации, способствующие образованию гетеродимера, продемонстрировали значительно уменьшенное или необнаруживаемое связывание с рецепторами Fc γ .

Пример 10: Асимметричные конструкции антитела на основе ритуксимаба являются термостабильными

[00276] Температурную стабильность CH2-доменов асимметричных конструкций антитела на основе ритуксимаба определяли с применением дифференциальной сканирующей калориметрии следующим образом. Каждую конструкцию антитела очищали, как описано в примере 8, и разводили до концентрации 0,2 мг/мл в ФБР, и 400 мкл полученного раствора использовали для анализа ДСК с помощью системы VP-Capillary DSC (GE Healthcare). В начале каждого анализа ДСК пять холостых инъекций буфера проводили для стабилизации базовой линии, и инъекцию буфера проводили перед инъекцией каждой конструкции антитела в качестве сравнения. Каждый образец сканировали в диапазоне от 20 до 100°C со скоростью 60°C/ч, в режиме с низкой обратной связью, с фильтрацией в течение 8 сек., в режиме preTstat в течение 5 мин. и при давлении азота 70 пси. Полученные в результате термограммы преобразовывали в таблицы и анализировали с применением программного обеспечения Origin 7.

[00277] Температуры плавления исследованных гетеродимеров представлены в таблице I ниже.

Таблица I: Температурная стабильность гетеромультимеров

Вариант	T _m [°C] ¹
Контроль, Ритуксимаб ДТ 1261	73,0
AAC9	75,3
AAC10	75,3
AAC11	75,4
AAC12	75,4
AAC13	75,4
AAC14	75,2 (сигнал с шумом)
AAC15	67,5

1. Первый переход включал разворачивание как FAB, так и CH2-домена Ритуксимаба.

Т_m измеряли посредством деконволюции с применением недвухуровневой модели первого перехода.

[00278] Данные результаты свидетельствуют, что множество конструкций обладают большим началом Т_m и Т_m CH2-домена по сравнению с контролем ДТ.

Пример 11: Асимметричные конструкции антитела на основе ритуксимаба не стимулируют ADCC на клетках Дауди

[00279] Способность избранных вариантов стимулировать ADCC исследовали на клетках Дауди для оценки того, вызывает ли отсутствие измеряемого связывания с Fc_γR неспособность опосредовать эффекторную функцию, которую измеряли посредством определения ADCC. Клетки Дауди экспрессируют на своей поверхности CD20 и вследствие этого связываются с ритуксимабом, что позволяет клеткам NK в присутствии ритуксимаба опосредовать ADCC. Активность избранных вариантов в данном анализе сравнивали с активностью контрольного варианта ритуксимаба, представленной в таблице F, и с активностью полученного коммерческим способом ритуксимаба.

[00280] Используемые линии клеток: линия клеток Дауди (ATCC, кат. № CCL-213), NK92/CD16a (158V/V)

Устройство для обнаружения: FlexStation3, Molecular Devices.

Антитело положительного контроля: Ритуксимаб.

[00281] Культура клеток. Замороженные клетки оттаивали посредством аккуратного вращения виалы на водянной бане при температуре 37°C. Через 1-2 мин. среда в виале полностью растяла. Виалу снаружи протирали 70% этанолом. Затем суспензию клеток переносили в центрифужную пробирку объемом 15 мл, после чего добавляли 5 мл предварительно нагретой полной среды. После центрифугирования в течение 3-5 мин. при 500 g супернатант отсасывали. Добавляли 10 мл полной среды, и клетки ресусцидировали посредством многократного пипетирования вверх и вниз.

[00282] Клетки поддерживали при условиях 37°C/5% CO₂ и регулярно субкультивировали в подходящей среде с добавлением 10% ЭБС согласно протоколу ATCC.

[00283] Образец антитела и стандарт (Ритуксимаб) доставляли в сухой транспортной таре и хранили при температуре -20°C до проведения исследования. Образец и стандарт после оттаивания на льду хранили при температуре 4°C. Образец и стандарт разводили

средой МЕМ, не содержащей феноловый красный (с добавлением 1% ЭБС и 1% Pen/Strep), и применяли для проведения анализов.

[00284] Буфер для анализа ADCC состоял из 98% среды МЕМ, не содержащей феноловый красный, 1% Pen/Strep и 1% ЭБС.

⁵ [00285] Клетки NK92/FcRγ3a(158V/V) поддерживали обычным путем.

[00286] Клетки-мишени собирали посредством центрифугирования при 800 об./мин. в течение 3 мин., промывали средой для анализа один раз и центрифугировали; среду над осадком полностью удаляли. Клетки аккуратно супензировали со средой для анализа для получения раствора отдельных клеток. Количество клеток-мишней корректировали для получения 4-кратного исходного раствора клеток (10000 клеток в 50 мкл среды для анализа). Исследуемые соединения были получены в концентрациях, представляющих интерес. На 96-луночные планшеты для анализа высевали 50 мкл 4-кратного исходного раствора клеток-мишней и добавляли 50 мкл 4-кратных разбавителей образца. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 15 30 мин. в инкубаторе для культивирования клеток. Для запуска реакции добавляли 100 мкл эффекторных клеток (E/T=5:1, т.е. 50000 эффекторных клеток на лунку) и аккуратно перемешивали путем горизонтального встряхивания. К контролям клеток без эффекторных клеток добавляли Triton X-100 и антитело в конечной концентрации 1% для лизиса клеток-мишней, полученная смесь выступала в качестве контроля

20 максимального лизиса; к контролям клеток без эффекторных клеток добавляли буфера для анализа и антитело, полученная смесь выступала в качестве контроля минимального высвобождения LDH. Клетки-мишени, которые инкубировали с эффекторными клетками без присутствия антител, использовали в качестве фонового контроля неспецифичного высвобождения LDH, когда обе клетки инкубировали вместе. Планшет инкубировали 25 в инкубаторе при условиях 37°C/5%CO₂ в течение 4-6 часов. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью набора LDH. Данные относительно поглощения при ОП 492 нм и ОП 650 нм получали на приборе Flexstation 3.

[00287] Данные при ОП 492 нм за вычетом фонового сигнала (ОП 650 нм) анализировали для изучения высвобождения LDH. Процент лизиса клеток рассчитывали 30 согласно формуле:

Лизис клеток % = 100*(1 - (ОПДанные для образца - ОПпухолевые клетки плюс эффекторные клетки)/(ОПмаксимальное высвобождение - ОПминимальное высвобождение))

[00288] Результаты представлены на фигуре 6 и свидетельствуют, что все варианты 35 продемонстрировали значительно уменьшенную или необнаруживаемую активность ADCC.

[00289] -Результаты обобщены в следующей таблице:

Таблица J: Активность ADCC вариантов

Вариант	EC50 [нМ]	Максимальный лизис
Контроль, Ритуксимаб ДТ 1261	0,1	66
AAC9	Лизис отсутствует	Лизис отсутствует
AAC10	7,4	45
AAC11	>100	Низкий
AAC12	23,1	20
AAC13	н/о*	н/о*
AAC14	Лизис отсутствует	Лизис отсутствует
AAC15	Лизис отсутствует	Лизис отсутствует

*н/о = не определено

[00290] Варианты с нокаутом продемонстрировали значительно уменьшенную липическую активность ADCC, и у многих вариантов данная активность полностью отсутствовала.

Пример 12: Асимметричные конструкции антитела на основе ритуксимаба уменьшают CDC (комплément-зависимую цитотоксичность) на клетках Дауди

[00291] Хотя исследование способности к связыванию с С1q не проводили, исследовали способность избранных вариантов опосредовать CDC на клетках Дауди. Активность избранных вариантов в данном анализе сравнивали с активностью контрольного варианта ритуксимаба, представленной в таблице F, и с активностью полученного коммерческим способом ритуксимаба.

[00292] Используемые линии клеток: линия клеток Дауди (ATCC, кат. № CCL-213), NK92/CD16a(158V/V).

Устройство для обнаружения: F PHERAstarPlus, BMG Labtech.

Антитело положительного контроля: Ритуксимаб.

[00293] Культура клеток. Клетки Дауди собирали посредством центрифугирования, и осадок промывали один раз буфером для анализа. Жизнеспособные клетки подсчитывали с применением красителя трипанового синего. Для проведения анализа жизнеспособность популяции клеток должна была составлять >99%. Концентрацию клеток корректировали, и 5000 клеток высевали в 20 мкл буфера для определения CDC. Добавляли 10 мкл разбавленных образцов (8 концентраций с фактором разведения 1:10, начиная от 600 нМ, в трех повторах). Образцы и контроль Rituxan инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Для начала анализа CDC в каждую лунку добавляли 10 мкл NHS (normal human serum, нормальная сыворотка человека, конечная концентрация 10% в объеме реакции 40 мкл). Планшет инкубировали в инкубаторе при условиях 37°C/5% CO2 в течение 2 часов. Анализ жизнеспособности клеток проводили с помощью набора CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Люминесценцию измеряли на приборе PHERAStar Plus, данные фиксировали в относительных световых единицах (О.С.Е.).

[00294] Анализ данных

Процент лизиса клеток рассчитывали по формуле:

% Лизиса клеток = $100 \times (1 - (\text{O.C.E.образец}) / (\text{O.C.E.клетка} + \text{NHS}))$, где NHS означает нормальную сыворотку человека.

[00295] Результаты, представленные на фигуре 7, свидетельствуют, что все образцы продемонстрировали значительно более низкую активность CDC.

[00296] Таблица K: Активность CDC вариантов

Вариант	EC50 [нМ]	Максимальный лизис
Контроль, Ритуксимаб ДТ 1261	2,9	96
AAC9	47,9	68
AAC10	82,8	79
AAC11	51,6	63
AAC12	54,6	67
AAC13	н/о*	н/о*
AAC14	69,7	72
AAC15	~ 55,87	43

*н/о = не определено

[00297] Варианты с нокаутом продемонстрировали значительно уменьшенную лизическую активность CDC.

[00298] Реактивы, используемые в примерах, являются коммерчески доступными или могут быть получены с применением коммерчески доступных приборов, способов или реактивов, известных в данной области техники. Вышеуказанные примеры иллюстрируют различные аспекты настоящего изобретения и реализацию на практике способов согласно настоящему изобретению. Данные примеры не предназначены для предоставления исчерпывающего описания множества различных вариантов реализации настоящего изобретения. Таким образом, хотя вышеуказанное изобретение было описано в определенных деталях путем иллюстрации и примера для целей ясности понимания, средние специалисты в данной области техники легко понимают, что множество изменений и модификаций могут быть введены в настоящее изобретение без отступления от духа или объема прилагаемой формулы изобретения.

[00299] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящей заявке, включены в настоящую спецификацию посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была конкретно и отдельно указана, как включенная в настоящую заявку посредством ссылки.

(57) Формула изобретения

1. Гетеромультимер с уменьшенной или подавленной эффекторной функцией, содержащий конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем каждый полипептид Fc содержит модифицированную нижнюю шарнирную область, причем:

a. модифицированная нижняя шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификацию аминокислоты в положении L234 и/или в положении L235, причем модификация аминокислоты увеличивает суммарный заряд модифицированной нижней шарнирной области первого полипептида Fc при условиях pH, близких к физиологическим,

b. модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификацию аминокислоты, которая отличается от модификации аминокислоты первого полипептида Fc, и

c. конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG,

и причем нумерация аминокислот соответствует EU-индексу согласно Kabat.

2. Гетеромультимер по п. 1, отличающийся тем, что увеличение суммарного заряда представляет собой увеличение суммарного положительного заряда вследствие увеличения общего количества положительно заряженных аминокислот в первом полипептиде Fc или уменьшения общего количества отрицательно заряженных аминокислот в первом полипептиде Fc.

3. Гетеромультимер по п. 1, отличающийся тем, что модификация аминокислоты в модифицированной нижней шарнирной области первого полипептида Fc увеличивает общее число положительно заряженных аминокислот в первом полипептиде Fc, и модификация аминокислоты в модифицированной нижней шарнирной области второго полипептида Fc увеличивает общее количество отрицательных зарядов во втором полипептиде Fc или заряжена нейтрально.

4. Гетеромультимер по п. 1, отличающийся тем, что увеличение суммарного заряда представляет собой увеличение суммарного отрицательного заряда вследствие увеличения общего числа отрицательно заряженных аминокислот или уменьшения общего числа положительно заряженных аминокислот в первом полипептиде Fc.

5. Гетеромультимер по п. 1, отличающийся тем, что увеличение суммарного заряда представляет собой увеличение суммарного отрицательного заряда вследствие увеличения общего числа отрицательно заряженных аминокислот в первом полипептиде Fc, и модификация аминокислоты во втором полипептиде Fc увеличивает общее количество положительных зарядов во втором полипептиде Fc.

6. Гетеромультимер по п. 1, отличающийся тем, что модификация аминокислоты в модифицированной нижней шарнирной области первого полипептида Fc в сочетании с модификацией аминокислоты во втором полипептиде Fc увеличивает общий положительный заряд конструкции Fc IgG по сравнению с родительской конструкцией Fc IgG.

7. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что модифицированная нижняя шарнирная область по меньшей мере одного из первого или второго полипептидов Fc содержит две или более модификаций аминокислот.

8. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что модифицированная шарнирная область каждого из первого и второго полипептидов Fc содержит две модификации аминокислот.

9. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что конструкция Fc IgG дополнительно демонстрирует уменьшенное связывание с белком C1q по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG.

10. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что конструкция Fc IgG обладает K_D в отношении FcγRⅢaH, составляющей более 10 мкМ, K_D в отношении FcγRⅢaR, составляющей более 10 мкМ, K_D в отношении FcγRⅢb, составляющей более 10 мкМ, K_D в отношении FcγRⅢaF, составляющей более 6 мкМ, и K_D в отношении FcγRⅢaV, составляющей более 6 мкМ, и K_D в отношении FcγRIa, составляющей более 6,5 нМ.

11. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что конструкция Fc IgG опосредует уменьшенную эффекторную функцию по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG.

12. Гетеромультимер по п. 11, отличающийся тем, что эффекторная функция представляет собой ADCC (антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности), ADCP (антитело-зависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза), CDC (комплмент-зависимой цитотоксичности) или любую их комбинацию.

13. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что модификация аминокислоты во втором полипептиде Fc содержит модификацию аминокислоты в положении L234 и/или в положении L235.

14. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что модификация

⁵ аминокислоты в положении L234 выбрана из L234A, L234K, L234R, L234D и L234E.

15. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что модификация аминокислоты в положении L235 выбрана из L235K, L235R, L235E, L235A и L235D.

16. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что модифицированная шарнирная область первого и/или второго полипептида Fc дополнительно содержит ¹⁰ модификацию аминокислоты в положении E233.

17. Гетеромультимер по п. 16, отличающийся тем, что одна или обе модификации аминокислот в положении E233 представляют собой независимо E233A, E233K, E233R или E233D.

18. Гетеромультимер по п. 1, отличающийся тем, что модифицированная нижняя ¹⁵ шарнирная область первого полипептида Fc или второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234K/L235K, E233A/L234R/L235R, E233K/L234R/L235R, E233K/L234A/L235K, L234A/L235A, L234D/L235E, E233A/L234D/L235E или E233A/L234K/L235A.

19. Гетеромультимер по п. 18, отличающийся тем, что первый и/или второй ²⁰ полипептиды Fc дополнительно содержат одну или более модификаций аминокислот, выбранных из D265S, E269K, K322A, K322E, P329W и E333K.

20. Гетеромультимер по п. 1, отличающийся тем, что:

а. модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит ²⁵ модификации аминокислот L234K/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234A/L235A; или

б. модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234K/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E; или

с. модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит ³⁰ модификации аминокислот E233A/L234R/L235R, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233A/L234D/L235E; или

д. модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит ³⁵ модификации аминокислот E233K/L234R/L235R, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E; или

е. модифицированная шарнирная область первого полипептида Fc содержит ⁴⁰ модификации аминокислот E233K/L234A/L235K, и модифицированная шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификации аминокислот E233A/L234K/L235A; или

ф. первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R; или

г. первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/D265S, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/D265S; или

д. первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K; или

i. первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/K322A, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/K322A; или

j. первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/P329W,

5 и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/P329W; или

k. первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K/D265S/K322A, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322A; или

10 l. первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L234D/L235E/E269K/D265S/K322E/E333K, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E233K/L234R/L235R/E269K/D265S/K322E/E333K.

15 21. Гетеромультимер с уменьшенной или подавленной эффекторной функцией, содержащий конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, отличающийся тем, что:

a. первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот E269Q/D270N, и второй полипептид Fc содержит модификации аминокислот E269K/D270R; или

b. первый полипептид Fc содержит модификации аминокислот L235K/A327K, и второй полипептид Fc не содержит модификацию аминокислот в шарнирной области;

20 причем нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу согласно Kabat, и причем конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIa по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG.

25 22. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6 или 21, отличающийся тем, что указанная конструкция Fc IgG является агликазилированной или дегликозилированной.

23. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6 или 21, отличающийся тем, что указанная конструкция Fc IgG содержит вариант CH3-области, содержащий модификации аминокислот, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc-области вместо гомодимерной Fc-области.

30 24. Гетеромультимер по п. 23, отличающийся тем, что

a. один из первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот CH3 T366L/N390R/K392IWT394W, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот CH3 L351Y/S400E/F405A/Y407V; или

35 b. один из первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот CH3 L351Y/F405A/Y407V, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот CH3 T366L/K392M/T394W; или

c. один из первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот CH3 L351Y/F405A/Y407V, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот CH3 T366L/K392L/T394W; или

40 d. один из первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот CH3 T350V/L351Y/F405A/Y407V, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот CH3 T350V/T366L/K392L/T394W; или

e. один из первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот CH3 T350V/L351Y/F405A/Y407V, и другой полипептид Fc содержит модификации

45 аминокислот CH3 T350\AT366L/K392M/T394W; или

f. один из первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот CH3 T350V/L351Y/S400E/F405A/Y407V, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот CH3 T350V/T366L/N390R/K392M/T394W.

25. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6 или 21, отличающийся тем, что указанный гетеромультимер дополнительно содержит по меньшей мере одну антиген-связывающую конструкцию, слитую с конструкцией Fc IgG.

26. Гетеромультимер по п. 25, отличающийся тем, что по меньшей мере одна

⁵ указанная антиген-связывающая конструкция представляет собой Fab-фрагмент, scFv, sdAb, антиген-связывающий пептид, белок, слитый с Fc, или белок или его фрагмент, способный к связыванию с антигеном.

27. Гетеромультимер по п. 25, содержащий одну или две антиген-связывающие конструкции.

¹⁰ 28. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6 или 21, отличающийся тем, что указанная конструкция Fc IgG присоединена к одной или более молекулам токсичного лекарственного средства, либо к одной или более гетерологичным полипептидам.

29. Гетеромультимер по п. 28, отличающийся тем, что один или более указанных гетерологичных полипептидов выбраны из ферментов и токсинов.

¹⁵ 30. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6 или 21, отличающийся тем, что IgG представляет собой IgG 1.

31. Полинуклеотид, кодирующий первый и второй полипептиды Fc гетеромультимера по любому из пп. 1-27 и 30.

²⁰ 32. Клетка-хозяин для получения гетеромультимера с уменьшенной или подавленной эффекторной функцией, содержащая полинуклеотид по п. 31.

33. Способ получения гетеромультимера по любому из пп. 1-27 и 30, причем указанный способ включает следующие этапы: (а) культивирование клетки-хозяина, содержащей одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих первый и второй полипептиды Fc гетеромультимера по любому из пп. 1-27 и 30; и (б) выделение

²⁵ гетеромультимера из культуры клетки-хозяина.

34. Способ по п. 33, дополнительно включающий этап выделения гетеромультимера с применением способов очистки на основе заряда.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный способ очистки на основе заряда представляет собой ионообменную хроматографию.

³⁰ 36. Применение гетеромультимера по любому из пп. 1-30 в изготовлении фармацевтической композиции для лечения заболевания или расстройства у пациента.

37. Способ уменьшения эффекторной функции конструкции Fc IgG, содержащей первый и второй полипептид Fc, включающий:

модификацию нижней шарнирной области первого и второго полипептида Fc, причем

³⁵ модифицированная нижняя шарнирная область первого полипептида Fc содержит модификацию аминокислоты в положении L234 и/или в положении L235, причем модификация аминокислоты увеличивает суммарный заряд модифицированной нижней шарнирной области первого полипептида Fc при условиях pH, близких к физиологическим,

⁴⁰ модифицированная нижняя шарнирная область второго полипептида Fc содержит модификацию аминокислоты, которая отличается от модификации аминокислоты первого полипептида Fc, и

конструкция Fc IgG демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb и Fc γ RIIIa по сравнению с соответствующей родительской конструкцией

⁴⁵ Fc IgG,

и причем нумерация аминокислот соответствует EU-индексу согласно Kabat.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ЗАЙМВОРКС ИНК.

<120> Гетеромультимеры с уменьшенной или подавленной эффекторной функцией

<130> TO-A1529

<150> PCT/CA2014/0096493150507
<151> 2014-05-30

<150> US 61/829,973
<151> 2013-05-31

<160> 81

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 232
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 2

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic monoclonal antibody sequence - trastuzumab heavy chain

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

3

195

200

205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 3
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody sequence - trastuzumab light chain
 <400> 3

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

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

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

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

Ser	Arg	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	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro
				85				90			95				

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				

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				

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												

<210> 4
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody sequence - Rituximab+Heavy chain
 <400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15	
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr				
20	25	30		
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile				
35	40	45		
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe				
50	55	60		
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr				
65	70	75	80	
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys				
85	90	95		
Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly				
100	105	110		
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser				
115	120	125		
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		
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		
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 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		
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		
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		
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 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser 355 360 365		
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		
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		
Pro Gly Lys 450		
<210> 5		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic monoclonal antibody sequence - Rituximab+Light chain		
<400> 5		
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly 1 5 10 15		
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile 20 25 30		
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr 35 40 45		
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser 50 55 60		
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu 65 70 75 80		

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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
 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

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
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 6
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		

385 390 395 400

Leu Asp Glu Asp Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 7
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artif

<220>
<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant

<400> 7
gagggtgcagc tgggtggaaag cgaggaggaga ctgggtgcagc caggaggatc tctgcgcactg 60
agttgcgcgg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt gcgcacaggct 120
ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcgat atcttatcca ctaatggata cacccggat 180
gccgactccc tgaaggggag gttaactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac 240
ctgcagatga acagcctgca agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggg 300
ggagacggat tctacgttat ggattattgg ggacaggaga ccctggtgac agtgagctcc 360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt cttagaaatc cacctctgga 420
gggacagccg ctctggatg tctggtgaaag gactattcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480
tggaaacttag gcgcctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc 540
gggctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacAAAAG tggacaagaaa agtggagccc 660
aagagctgt ataagaccca cacctgccc ccctgtccag ctccagaagc cgccggagga 720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780
gaggtgaccc gcgtgggtt ggacgtgtct cacgaggacc ccgaagtgaa gttcaactgg 840
tacgtggatg gcgtggaaagt gcataatgtt aagacaaaac caagagagga acagtacaac 900
tccacttatac gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggggaa 960
gagtataagt gcaaagttagt taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct 1020
aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgtt acccaccctt cagagacgaa 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacatgtt ctgggtggaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140
gctgtggagt gggaaatcaa tggacagcca gagaacaattt acaagaccac acctccagg 1200
ctggacgagg atggcagctt cgccctgggt tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260
caqcaqqqqa acgtgttttaq ttgttcaqtq atqcatqaag ccctqcacaa tcattacact 1320

10

cagaagagcc	tgtccctgtc	tcccggcaaa	1350
<210> 8			
<211> 450			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant			
<400> 8			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1 5 10 15			
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr			
20 25 30			
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35 40 45			
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val			
50 55 60			
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr			
65 70 75 80			
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85 90 95			
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
100 105 110			
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
115 120 125			
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
130 135 140			
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145 150 155 160			
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
165 170 175			
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
180 185 190			
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
195 200 205			
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
210 215 220			
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly			
225 230 235 240			

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Arg Tyr Met Thr Trp Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 9
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant
 <400> 9
 gaggtgcagc tggtgaaag cggaggaga ctggtgacg caggaggatc tctgcactg 60
 agttgcggcc cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt gcgacaggct 120
 ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata cacccggat 180

12

gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac	240
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggaa	300
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctgggtac agtgagctcc	360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagtaaatc cacctctgga	420
gggacagccg ctctggatg tctggtaag gactattcc ccgagcctgt gaccgtgagt	480
tggaactcag gcgcctgac aagcggagtg cacactttc ctgctgtgt gcagtcaagc	540
gggctgtact ccctgtcctc tgtggtaaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact	600
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaag tggacaagaa agtggagccc	660
aagagctgtg ataagaccca cacctgcctt ccctgtccag ctccagaagc cgccggagga	720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc	780
gaggtgacct gcgtgggtt ggacgtgtct cacgaggacc ccgaagtgaa gttcaactgg	840
tacgtggatg gcgtgaaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac	900
tccacttattc gcgtcgttag cgtcgtgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag	960
gagtataagt gcaaagtca tagtataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct	1020
aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccacccag cagagacgaa	1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgctgtgt ctggtaaaag gcttctatcc tagtgatatt	1140
gctgtggagt gggatcaaa tggacagcca gagaacagat acatgacctg gcctccagtg	1200
ctggacacgc atggcagctt cttccctgtat tccaagctga cagtggataaa atctcgatgg	1260
cagcagggga acgtgttttag ttgttcagtg atgcataag ccctgcacaa tcattacact	1320
cagaagagcc tgtccctgtc tcccgccaaa	1350

<210> 10

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr		
20	25	30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
---	--

13

85

90

95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Asp Glu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385 390 395 400		
Leu Asp Glu Asp Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp		
405 410 415		
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
420 425 430		
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435 440 445		
Gly Lys		
450		

<210> 11
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant

<400> 11 gaggtgcagc tggtggaaag cggaggagga ctgggtgcagc caggaggatc tctgcgactg agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt ggcacaggct ccaggaaaag gactggagt ggtggctcgat atctatccca ctaatggata cacccggtat gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac ctgcagatga acagcctgcg agccgaatg accgcgtgtt actattgcag tcgatgggaa ggagacggat tctacgttat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt cttagaaatc cacctctggaa gggacagccg ctctggatg tctggtaag gactatttc ccgagcctgt gaccgtgagtt tggaaactcg ggcgcctgac aagccggatg cacacttttc ctgcgtgtt gcagtcaagc gggctgtact ccctgtccctc tgtgttgaca gtgccaagtt caaggctggg cacacagact tatatctgca acgtgaatca taagccctca aataccaaaag tggacaagaa agtggagccc aagagctgtg ataagaccca cacctgcctt ccctgtcccg ctccagaaga cgagggagga ccttagcgtgt tccctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc gaggtgaccc gctgtgggtt ggacgtgtt cacgaggacc ccgaagtggaa gttcaactgg tacgtggatg gctgtggaaatgt gcataatgtt aagacaaaac caagagggagga acagtacaac tccacttatac gcgtcgtgag cgtgtgttacc gtgtgttacc aggactggct gaacgggaaag gagtataatgtt gcaaagtgtt taataaggcc ctgcgtgtt caatcgaaaa aaccatctt aaggccaaag gccagccaaag ggagccccag gtgtgttacc acccaccctt cagagacggaa ctgaccaaga accaggtgtt cctgacatgtt ctgggttacc gcttctatcc tagtgtatatt gctgtggatg gggatcaaa tggacagccaa gagaacaatt acaagaccac acctccatgtt	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1140 1200
---	---

15

ctggacgagg atggcagctt cgccctgggtc tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260
 cagcagggga acgtgttag ttgttcagtg atgcataaag ccctgcacaa tcattacact 1320
 cagaagagcc tgtccctgtc tccccggcaaa 1350

<210> 12
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Asp Glu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Glu Asp Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 13
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant
 <400> 13
 gaggtgcagc tgggtggaaag cggaggagga ctgggtgcagc caggaggatc tctgcgactg 60

agttgcgccc	cttcaggatt	caacatcaag	gacacctaca	ttcactgggt	gcgacaggct	120
ccaggaaaag	gactggagt	ggtggctga	atctatcca	ctaattggata	cacccggtat	180
gccgactccg	tgaaggggg	gtttactatt	agccgcgata	catccaaaaa	cactgcttac	240
ctgcagatga	acagcctgcg	agccgaagat	accgctgtgt	actattgcag	tcgatgggaa	300
ggagacggat	tctacgctat	ggattatttg	ggacagggg	ccctgggtgac	agtgagctcc	360
gcctctacca	agggccccag	tgtgttccc	ctggctcctt	ctagtaaatc	cacctctgga	420
gggacagccg	ctctggatg	tctggtaag	gactattcc	ccgagcctgt	gaccgtgagt	480
tggaactcag	gcccctgac	aagcggagt	cacactttc	ctgctgtgct	gcagtcaagc	540
gggctgtact	ccctgtcctc	tgtggtaca	gtgccaagtt	caagcctggg	cacacagact	600
tatactgc	acgtgaatca	taagccctca	aatacaaaaag	tggacaagaa	agtggagccc	660
aagagctgt	ataagaccca	cacctgcct	ccctgtccag	ctccagccg	cgagggagga	720
cctagcgtgt	tcctgttcc	ccctaagcca	aaagacactc	tgatgatttc	caggactccc	780
gaggtgac	gcgtgggtg	ggacgtgtct	cacgaggacc	ccgaagtgaa	gttcaactgg	840
tacgtggatg	gcgtgaaagt	gcataatgct	aagacaaaac	caagagagga	acagtacaac	900
tccacttattc	gcgtcgtgag	cgtgtgacc	gtgctgcacc	aggactggct	gaacgggaag	960
gagtataagt	gcaaagtca	taataaggcc	ctgcctgctc	caatcgaaaa	aaccatctct	1020
aaggccaaag	gccagcca	ggagccccag	gtgtacgt	acccacccag	cagagacgaa	1080
ctgaccaaga	accaggtgtc	cctgacatgt	ctggtaaag	gcttctatcc	tagtgatatt	1140
gctgtggagt	ggaaatcaaa	tggacagcca	gagaacaatt	acaagaccac	acctccagtg	1200
ctggacgagg	atggcagctt	cgccctggtg	tccaagctga	cagtggataa	atctcgatgg	1260
cagcagg	acgtgtttag	ttgttcagtg	atgcatgaag	ccctgcacaa	tcattacact	1320
cagaagagcc	tgtccctgtc	tcccgcaaa				1350

<210> 14

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

<400> 14

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
								20				25			30

Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Ley	Glu	Trp	Val
						35				40					45

Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
						50			55						60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

18

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95			
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln 100 105 110			
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val 115 120 125			
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala 130 135 140			
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser 145 150 155 160			
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val 165 170 175			
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro 180 185 190			
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys 195 200 205			
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp 210 215 220			
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Lys Ala Gly Gly 225 230 235 240			
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 245 250 255			
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu 260 265 270			
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 275 280 285			
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 290 295 300			
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 305 310 315 320			
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu 325 330 335			
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 340 345 350			
Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Glu Asp Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 15
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant

<400> 15
gagggtgcagc tgggtggaaag cgaggaggaga ctgggtgcagc caggaggatc tctgcactg 60
agttgcgcgg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt gcgcacaggct 120
ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcgatctatccca ctaatggata caccggat 180
gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac 240
ctgcagatga acagcctcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggaa 300
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacaggggaa ccctgggtgac agtgagtc 360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctccctt ctagtaaattc cacctctggaa 420
gggacagccg ctctggatg tctggtaag gactattcc ccgagccctgt gaccgtgagt 480
tggaaactcag gcgcctcgac aagcgagtg cacactttc ctgctgtgt gcagtcaagc 540
gggctgtact ccctgtccctc tgtggtaaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc 660
aagagctgtg ataagaccca cacctgccc ccctgtcccg ctccagccaa ggccggagga 720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780
gagggtgaccc gcgtgggtggt ggacgtgtct cacgaggacc ccgaagtgaa gttcaactgg 840
tacgtggatg gcgtggaaagt gcataatgtt aagacaaaaac caagagagga acagtacaac 900
tccacttatac gcgtcgtgag cgtgtgcacc gtgctgcacc aggactggct gaacggaga 960
gagtataagt gcaaagtca taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct 1020
aaggccaaag gccagccaaag ggagccccag gtgtacgtgt acccaccctc cagagacgaa 1080

20

ctgaccaaga accaggtgtc cctgacatgt ctgggtgaaag gcttcttatcc tagtgatatt 1140
 gctgtggagt gggaatcaaa tggacagcca gagaacaatt acaagaccac acctccagtg 1200
 ctggacgagg atggcagctt cgccctggtg tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260
 cagcagggga acgtgtttag ttgttcagtg atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320
 cagaagagcc tgtccctgtc tccccggcaaa 1350

<210> 16
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

<400> 16

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
								20					25		30

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

Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
						50			55					60	

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

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

Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
					100			105					110		

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
						115			120				125		

Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
							130		135				140		

Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
					145				150				155		160

Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
						165			170				175		

Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
							180			185			190		

Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
							195		200				205		

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Gln
 260 265 270
 Asn Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Glu Asp Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 17
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant

<400> 17
 gaggtgcagc tggtgaaag cgaggagga ctggcagc caggaggatc tctgcactg 60
 agttgcggcc cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt ggcacaggct 120
 ccaggaaaag gactggagt ggtggctcg atctatccca ctaatggata cacccggtat 180
 gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agccgcgata catccaaaaa cactgcttac 240
 ctgcagatga acagcctcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatggga 300
 ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacaggggc ccctgggtgac agtgagctcc 360
 gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagtaaatc cacctctgga 420
 gggacagccg ctctggatg tctggtaag gactattcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480
 tggaaactca ggcgcctgac aagcggagt cacactttc ctgctgtgt gcagtcaagc 540
 gggctgtact ccctgtcctc tgtggtaaca gtgccaaagt caagcctggg cacacagact 600
 tataatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc 660
 aagagctgtg ataagaccca cacctgcctt ccctgtccag ctccagaact gctgggagga 720
 cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780
 gaggtgaccc gctgggtgtt ggacgtgtct caccagaacc ccgaagtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggatg gcgtgaaagt gcataatgt aagacaaaac caagagagga acagtacaac 900
 tccacttattc gcgtcgtgag cgtgtgcacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag 960
 gagtataagt gcaaagtca gtaataaggcc ctgcgtgtc caatgaaaaa aaccatctct 1020
 aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgt accccacccag cagagacgaa 1080
 ctgaccaaga accaggtgtc cctgacatgt ctggtaaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140
 gctgtggagt gggaaatcaaa tggacagcca gagaacaatt acaagaccac acctccagt 1200
 ctggacgagg atggcagctt cgcctgggtc tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260
 cagcagggga acgtgttttag ttgttcgttg atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320
 cagaagagcc tgtccctgtc tcccgccaaa 1350

<210> 18
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

23

50

55

60

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340

345

350

Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Glu Asp Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 19
 <211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant

<400> 19

gaggtgcagc tggtgaaag cggaggaga ctgggtcagc caggaggatc tctgcgactg	60
agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt gcgacaggct	120
ccaggaaaag gactggatg ggtggctcgatcttatcca ctaatggata cacccgttat	180
gccgactccg tgaagggag gttaactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac	240
ctgcagatga acagcctcg agccgaatg accgctgtgt actattgcag tcgatgggaa	300
ggagacggat tctacgtat ggattattgg ggacagggaa ccctgggtgac agtgagctcc	360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagtaaatc cacctctggaa	420
gggacagccg ctctggatg tctggtaag gactattcc ccgagcctgt gaccgtgagt	480
tggaaactcg ggcgcctgac aagccggatg cacacttttc ctgctgtgt gcagtcaagc	540
gggctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact	600
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aataaaaaa tggacaagaa agtggagccc	660
aagagctgtg ataagaccca cacctgcctt ccctgtccag ctccagaact gctggagga	720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc	780
gaggtgaccc gctgggttgtt ggacgtgtct cacgaggacc ccgaagtcaa gttcaactgg	840
tacgtggatg gctggaaatg gcataatgtt aagacaaaac caagagggaa acagtacaac	900
tccacttatac gctgcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggaaag	960

25

gagtataagt	gcaaagtca	taataaggcc	ctgcctgctc	caatcgaaaa	aaccatctct	1020										
aaggccaaag	gccagccaag	ggagccccag	gtgtacgtgt	acccacccag	cagagacgaa	1080										
ctgaccaaga	accaggtgtc	cctgacatgt	ctggtaaaag	gcttctatcc	tagtgatatt	1140										
gctgtggagt	ggaatcaaa	tggacagcca	gagaacaatt	acaagaccac	acctccagtg	1200										
ctggacgagg	atggcagctt	cgcctggtg	tccaagctga	cagtggataa	atctcgatgg	1260										
cagcagggga	acgtgtttag	ttgttcagtg	atgcatgaag	ccctgcacaa	tcattacact	1320										
cagaagagcc	tgtccctgtc	tcccgccaaa				1350										
<210> 20																
<211> 450																
<212> PRT																
<213> Artificial Sequence																
<220>																
<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant																
<400> 20																
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	15
1					5			10								
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	20
								25					30			
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35
						40				45						
Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50
						55				60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	65
					70				75		80					
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85
								90				95				
Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	100
							105					110				
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115
						120					125					
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	130
							135				140					
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145
					150				155		160					
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165
							170			175						
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180
							185					190				

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Arg Tyr Met Thr Trp Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 21
 <211> 1350
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant

<400> 21
gagggtgcagc tgggtggaaaag cgaggaggaga ctgggtgcagc caggaggatc tctgcgcactg 60
agttgcgcgg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt gcgcacaggct 120
ccaggaaaaag gactggagtg ggtggctcgat atctatccca ctaatggata cacccggat 180
gccgactccg tgaagggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac 240
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggaa 300
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc 360
gcctctacca agggccccag tgggtttccc ctggctccctt ctagtaaatc cacctctggaa 420
gggacagccg ctctggatg tctggtgaag gactattcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480
tggaaactca ggcgcctgac aagccggatg cacacttttc ctgctgtgt gcagtcaagc 540
gggctgtact ccctgtccctc tgggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc 660
aagagctgtg ataagaccca cacctgcctt ccctgtcccg ctccagaact gctggagggaa 720
ccttagctgt tccctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactcccc 780
gaggtgacct gcgtgggtgg ggacgtgtct cacgaggacc ccgaagtcaa gttcaactgg 840
tacgtggatg gcgtggaaatgcataatgt aagacaaaaac caagagagga acagtacaac 900
tccacttatac gcgtcgtag cgtgtgacc gtgtcgacc aggactggct gaacgggaag 960
gagttataatgcataatggcc ctgcctgtc caatcgaaaa aaccatctt 1020
aaggccaaag gccagccaaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccaccccg cagagacgaa 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgtgtgt ctgggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140
gctgtggagt gggaaatcaaa tggacagccaa gagaacagat acatgacctg gcctccagtg 1200
ctggacagcg atggcagctt cttccgttat tccaagctga cagtggataaa atctcgatgg 1260
cagcagggga acgtgttttag ttgttcagtg atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320
caaaqaqgccc tgccctgtc tccccggcaaa 1350

<210> 22
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Lys Lys Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

29

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Arg Tyr Met Thr Trp Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 23

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant

<400> 23

gaggtgcagc tggtgaaaag cggaggagga ctgggtcagc caggaggatc tctgcgactg	60
agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcactgggt gcgacaggct	120
ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcg aatctatcca ctaatggata cacccgttat	180
gccgactccg tgaagggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac	240
ctgcagatga acagcctgcg agccaaatg accgctgtgt actattgcag tcgatggga	300
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctggtgac agtgagctcc	360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt cttagtaatc cacctctgga	420
gggacagccg ctctggatg tctggtaag gactattcc ccgagcctgt gaccgtgagt	480
tggaaactcg gcgcctgac aagcggatg cacacttttc ctgctgtgt gcagtcaagc	540
gggctgtact ccctgtcc tc tggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact	600
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aataaaaaa tggacaagaa agtggagccc	660
aagagctgtg ataagaccca cacctgccc ccctgtccag ctccagaaaa gaagggagga	720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tcatgatttc caggactccc	780
gaggtgacct gcgtgggt ggacgtgtct cacgaggacc ccgaagtcaa gttcaactgg	840

tacgtggatg	gcgtggaagt	gcataatgct	aagacaaaac	caagagagga	acagtacaac	900
tccacttatac	gcgtcgtag	cgtgctgacc	gtgctgcacc	aggactggct	gaacgggaag	960
gagtataagt	gcaaagtca	taataaggcc	ctgcctgctc	caatcgaaaa	aaccatctct	1020
aaggccaaag	gccagccaag	ggagccccag	gtgtacgtgc	tgccacccag	cagagacgaa	1080
ctgaccaaga	accaggtgtc	cctgtgtgt	ctggtaaaag	gcttctatcc	tagtgatatt	1140
gctgtggagt	gggaatcaaa	tggacagcca	gagaacagat	acatgacctg	gcctccagtg	1200
ctggacagcg	atggcagctt	cttcgttat	tccaagctga	cagtggataa	atctcgatgg	1260
cagcagggga	acgtgtttag	ttgttcagtg	atgcatgaag	ccctgcacaa	tcattacact	1320
cagaagagcc	tgtccctgtc	tcccgccaaa				1350

<210> 24

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

<400> 24

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
								20			25		30		

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

Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
						50			55			60			

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

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

Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
					100			105				110			

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
					115				120			125			

Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
					130			135			140				

Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
					145			150		155			160		

Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
					165			170			175				

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Arg Arg Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Arg Tyr Met Thr Trp Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 25
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant

 <400> 25
 gaggtgcagc tgggtgaaag cgaggaggaga ctgggtgcagc caggaggatc tctgcgactg 60
 agttgcggccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt ggcacaggct 120
 ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcgat atctatccca ctaatggata cacccggtat 180
 gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agccgcccata catccaaaaa cactgcttac 240
 ctgcagatga acagcctcgatg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggg 300
 ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacaggggaa ccctggtgac agtgagctcc 360
 gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctccctt ctagtaaatc cacctctgga 420
 gggacagccg ctctggatg tctggtaag gactattcc ccgagccctgt gaccgtgagt 480
 tggaactcag gcccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgt gcagtcaagc 540
 gggctgtact ccctgtcctc tgtgtgtaca gtgccaaagt caagcctggg cacacagact 600
 tataatctgca acgtgaatca taagccctca aatacacaag tggacaagaa agtggagccc 660
 aagagctgtg ataagaccca cacctgcctt ccctgtccag ctccagccag aagaggagga 720
 cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagccca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780
 gaggtgaccc gcgtgggtgg ggacgtgtct cacgaggacc ccgaagtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggatg gcgtgaaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac 900
 tccacttatac gcgtcgtgag cgtgtgtacc gtgtgcacc aggactggct gaacgggaag 960
 gagtataagt gcaaagtcatg taataaggcc ctgcctgtct caatcgaaaa aaccatctct 1020
 aaggccaaag gccagccaaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccacccag cagagacgaa 1080
 ctgaccaaga accaggtgtc cctgtgtgt ctgggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140
 gctgtggagt gggaatcaa tggacagccca gagaacagat acatgacctg gcctccagt 1200
 ctggacacgcg atggcagctt cttcctgtat tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260
 cagcagggga acgtgttttag ttgttcagtg atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320
 cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa 1350

<210> 26
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

 <400> 26
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

33

20

25

30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Lys Arg Arg Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

34

305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu 325 330 335			
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 340 345 350			
Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 355 360 365			
Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 370 375 380			
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Arg Tyr Met Thr Trp Pro Pro Val 385 390 395 400			
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp 405 410 415			
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 420 425 430			
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro 435 440 445			
Gly Lys 450			

<210> 27
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant

<400> 27 gaggtgcagc tggtgaaaag cggaggagga ctgggtgcagc caggaggatc tctgcgactg agttgcgcgc cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt ggcacaggct ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcgaa atctatccca ctaatggata cacccggtat gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggaa ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctggtgac agtgagctcc gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctccctt ctagtaaatc cacctctggaa gggacagccg ctctggatg tctggtgaaag gactattcc ccgagcctgt gaccgtgagt tggaaacttag ggcgcctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgt gcagtcaagc gggctgtact ccctgtccctc tgtggtgaca gtgccaagtt caaggctggg cacacagact tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc aagagctgtg ataagaccca cacctgccc cccctgtccag ctccaaagag aagaggagga	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720
--	---

35

cctagcgtgt	tcctgtttcc	ccctaagcca	aaagacactc	tgatgatttc	caggactccc	780
gaggtgacct	gcgtgggtgt	ggacgtgtct	cacgaggacc	ccgaagtcaa	gttcaactgg	840
tacgtggatg	gcgtggaagt	gcataatgct	aagacaaaac	caagagaggaa	acagtacaac	900
tccacttattc	gcgtcgtag	cgtgctgacc	gtgctgcacc	aggactggct	gaacggaaag	960
gagtataagt	gcaaagtca	taataaggcc	ctgcctgctc	caatcgaaaa	aaccatctct	1020
aaggccaaag	gccagccaag	ggagccccag	gtgtacgtgc	tgccacccag	cagagacgaa	1080
ctgaccaaga	accagggtgc	cctgctgtgt	ctggtaaag	gcttctatcc	tagtgatatt	1140
gctgtggagt	ggaaatcaa	tggacagcca	gagaacagat	acatgacctg	gcctccagtg	1200
ctggacagcg	atggcagctt	cttcctgtat	tccaaagctga	cagtggataa	atctcgatgg	1260
cagcagggga	acgtgttag	ttgttcagtg	atgcatgaag	ccctgcacaa	tcattacact	1320
cagaagagcc	tgtccctgtc	tcccgccaaa				1350

<210> 28

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

<400> 28

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
								20				25			30

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

Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
						50		55		60					

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

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

Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
					100			105				110			

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
					115				120			125			

Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
					130			135			140				

Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
					145			150		155		160			

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Lys Ala Lys Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Arg Tyr Met Thr Trp Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
450

<210> 29
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant
<400> 29
gaggtgcagc tggtggaaag cgaggagga ctggcgcagc caggaggatc tctgcgactg 60
agttgcgcgg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt ggcacaggct 120
ccaggaaaag gactggagt ggtggctcgat atctatccca ctaatggata cacccggtat 180
gccgactccg tgaagggggat gtttactatt agccgcgata catccaaaaa cactgcttac 240
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgcgtgtt actattgcag tcgatggga 300
ggagacggat tctacgtat ggattattgg ggacaggggat ccctgggtgac agtgagctcc 360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctccctt ctagtaaatc cacctctggat 420
gggacagccg ctctggatg tctggtaag gactattcc ccgagcctgtt gaccgtgagt 480
tggaaactcag gcgcctgac aagcggagt gacacttttc ctgcgtgttgc gcagtcaagc 540
gggctgtact ccctgtcctc tgtggtaacatgc ttcaactggg cacacagact 600
tataatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaatggacaagaa agtggagccc 660
aagagctgtg ataagaccca cacctccctt ccctgtccag ctccaaaggc caagggagga 720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagccaa aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780
gaggtgacccgcgtgggtt ggacgtgttgc cacgaggacc ccgaagtggaa gttcaactgg 840
tacgtggatg gcgtggaaatgt gcataatgtt aagacaaaac caagagagga acagtacaac 900
tccacttattc gcgtcgtgag cgtgtgttgc ttgtgtgcacc aggactgggtt gaacggggaa 960
gagtataagt gcaaagtca gtaataaggcc ctgcctgttgc caatcgaaaaa aaccatctct 1020
aaggccaaag gccagccaaag ggagccccccat gtgtacgtgc tgccaccatccatccatcc 1080
ctgaccaaga accaggtgttgc cctgtgttgc ctggtaaagg gcttctatcc tagtgatatt 1140
gctgtggatg gggaaatccaa tggacagccaa gagaacatgtt acatgttgcgcgttgcgcgtt 1200
ctggacacgcg atggcagctt cttccgttat tccaaatgttca cagtggataaa atctcgatgg 1260
cagcggggaa acgtgttttag ttgttcatgtt atgttgcgttccatccatccatccatccatcc 1320
cagaagagcc tgcgttgcgttgc tcccgccaa 1350
<210> 30
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant
<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

38

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

290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Arg Tyr Met Thr Trp Pro Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	445
Gly Lys		
450		

<210> 31
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant
<400> 31
gaggtgcagc tggtgaaag cggaggagga ctgggtcagc caggaggatc tctgcgactg 60
agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt ggcacaggct 120
ccaggaaaag gactggagt ggtggctcgat atctatccca ctaatggata cacccgttat 180
gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agccgcgata catccaaaaa cactgcttac 240
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatggga 300
ggagacggat tctacgttat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc 360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctccctt ctagtaaatc cacctctgga 420
gggacagccg ctctggatg tctggtaag gactattcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480
tggaaactcag gcgccctgac aagccggatg cacactttc ctgctgtgct gcagtcaagc 540
gggctgtact ccctgtccctc tgggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600

tataatctgcac	acgtgaatca	taagccctca	aatacaaaag	tggacaagaa	agtggagccc	660
aagagctgt	ataagaccca	cacctgccc	ccctgtccag	ctccagaact	gctgggagga	720
ccttagcgt	tcctgttcc	ccctaagcca	aaagacactc	tcatgatttc	caggactccc	780
gaggtgacct	gcgtgggt	ggacgtgtct	cacaagagac	ccgaagtcaa	gttcaactgg	840
tacgtggat	gcgtggaa	gtcataatgt	aagacaaaac	caagagagga	acagtacaac	900
tccacttata	gcgtcgtgag	cgtgctgacc	gtgctgcacc	aggactggct	gaacggaaag	960
gagtataagt	gc当地atcg	taataaggcc	ctgcctgctc	caatcgaaaa	aaccatctct	1020
aaggccaaag	gccagccaag	ggagccccag	gtgtacgtgc	tgccacccag	cagagacgaa	1080
ctgaccaaga	accagggtgtc	cctgtgtgt	ctggtgaaag	gcttctatcc	tagtgatatt	1140
gctgtggagt	gggaatcaa	tggacagcca	gagaacagat	acatgacctg	gcctccagtg	1200
ctggacagcg	atggcagctt	cttcctgtat	tccaagctga	cagtggataa	atctcgatgg	1260
cagcagggga	acgtgtttag	ttgttcagtg	atgcatgaag	ccctgcacaa	tcattacact	1320
cagaagagcc	tgtccctgtc	tcccgccaaa				1350

<210> 32

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

<400> 32

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
								20				25			

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

Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
						50				55					60

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

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

Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
							100					105			110

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
								115			120				125

Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
							130			135					140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Lys Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Lys Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Arg Tyr Met Thr Trp Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 33
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - variant

<400> 33 gagggtgcagc tgggtggaaag cgaggaggaga ctgggtgcagc caggaggatc tctgcgactg 60
attgcgcgc cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcaactgggt gcgcacaggct 120
ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcgat atctatccca ctaatggata cacccggtat 180
gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac 240
ctgcagatga acagcctgca agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggg 300
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggggac ccctgggtgac agtgagctcc 360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctccctt cttagtaaatc cacctctggaa 420
gggacagccg ctctggatg tctggtaag gactattcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480
tggaaactca ggcgcctgac aagccggatg cacacttttc ctgctgtgtc gcagtcaagc 540
gggctgtact ccctgtccctc tgtggtaaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc 660
aagagctgtg ataagaccca cacctgcccct ccctgtcccg ctccagaact gaagggagga 720
cctagctgttgc tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780
gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgtct cacgaggacc ccgaagtgaa gttcaactgg 840
tacgtggatg gcgtggaaatg gcataatgtt aagacaaaaac caagagagga acagtacaac 900
tccacttatac gcgtcgtag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag 960
gagttataatg gcaaagtca gtaataagaag ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctt 1020
aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccacccag cagagacgaa 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgctgtgt ctggtaaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140
gctgtggagt gggaaatcaaa tggacagcca gagaacagat acatgacctg gcctccagtg 1200
ctggacagcg atggcagctt cttccctgtat tccaagctga cagtggataaa atctcgatgg 1260
cagcagggga acgtgttttag ttgttcagtg atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320
cagaagagcc tggccctgtc tccccggcaaa 1350

<210> 34
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic nucleotide sequence - variant trastuzumab light chain

<400> 34
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc 60
 atcaattgcc gggcaagtca ggacgtaac accgctgttag cttggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctattct gcatccttt tgtacagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagt gcagtcgatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag cattacacta ccccacccac tttcgccaa 300
 gggaccaaag tggagatcaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtcttcat cttccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccaa 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcbaagtac ccacagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 35
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab variant

<400> 35
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 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

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

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

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 Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

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 Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 36
 <211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 36		
cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtaaac acatggcgtac cgtgaaaatg	60	
tcttgcaagg ctatggcta cacattcaact tcctataaca tgcaactgggt gaagcagaca	120	
ccaggacgag gactggagtg gatcgagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat	180	
aatcagaagt tttaaggcaa ggccacccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac	240	
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcgtgt actattgcgc cagaagcacc	300	
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggtggcag gaaccacagt caccgtgagc	360	
gccgcctcca caaaaggacc aagcgtgtt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc	420	
ggaggaacag cagccctggg atgtctggta aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg	480	
tcttggaaaca gtggcgcct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctcagtt	540	
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggc accgtccctt cctctagtct ggggacttag	600	
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa	660	
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccacccgtc ctgcaccaga gctgctggaa	720	
ggaccatccg tggccctgtt tccacccaaa cccaaaggaca ctctgtatgat tagccggact	780	
cctgaagtca cctgcgtgt cgtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac	840	
tggtacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gcacaaacaa agccccggg ggaacagttac	900	
aactcaacat atagagtcgt gagcgtccgt actgtgtgc accaggactg gctgaacggc	960	
aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgccc cacctatcga gaagactatt	1020	
tctaaagcca agggccagcc tagggacca caggtgtacg tgtaccctcc aagccgcgac	1080	
gagctgacta aaaaccaggc ctccctgacc tgtctggta aggggttcta tccaagtgt	1140	
atcgctgtgg agtggaaatc aaatggacag cccgagaaca attacaagac taccccccct	1200	
gtgctggact cagatggag ctgcgcctg gtgtccaaac tgaccgtgaa taagtctcg	1260	
tggcagcagg gaaatgttct ttccctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac	1320	
acccagaagt ccctgagcct gtcacccggc aaa	1353	

<210> 37

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab

variant

<400> 37

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 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

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
 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
 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 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Leu 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 Leu Thr Trp 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
 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
 Pro Gly Lys
 450

<210> 38
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

 <400> 38
 caggccgc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtaaac ctggcgcatc cgtaaaaatg 60
 tcttgcaagg ctagtggcta cacattact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120
 ccaggacgag gactggagt gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180
 aatcagaagt tttaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240
 atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcgtgt actattgcgc cagaagcacc 300
 tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360
 gcccgttcca caaaaaggacc aagcgtgtt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc 420

ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg	480
tcttggaca gtggcgcctt gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctgcagtct	540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtc ggggactcag	600
acctatatct gcaacgtcaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa	660
caaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccacccgtc ctgcaccaga gctgctggaa	720
ggaccatccg tgttccgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact	780
cctgaagtca cctgcgttgt cggtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac	840
tggtagtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggaa ggaacagtac	900
aactcaacat atagagtctg gagcgtcctg actgtgtgc accaggactg gctgaacggc	960
aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgccc cacctatcga gaagactatt	1020
tctaaagcca agggccagcc tagggAACCA caggtgtacg tgctgcctcc aagccgcgac	1080
gagctgacta aaaaccaggc ctccctgtc tgtctggta aggggttcta tccaagtgtat	1140
atcgctgtgg agtggaaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccc	1200
gtgctggact cagatggag cttcttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcg	1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttccctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac	1320
acccagaagt ccctgaggct gtcacccggc aaa	1353

<210> 39

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab
variant

<400> 39

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly			
100	105	110	

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 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
 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
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Asp Glu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 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
 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
 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 Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 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 Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

 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

 Pro Gly Lys
 450

<210> 40
<211> 1353
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 40 cagggtccagc tgtagcagcc cgtagctgaa ctggtaaac ctggcgcatc cgtaaaaatg 60 tcttgcagg ctgtggcta cacattact tcctataaca tgcaactgggt gaagcagaca 120 ccaggacgag gactggagtg gatcgagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180 aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240 atgcagctga gttcaactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaaggcacc 300 tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360 gcccgttcca caaaaggacc aagcgtgtt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc 420 ggaggaacag cagccctggg atgtctggta aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg 480 tcttggaaaca gtggcgccct gacaagcggg gtcctataactt ttcccgctgt gctgcagtct 540 agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtc ggggactcag 600 acctatatct gcaacgtgaa tcacaaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa 660 ccaaaaagtt gtgataagac acataacttgc ccacccgtc ctgcaccaga ggacgaggga 720 ggaccatccg tggccctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgtatgtat tagccggact 780 cctgaagtca cctgcgttgt cgtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac 840 tggtagtgg atggcggtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtcac 900 aactcaacat atagagtcgt gagcgtccctg actgtgtgc accaggactg gctgaacggc 960 aaggagtata aatgcaaggt gtccaaacaag gccctgccc cacctatcga gaagactatt 1020 tctaaagcca agggccagcc taggaaacca caggtgtacg tgtaccctcc aagccgcac 1080 gagctgacta aaaaccaggc ctccctgacc tggtagtggta aggggttctt tccaagtgtat 1140 atcgctgtgg agtggaaatc aatggacag cccgagaaca attacaagac taccctccct 1200 gtgtggact cagatgggag cttccctg gttccaaac tgaccgtgga taagtctcg 1260 tggcagcagg gaaatgtctt ttccctgttct gtgtatgcacg aagcactgca caatcactac 1320 acccagaagt ccctgaggcct gtcacccggc aaa 1383

<210> 41
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab
 variant

 <400> 41

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

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

 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

 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

 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

 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Lys Arg Arg Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

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

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

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 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Leu 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 Leu Thr Trp 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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 42

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 42

cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctgggtcaaac ctggcgcatc cgtaaaaatg 60

tcttgcaagg cttagtggcta cacattcaact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120

ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180

53

aatcagaagt	ttaaaggcaa	ggccaccctg	acagctgata	agagctcctc	taccgcctac	240
atgcagctga	gttcaactgac	aagtgaagac	tcagcagtgt	actattgcgc	cagaaggcacc	300
tactatggcg	gggattggta	cttcaacgtg	tggggggcag	gaaccacagt	caccgtgagc	360
gccgcttcca	caaaaggacc	aagcgtgttt	ccactggcac	caagctccaa	gtcaaccagc	420
ggaggaacag	cagccctggg	atgtctggtg	aaggactact	tcccagagcc	cgtcaccgtg	480
tcttggaaaca	gtggcgcct	gacaagcggg	gtccatactt	ttcccgtgt	gctgcagtct	540
agtggcctgt	acagcctgtc	aagcgtggtc	accgtccctt	cctctagtct	ggggactcag	600
acctatatct	gcaacgtgaa	tcacaaacct	tctaatacaa	aggtcgacaa	gaaagtggaa	660
ccaaaaagtt	gtgataagac	acatacttc	ccacccgtc	ctgcaccaa	gagaagagga	720
ggaccatccg	tgttccctgtt	tccacccaaa	cccaaggaca	ctctgtatgt	tagccggact	780
cctgaagtca	cctgcgttgt	cgtggacgtg	agccacgagg	accccgaagt	caaattcaac	840
tgg tacgtgg	atggcgtcga	ggtgcataat	gccaaaacaa	agccccggga	ggaacagtag	900
aactcaacat	atagagtcgt	gagcgtcctg	actgtgtgc	accaggactg	gctgaacggc	960
aaggagtata	aatgcaaggt	gtccaacaag	gcccgtccc	cacctatcga	gaagactatt	1020
tctaaagcca	agggccagcc	tagggacca	caggtgtacg	tgctgcctcc	aagccgcgac	1080
gagctgacta	aaaaccaggt	ctccctgctg	tgtctggta	aggggttcta	tccaagtgtat	1140
atcgctgtgg	agtgggaatc	aatggacag	cccgagaaca	attacctgac	ttggccccc	1200
gtgctggact	cagatggag	cttcttctg	tattccaaac	tgaccgtgga	taagtctcg	1260
tggcagcagg	gaaatgtctt	ttccctgttct	gtgatgcacg	aagcactgca	caatcactac	1320
acccagaagt	ccctgagcct	gtcaccggc	aaa			1353

<210> 43

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab variant

<400> 43

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

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

Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
					35		40			45					

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

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
					65		70		75						

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Asp Glu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ser 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

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

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 Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

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 Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 44

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 44

cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtcaaac ctggcgcatc cgtgaaaatg	60
tcttgcaagg ctagtggcta cacattcaact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca	120
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat	180
aatcagaagt tttaaggcca ggccaccttg acagctgata agagctccctc taccgcctac	240
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaaggcacc	300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc	360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgtt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc	420
ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccgagcc cgtcaccgtg	480
tcttggaaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctgcagtct	540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag	600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa	660
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccacccgtc ctgcaccaga ggacgaggga	720
ggaccatccg tgttccctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact	780
cctgaagtca cctgcgttgt cgtgagcgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac	840
tgg tacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac	900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtccctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960
aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgccc cacctatcga gaagactatt	1020
tctaaagcca agggccagcc tagggAACCA caggtgtacg tgtaccctcc aagccgcgac	1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgacc tgtctggta aggggttcta tccaagtgtat	1140

atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacaagac taccccccct
 gtgcgtggact cagatggag cttcgccctg gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcg
 tggcagcagg gaaatgtctt ttccgttct gtatgcacg aagcactgca caatcactac
 acccagaagt ccctgagcct gtcacccggc aaa 1200
 1260
 1320
 1353

<210> 45
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab
 variant

<400> 45

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Lys Arg Arg Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ser 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
 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
 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 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Leu 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 Leu Thr Trp 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
 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
 Pro Gly Lys
 450

<210> 46
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 46
caggttccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtaaac ctggcgcatc cgtaaaaatg 60
tcttgcaagg cttagtggcta cacattcaact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120
ccaggacgag gactggagtg gatcgagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240
atgcagctga gttcaactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaaggcacc 300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgtt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc 420
ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg 480
tcttggaaaca gtggccccc gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctcagtc 540
agtggctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtc ggggactcag 600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa 660
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccacccctgtc ctgcaccaa gagaagagga 720
ggaccatccg tgttccctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgtatgat tagccggact 780
cctgaagtca cctgcgttgt cgtgagcgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac 840
tgg tacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggg ggaacagtc 900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtccgt actgtctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgccc cacctatcga gaagactatt 1020
tctaaagcca agggccagcc tagggAACCA caggtgtacg tgctgcctcc aagccgcgac 1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgtc tgtctggta aggggttcta tccaagtgt 1140
atcgtgtgg agtggaaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccc 1200
gtgctggact cagatggag cttcttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcg 1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttccctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac 1320
acccagaagt ccctgaggct gtcacccggc aaa 1353

<210> 47

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab variant

<400> 47

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1															

Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr

Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile

59

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Asp Glu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Lys Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

60

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

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 Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 48

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 48

caggccgc	tgcagcagcc	cgagctgaa	ctggtaaac	ctggcgcatc	cgtaaaaatg	60
tcttgcagg	ctatggcta	cacattact	tccataaca	tgcactgggt	gaagcagaca	120
ccaggacgag	gactggagtg	gatcggagca	atctaccctg	gaaacggcga	cacttcttat	180
aatcagaagt	ttaaggcaa	ggccaccctg	acagctgata	agagctcctc	taccgcctac	240
atgcagctg	ttcaactgac	aagtgaagac	tcagcgtgt	actattgcgc	cagaaggcacc	300
tactatggcg	gggattggta	cttcaacgtg	tggggggcag	gaaccacagt	caccgtgagc	360
gccgcttcca	caaaaaggacc	aagcgtttt	ccactggcac	caagctccaa	gtcaaccagc	420
ggagaaacag	cagccctggg	atgtctggtg	aaggactact	tcccagagcc	cgtcaccgtg	480
tcttggaca	gtggccct	gacaagcggg	gtccatactt	ttcccgctgt	gctgcagtct	540
agtggcctgt	acagcctg	aagcgtggc	accgtccctt	cctctagtc	ggggactcag	600
acctatatct	gcaacgtgaa	tcacaaacct	tctaatacaa	aggtcgacaa	gaaagtggaa	660
ccaaaaagtt	gtgataagac	acatacttgc	ccaccttgc	ctgcaccaga	ggacgaggga	720
ggaccatccg	tgtccctgtt	tccacccaaa	cccaaggaca	ctctgatgt	tagccggact	780
cctgaagtca	cctgcgttgt	cgtggacgtg	agccacaagg	acccccgaagt	caaattcaac	840
tggtacgtgg	atggcgtcga	ggtgcataat	gccaacacaa	agccccggga	ggaacagttac	900

61

aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960
aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgccc cacctatcga gaagactatt	1020
tctaaagcca agggccagcc tagggAACCA caggtgtacg tgtaccctcc aagccgcac	1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgacc tgtctggta aggggttcta tccaagtgtat	1140
atcgctgtgg agtggaaatc aaatggacag cccgagaaca attacaagac tacccccct	1200
gtgctggact cagatggag cttcccttg gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcg	1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttccctgttctt gtgatgcacg aagcactgca caatcactac	1320
acccagaagt ccctgaggcct gtcacccggc aaa	1353

<210> 49

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab variant

<400> 49

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly	
100 105 110	

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	
115 120 125	

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	

62

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
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Lys Arg Arg Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Lys Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 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
 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 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Leu 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 Leu Thr Trp 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
 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
 Pro Gly Lys
 450

<210> 50
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

 <400> 50
 caggtccagg tgcagcagcc cgtagctgaa ctggtaaac ctggcgcatc cgtaaaaatg 60
 tcggcaagg ctatggcta cacattact tcctataaca tgcaactgggt gaaggcagaca 120
 ccaggacgag gactggagtg gatcgagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180
 aatcagaagt tttaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240
 atgcagctga gttcaactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaaggcacc 300
 tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggtggcag gaaccacagt caccgtgagc 360
 gcccgttcca caaaaggacc aagcgtgtt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc 420
 ggaggaacag cagccctggg atgtctggta aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg 480
 tcgggaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctgcagtct 540
 agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag 600
 acctatatct gcaacgtgaa tcacaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa 660
 ccaaaaagtt gtgataagac acatacttc ccacccgtc ctgcaccaa gagaagagga 720
 ggaccatccg tggccctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgtatgat tagccggact 780
 cctgaagtca cctgcgttgt cgtggacgtg agccacaagg accccgaagt caaattcaac 840
 tggtaacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagttac 900
 aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgtgc accaggactg gctgaacggc 960
 aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gcccgtcccg cacctatcga gaagactatt 1020
 tctaaagcca agggccagcc tagggacca caggtgtacg tgctgcctcc aagccgcac 1080
 gagctgacta aaaaccaggc ctccctgtg tgtctggta aggggttcta tccaagtgtat 1140
 atcgctgtgg agtggaaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggcccccct 1200
 gtgctggact cagatggag cttttctg tattccaaac tgaccgtgaa taagtctcg 1260
 tggcagcagg gaaatgtctt ttccgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac 1320
 acccagaagt ccctgagcct gtcacccggc aaa 1353

<210> 51
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab variant

 <400> 51

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Asp Glu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

65

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Ala 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 Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 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 Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 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
 Pro Gly Lys
 450

<210> 52
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab
variant

<400> 52		
caggtccagc tgcacgagcc cggagctgaa ctggtaaac ac tggcgcatc cgtaaaaatg		60
tcttgcaagg ctatggcta cacattact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca		120
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat		180
aatcagaagt ttaaaaggcaa ggccacccctg acagctgata agagcttcctc taccgcctac		240
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaaggacc		300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc		360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgtt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc		420
ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgccaccgtg		480
tcttggaaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctgcagtct		540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggacttag		600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa		660

ccaaaaagtt	gtgataagac	acatacttgc	ccacccgttc	ctgcaccaga	ggacgaggga	720
ggaccatccg	tgttcctgtt	tccacccaaa	cccaaggaca	ctctgatgt	tagccggact	780
cctgaagtca	cctgcgttgt	cgtggacgtg	agccacgagg	acccccgaagt	caaattcaac	840
tggtagtgg	atggcgtcga	ggtgcataat	gccaaaacaa	agccccggga	ggaacagttac	900
aactcaacat	atagagtcgt	gagcgccctg	actgtgtgc	accaggactg	gctgaacggc	960
aaggagtata	aatgcgcccgt	gtccaacaag	gcccgtcccc	cacctatcga	gaagactatt	1020
tctaaagcca	agggccagcc	tagggacca	caggtgtacg	tgtaccctcc	aagccgcgac	1080
gagctgacta	aaaaccagg	ctccctgacc	tgtctggta	aggggttcta	tccaagtgtat	1140
atcgctgtgg	agtggaaatc	aatggacag	cccgagaaca	attacaagac	taccccccct	1200
gtgctggact	cagatggag	cttcgcctg	gtgtccaaac	tgaccgtgga	taagtctcgg	1260
tggcagcagg	gaaatgtctt	ttcctgttct	gtgatgcacg	aagcactgca	caatcactac	1320
acccagaagt	ccctgagcct	gtcacccggc	aaa			1353

<210> 53

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab variant

<400> 53

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

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

Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35			40				45					

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

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
			65		70				75				80		

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

Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp	Gly
			100			105						110			

Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
			115			120					125				

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Lys Arg Arg Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg 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

Lys Glu Tyr Lys Cys Ala 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 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Leu 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 Leu Thr Trp 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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 54
 <211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 54		
cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtaaac ctggcgcatc cgtgaaaatg	60	
tcttgcaagg cttagtggcta cacattcaact tcctataaca tgcaactgggt gaagcagaca	120	
ccaggacgag gactggagtg gatcgagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat	180	
aatcagaagt tttaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac	240	
atgcagctga gttcaactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaaggcacc	300	
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc	360	
gccgccttcca caaaaggacc aagcgtgtt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc	420	
ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg	480	
tcttggaaaca gtggccccc gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctcagtc	540	
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtc ggggactcag	600	
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa	660	
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccacccgtc ctgcaccaa gagaagagga	720	
ggaccatccg tggccctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact	780	
cctgaagtca cctgcgttgt cgtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac	840	
tggtacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtc	900	
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgtgc accaggactg gctgaacggc	960	
aaggagtata aatgcgcgt gtccaaacaag gccctgccc cacctatgca gaagactatt	1020	
tctaaagcca agggccagcc tagggAACCA caggtgtacg tgctgcctcc aagccgcgac	1080	
gagctgacta aaaaccaggc ctccctgtc tgtctggta aggggttcta tccaagtgtat	1140	
atcgctgtgg agtggaaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccc	1200	
gtgctggact cagatggag cttctttctg tattccaaac tgaccgtgaa taagtctcg	1260	
tggcagcagg gaaatgtctt ttccctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac	1320	
acccagaagt ccctgaggct gtcacccggc aaa	1353	

<210> 55

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab

69

variant

<400> 55

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Asp Glu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

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

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Trp 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 Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

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 Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

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

Pro Gly Lys
450

<210> 56

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 56

cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtaaac ctggcgcatc cgtaaaaatg 60

tcttgcaagg ctatggcta cacattcaact tcctataaca tgcactgggtt gaagcagaca 120

ccaggacgag gactggagt gatcgagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180

aatcagaagt tttaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240

atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcgtgt actattgcgc cagaaggcacc 300

tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360

gccgcttcca caaaaaggacc aagcgtgttt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc 420

ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg	480
tcttggaca gtggccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctgcagtct	540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag	600
acctatatct gcaacgtcaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa	660
ccaaaaagtt gtgataagac acatactgc ccaccttgc ctgcaccaga ggacgagggg	720
ggaccatccg tggtccgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact	780
cctgaagtca cctgcgttgt cggtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac	840
tgg tacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac	900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgtgc accaggactg gctgaacggc	960
aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgtggg cacctatcga gaagactatt	1020
tctaaagcca agggccagcc tagggAACCA caggtgtacg tgtaccctcc aagccgcgac	1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgacc tgtctggta aggggttcta tccaagtgtat	1140
atcgctgtgg agtggaaatc aaatggacag cccgagaaca attacaagac taccccccct	1200
gtgctggact cagatggag ctgcgcctg gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcg	1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttccctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac	1320
acccagaagt ccctgaggct gtcacccggc aaa	1353

<210> 57

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab variant

<400> 57

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly			
100	105	110	

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 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
 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
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Lys Arg Arg Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 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
 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
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Trp 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 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Leu 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 Leu Thr Trp 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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430 435

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 58
<211> 1353
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 58		
cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctgggtcaaac ctggcgcatc cgtaaaaatg	60	
tcttgcaagg cttagtggcta cacattcaact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca	120	
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat	180	
aatcagaagt tttaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac	240	
atgcagctga gttcaactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaagcacc	300	
tactatggcg gggatttggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc	360	
gccgcgttcca caaaaggacc aagcgtgttt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc	420	
ggaggaacag cagccctggg atgtctggta aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg	480	
tcttggaaaca gtggcgcctt gacaagcggg gtccataactt ttcccgttgt gctgcagtct	540	
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagttt ggggacttag	600	
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tcataataaa aggtcgacaa gaaagtggaa	660	
ccaaaaagggt gtgataagac acatacttgc ccaccttgc tcgtacaaa gagaagagga	720	
ggaccatccg tggccctgtt tccacccaaa cccaggaca ctctgatgt tagccggact	780	
cctgaagtca cctgcgttgt cgtggacgtg agccacggg accccgaagt caaattcaac	840	
tggtaacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac	900	
aactcaacat atagagtctg gagcgtcctg actgtgtgc accaggactg gctgaacggc	960	
aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgtggg cacctatcga gaagactatt	1020	
tctaaagcca agggccagcc tagggAACCA caggtgtacg tgctgcctcc aagccgcac	1080	
gagctgacta aaaaccagggt ctccctgtgt tgtctggta aggggttcta tccaagtgtat	1140	
atcgctgtgg agtggaaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccc	1200	
gtgctggact cagatggag cttctttctg tattccaaac tgaccgtgaa taagtctcg	1260	
tggcagcagg gaaatgtctt ttccctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac	1320	
acccagaagt ccctgagcct gtcacccggc aaa	1353	

<210> 59
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab
 variant

 <400> 59

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

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

 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

 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

 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

 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Asp Glu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ser Val Ser His
 260 265 270
 Lys Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 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
 Lys Glu Tyr Lys Cys Ala 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 Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 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 Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 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
 Pro Gly Lys
 450

<210> 60
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant
 <400> 60
 cagggtccagtc tgccatcgcc cggagctgaa ctgggtcaaac ctggcgcac cgtgaaaatg 60
 tcttgcaagg ctatgtggcta cacattcaact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120
 ccaggacgag gactggagtg gatccggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180

aatcagaagt	ttaaaggcaa	ggccaccctg	acagctgata	agagctcctc	taccgcctac	240
atgcagctga	gttcaactgac	aagtgaagac	tcagcagtgt	actattgcgc	cagaagcacc	300
tactatggcg	gggattggta	cttcaacgtg	tggggggcag	gaaccacagt	caccgtgagc	360
gccgcttcca	caaaaggacc	aagcgtgttt	ccactggcac	caagctccaa	gtcaaccagc	420
ggaggaacag	cagccctggg	atgtctggtg	aaggactact	tcccagagcc	cgtcaccgtg	480
tcttggaaaca	gtggcgcct	gacaagcggg	gtccatactt	ttcccgtgt	gctgcagtct	540
agtggcctgt	acagcctgtc	aagcgtggtc	accgtccctt	cctctagttc	ggggactcag	600
acctataatct	gcaacgtgaa	tcacaaacct	tctaatacaa	aggtcgacaa	gaaagtggaa	660
ccaaaaagg	gtgataagac	acatacttgc	ccacccctgtc	ctgcaccaga	ggacgaggga	720
ggaccatccg	tgttcctgtt	tccacccaaa	cccaaggaca	ctctgtatgt	tagccggact	780
cctgaagtca	cctgcgtgt	cgtgagcgtg	agccacaagg	accccgaagt	caaattcaac	840
tgg tacgtgg	atggcgtcga	ggtgcataat	gccaaaacaa	agccccggga	ggaacagttac	900
aactcaacat	atagagtctgt	gagcgtcctg	actgtgtc	accaggactg	gctgaacggc	960
aaggagtata	aatgcgcgt	gtccaacaag	gccctgccc	cacctatcga	gaagactatt	1020
tctaaagcca	aggccagcc	tagggacca	caggtgtacg	tgtaccctcc	aagccgcgac	1080
gagctgacta	aaaaccagg	ctccctgacc	tgtctggta	aggggttcta	tccaagtgtat	1140
atcgctgtgg	agtggaaatc	aatggacag	cccgagaaca	attacaagac	tacccccc	1200
gtgctggact	cagatggag	cttcgcctg	gtgtccaaac	tgaccgtgga	taagtctcgg	1260
tggcagcagg	gaaatgtctt	ttccctgttct	gtgtatgcacg	aagcactgca	caatcactac	1320
acccagaagt	ccctgaggct	gtcacccggc	aaa			1353

<210> 61

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab variant

<400> 61

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

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

Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				35			40			45					

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

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70					75					80	

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 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
 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
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Lys Arg Arg Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ser Val Ser His
 260 265 270
 Lys Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 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
 Lys Glu Tyr Lys Cys Ala 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 Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Leu 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 Leu Thr Trp 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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 62

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 62

caggtccagc	tgcagcagcc	cggagctgaa	ctggtaaac	ctggcgcatc	cgtaaaaatg	60
tcttgcaagg	ctagtggcta	cacattcaact	tcctataaca	tgcactgggt	gaaggcagaca	120
ccaggacgag	gactggagtg	gatcggagca	atctaccctg	gaaacggcga	cacttcttat	180
aatcagaagt	ttaaaggcaa	ggccaccctg	acagctgata	agagctcctc	taccgcctac	240
atgcagctga	gttcactgac	aagtgaagac	tcagcagtgt	actattgcgc	cagaaggcacc	300
tactatggcg	gggatggta	cttcaacgtg	tggggggcag	gaaccacagt	caccgtgagc	360
gccgcttcca	caaaaggacc	aagcgtgttt	ccactggcac	caagctccaa	gtcaaccagc	420
ggaggaacag	cagccctggg	atgtctggtg	aaggactact	tcccagagcc	cgtcaccgtg	480
tcttggaaaca	gtggcgccct	gacaagcggg	gtccataactt	ttcccgctgt	gctcagttct	540
agtggcctgt	acagcctgtc	aagcgtggtc	accgtccctt	cctctagttct	ggggacttcag	600
acctatatct	gcaacgtgaa	tcacaaacct	tctaatacaa	aggtcgacaa	gaaagtggaa	660
ccaaaaggat	gtgataagac	acatacttgc	ccaccttgc	ctgcaccaaa	gagaagagga	720
ggaccatccg	tgttcctgtt	tccacccaaa	cccaaggaca	ctctgtatgt	tagccggact	780
cctgaagtca	cctgcgttgt	cgtgagcgtg	agccacaagg	accccgaaat	caaattcaac	840
tggtacgtgg	atggcgtcga	ggtgcataat	gccaaaacaa	agccccggga	ggaacagtac	900
aactcaacat	atagagtctgt	gagcgtcctg	actgtgtc	accaggactg	gctgaacggc	960
aaggagtata	aatgcgccgt	gtccaacaag	gccctgccc	cacctatcga	gaagactatt	1020
tctaaagcca	agggccagcc	taggaaacca	caggtgtacg	tgctgcctcc	aagccgcac	1080
gagctgacta	aaaaccaggt	ctccctgctg	tgtctggta	aggggttcta	tccaagtgt	1140

atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccct
 gtgcgtggact cagatggag cttcttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcg
 tggcagcagg gaaatgtctt ttccctgtct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac
 acccagaagt ccctgagcct gtcacccggc aaa 1200
 1260
 1320
 1353

<210> 63
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab
 variant

<400> 63

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

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

80

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Asp Glu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ser Val Ser His
260 265 270

Lys Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Glu Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Lys Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

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 Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

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

Pro Gly Lys
450

<210> 64
<211> 1353
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 64
caggtccagg tgcagcagcc cggagctgaa ctggtaaac ctggcgcatc cgtaaaaatg 60
tcttgcaagg ctagtggcta cacattcaact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120
ccaggacgag gactggagtg gatcgagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240
atgcagctga gttcaactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaagcacc 300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgtt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc 420
ggaggaacag cagccctggg atgtctggta aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg 480
tcttggaaaca gtggccctt gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gtcagtc 540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtc ggggactcag 600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa 660
ccaaaaggat gtgataagac acatacttgc ccacccctgtc ctgcaccaga ggacgaggga 720
ggaccatccg tgccctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact 780
cctgaagtca cctgcgttgt cgtgagcgtg agccacaagg accccgaagt caaattcaac 840
tgg tacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac 900
aactcaacat atagagtctg gagcgtccctg actgtgtgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggagtata aatgcgaggt gtccacaag gccctgccc cacctatcaa gaagactatt 1020
tctaaagcca agggccagcc tagggAACCA caggtgtacg tgtaccctcc aagccgcgac 1080
gagctgacta aaaaccaggat ctcctgacc tgtctggta aggggttcta tccaagtgtat 1140
atcgctgtgg agtggaaatc aaatggacag cccgagaaca attacaagac taccctcc 1200
gtgctggact cagatggag cttccctgtc gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcg 1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttccctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac 1320
acccagaagt ccctgaggct gtcacccggc aaa 1353

<210> 65

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - rituximab variant

<400> 65

Gln	Val	Gln	Leu
1		5	

Ser	Val	Lys	Met
20		25	

Asn	Met	His	Trp
35		40	

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 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
 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
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Lys Arg Arg Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ser Val Ser His
 260 265 270
 Lys Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 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
 Lys Glu Tyr Lys Cys Glu Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Lys Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Leu 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 Leu Thr Trp 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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 66
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> synthetic monoclonal antibody nucleotide sequence - rituximab variant

<400> 66		
caggtccaggc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtaaac ctggcgcatc cgtgaaaatg		60
tcttgcaagg ctagtggcta cacattcaact tcctataaca tgcaactgggt gaagcagaca		120
ccaggacgag gactggagt gatcgagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat		180
aatcagaagt tttaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac		240
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaaggacc		300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc		360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgtt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc		420
ggagaaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg		480
tcttggaaaca gtggcgcctt gacaagcggg gtccataactt ttccccctgt gctgcagtct		540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag		600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa		660
ccaaaaagtt gtgataagac acatactgc ccaccttgc ctgcaccaaa gagaagagga		720
ggaccatccg tggccctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgt tagccggact		780
cctgaagtca cctgcgttgt cgtgagctg agccacaagg accccgaagt caaattcaac		840
tggtacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac		900

aactcaacat atagagtctg gagcgtccctg acttgtctgc accaggactg gctgaacggc	960
aaggagtata aatgcgaggt gtccaaacaag gccctgcccc caccttatcaa gaagactatt	1020
tctaaagcca agggccagcc tagggAACCA caggtgtacg tgctgcctcc aagccgcac	1080
gagctgacta aaaaccaggc ctccctgctg tgtctggta aggggttcta tccaagtgtat	1140
atcgctgtgg agtggaaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccct	1200
gtgctggact cagatggag cttcttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcg	1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttccctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac	1320
acccagaagt ccctgagcct gtcacccggc aaa	1353

<210> 67
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic polypeptide sequence - variant trastuzumab light chain

<400> 67

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

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

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

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

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro	
85 90 95	

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	

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	

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

85

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

<210> 68
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic polypeptide sequence - variant rituxiumab light chain
 <400> 68

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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
 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

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
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 69
<211> 639
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic nucleotide sequence - variant rituxiumab light chain

<400> 69
cagattgtcc tgtctcagag tcccgcatac ctgtcagcaa gcccgggga gaaggtagcc 60
atgacatgcc gagccagctc ctctgtcagc tacatccact gttccagca gaagccaggc 120
agttcaccta aaccatggat ctacgcccaca tctaacctgg ctatggagt gcccgtccgg 180
tttccggct ctgggagtgaa acatcatac agcctgacta ttccagagt ggaggccgaa 240
gacgccccta cctactattt ccagcagtgg acctctaattt cccctacattt cggcgaaaa 300
actaagctgg agatcaaaag gactgtggca gccccttctg ttttcattttt tccacccagg 360
gacgaacagc tgaaatcagg aaccgcttcc gtggctgtc tgctgaacaa ctttaccccc 420
cgcgaggcaa aggtgcagtggaaatcgat aacgcccgc agtccggcaa ttctcaggag 480
agtgtgaccg aacaggactc aaaggatagc acatattccc tgagctccac tctgaccctg 540
tccaaagctg attacgaaaa gcataaaagtgtatgcatgtg agtccaccca ccagggctg 600
agttagtcccc tcacaaagag tttcaataga ggagagtgt 639

<210> 70
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

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

Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
20								25					30		

Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
35						40					45				

Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
50					55					60					

Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
65					70				75				80		

Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
						85		90				95			

Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
100								105				110			

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic IgG polypeptide sequence CH1 for IgG1, IgG3 and IgG4

<400> 71

Val Asp Lys Arg Val
1 5

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic 'upper' hinge IgG polypeptide sequence for IgG1

<400> 72

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
1 5 10

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic 'core' hinge IgG polypeptide sequence for IgG1 and IgG2

<400> 73

Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 74

<211> 8

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic 'lower' hinge (CH2) IgG polypeptide sequence for IgG1,
IgG3 and IgG4

<400> 74
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1           5

<210> 75
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic IgG polypeptide sequence CH1 for IgG2

<400> 75
Val Asp Lys Thr Val
1           5

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic 'upper' hinge IgG polypeptide sequence for IgG2

<400> 76
Glu Leu Lys Cys Cys Val Glu
1           5

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic 'lower' hinge (CH2) IgG polypeptide sequence for IgG2

<400> 77
Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
1           5

<210> 78
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic 'upper' hinge IgG polypeptide sequence for IgG3

<400> 78
Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
1           5           10

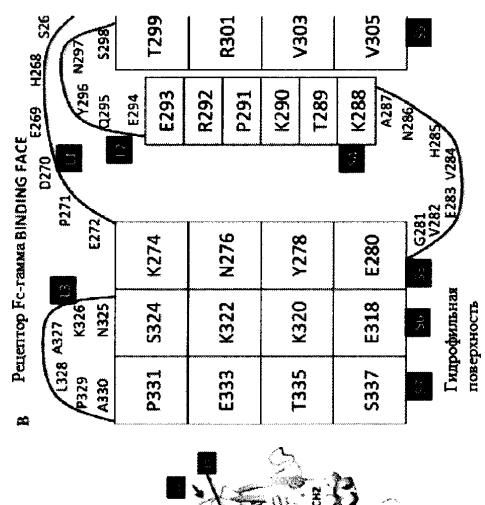
<210> 79
<211> 45
<212> PRT

```

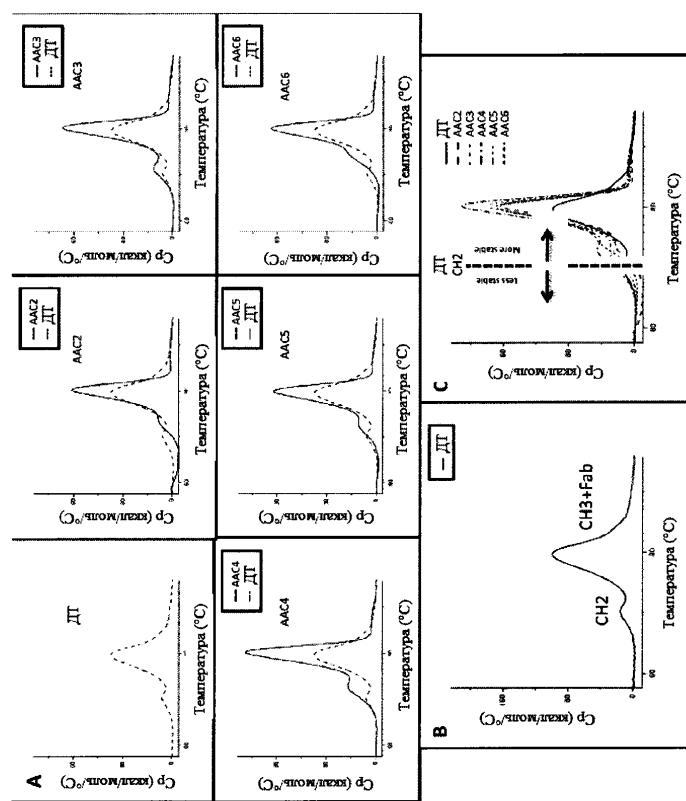
89

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic 'core' hinge IgG polypeptide sequence for IgG3
 <400> 79
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 1 5 10 15
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro
 20 25 30
 Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 35 40 45
 <210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic 'upper' hinge IgG polypeptide sequence for IgG4
 <400> 80
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 1 5
 <210> 81
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic 'core' hinge IgG polypeptide sequence for IgG4
 <400> 81
 Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5

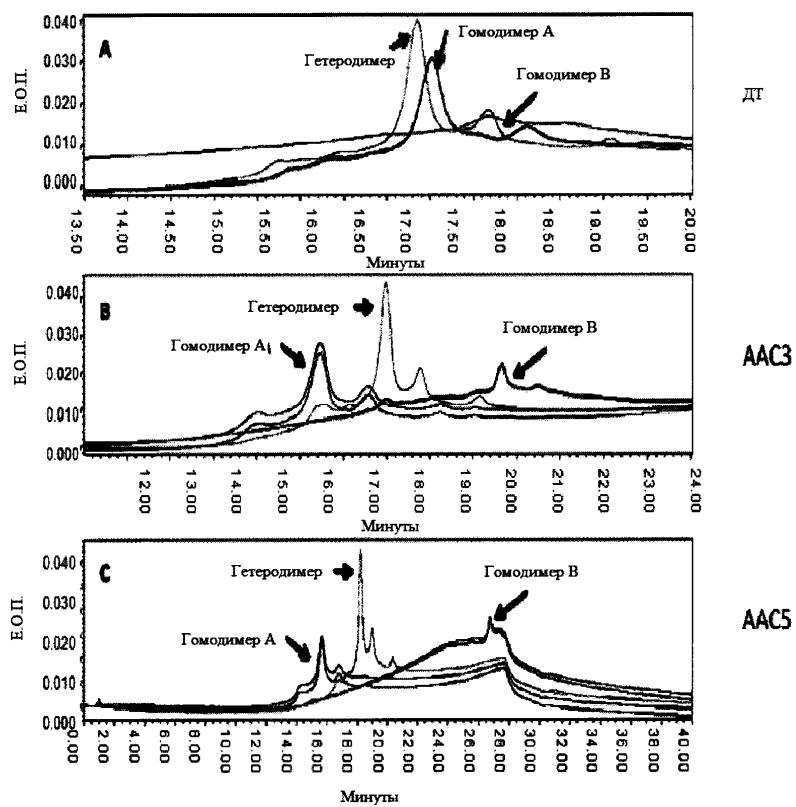
Фиг. 1А



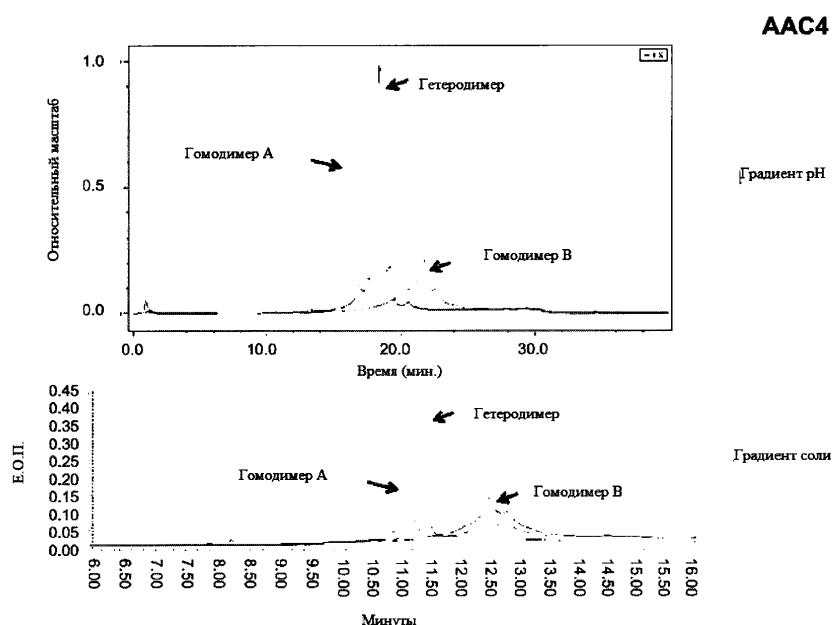
ФИГ. 2



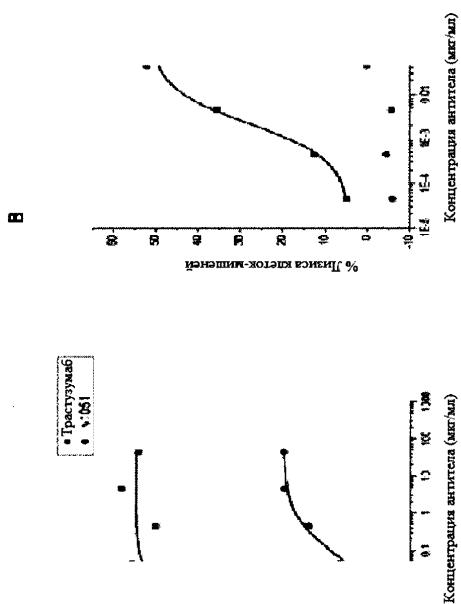
Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 4



Фиг. 5**SEQ ID NO:1:**

EPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:2:

> Трастузумаб, тяжелая цепь

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTR
 YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLV
 TVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTVKDKVVEPKSCDKTHTCPPCA
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:3:

> Трастузумаб, легкая цепь

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP
 SRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:4:

> Ритуксимаб, тяжелая цепь

QVQLQQPGAEVLKGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGD
 TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLSEDAVYYCARSTYYGGDWYFNWGAGT
 TVTVSAASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTVKDKVVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

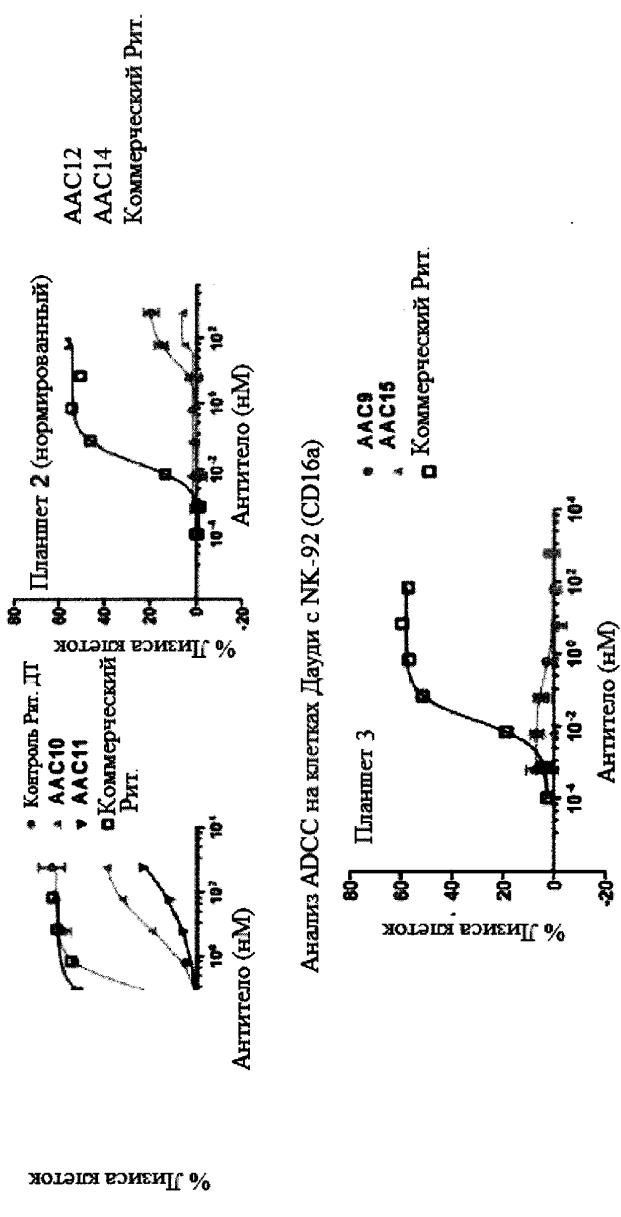
SEQ ID NO:5:

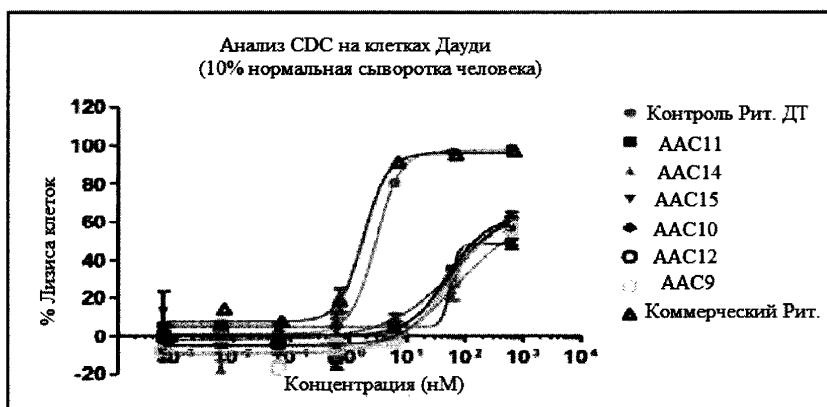
> Ритуксимаб, легкая цепь

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYATSNLASGPVR
 FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФИГ. 6

Анализ ADCC на клетках Дауди с NK-92 (CD16a) Анализ ADCC на клетках Дауди с NK-92 (CD16a)



Фиг. 7

Фиг. 8

SEQ ID NO:	Тип	
6	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRTFISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPVALQSSGLYSLSVVTPSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPCCPAPEAAGGPSVFLPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK
8	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRTFISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPVALQSSGLYSLSVVTPSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPCCPAPEAAGGPSVFLPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVYPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
10	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRTFISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPVALQSSGLYSLSVVTPSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPCCPAPEDEGGPSVFLPPK KDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP VLDDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK
12	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRTFISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPVALQSSGLYSLSVVTPSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPCCPAPEADEGGPSVFLPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK

14	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPAKAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPETCVCVVDSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP PGK
16	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPAKAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPETCVCVVDSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP PGK
18	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPAKAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPETCVCVVDSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP PGK
20	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPAKAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPETCVCVVDSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYMTP PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP PGK
22	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPAKAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPETCVCVVDSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE

		QVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
24	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ TYICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPARRGGPSVLFPPK PKDTLMISRTPETCVVVDSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ TYICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPKRRGGPSVLFPPK PKDTLMISRTPETCVVVDSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ TYICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPKAKGGPSVLFPPK PKDTLMISRTPETCVVVDSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ TYICNVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPSVLFPPK KDTLMISRTPETCVVVDSHKRPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCL VKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ

		TYICNVNHHKPSNTKVDDKVERPKSCDKTHTCPPCPAPELKGGPSVFLPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKLPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK
35	полипептид	QVQLQQPGAEVKGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNWGAGTTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSS LGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKVERPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL PPPKDKTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKP EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKLPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYVPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLSPGK
37	полипептид	QVQLQQPGAEVKGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNWGAGTTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSS LGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKVERPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL PPPKDKTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKP EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKLPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYVPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYL TWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLSPGK
39	полипептид	QVQLQQPGAEVKGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNWGAGTTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSS LGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKVERPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL FPPPKDKTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKP EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKLPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYVPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
41	полипептид	QVQLQQPGAEVKGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNWGAGTTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSS LGTQTYICNVNHHKPSNTKVDDKVERPKSCDKTHTCPPCPAPKRGGPSVFL FPPPKDKTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKP EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKLPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYVPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYL TWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

43	полипептид	QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSTAYMQLSSLTSEDAVYYC ARSTYGGDWYFNWAGTTVTVAASAKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPEDEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVSVSHEDPEVKFNWY/DGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAG QPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
45	полипептид	QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSTAYMQLSSLTSEDAVYYC ARSTYGGDWYFNWAGTTVTVAASAKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPKRGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVSVSHEDPEVKFNWY/DGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAG QPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQ SLSLSPGK
47	полипептид	QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSTAYMQLSSLTSEDAVYYC ARSTYGGDWYFNWAGTTVTVAASAKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPEDEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHKDPEVKFNWY/DGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAG QPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
49	полипептид	QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSTAYMQLSSLTSEDAVYYC ARSTYGGDWYFNWAGTTVTVAASAKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPKRGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHKDPEVKFNWY/DGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAG QPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQ SLSLSPGK
51	полипептид	QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSTAYMQLSSLTSEDAVYYC ARSTYGGDWYFNWAGTTVTVAASAKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPEDEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY/DGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTIKAG

		QPREPQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK
53	полипептид	QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYC ARSTYGGDWYFNWVGAGTTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRGGPSVFL FPPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALWAPIEKTIKAKG QPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK
55	полипептид	QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYC ARSTYGGDWYFNWVGAGTTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRGGPSVFL FPPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALWAPIEKTIKAKG QPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK
57	полипептид	QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYC ARSTYGGDWYFNWVGAGTTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRGGPSVFL FPPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALWAPIEKTIKAKG QPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK
59	полипептид	QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYC ARSTYGGDWYFNWVGAGTTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRGGPSVFL FPPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALWAPIEKTIKAKG QPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK
61	полипептид	QVQLQQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYC ARSTYGGDWYFNWVGAGTTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSS

		LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRGGPSVFL FPPKPDKTLMISRTPEVTCVVSVSHKDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCAVSNKALPAPIKTISKAKG QPREPQVYLPPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
63	полипептид	QVQLQQPGAEVLKGASVKSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNWGAGTTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAA LGCLVKDYZFPEPVTVSNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL FPPKPDKTLMISRTPEVTCVVSVSHKDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCEVSNKALPAPIKTISKAKG QPREPQVYLPPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY YKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
65	полипептид	QVQLQQPGAEVLKGASVKSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNWGAGTTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGTAA LGCLVKDYZFPEPVTVSNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRGGPSVFL FPPKPDKTLMISRTPEVTCVVSVSHKDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCEVSNKALPAPIKTISKAKG QPREPQVYLPPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
67	полипептид	DIQMKTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFYSGVPSRSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
68	полипептид	QIVLSQSPAIALSASPGEKVMTCRASSSVYIHWFQQKPGSSPKPWYIATS NLASGVPPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
7	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTCAGCCAGGA GGATCTCTGCACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTGAATCTATCCCCTAAATGGATAACCCGGTATGCCACTC CGTGAAGGGGAGGTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAACCGCTGTGTA ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCTGGTGAAGTGTAGCTCCGCTTACCAAGGGCC CACTGTGTTCCCCCTGGCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCAGCCTGTGAC

		<p>CGTGAGTTGGAACTCAGGCAGCCCTGACAAGCGGGAGTGCACACTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCCTGTGGTGA CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCATAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGGCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACCC GCCGGAGGACCTAGCGTGTCCCTGTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGTCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCAGGTGACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACGTACCAAG AACCAAGGTGCTCCGTGTGCTGGTAAAGGCTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACT GACCTGCCCTCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTCTGTATT CAAGCTGACAGTGGATAAATCTGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA GTTGTCAGTGTGATGCAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA</p>
9	ДНК	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTG CTTACCTGCAGATGACAGCTGCCAGGCCAGATAACCGCTGTGACT ATTGCACTGATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCTGGCTCTGACAGTGTGAGCTCCGCCCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTCCCTGGCTCTTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGCTGGTGAAGGACTATTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAAGTTGAACTCAGGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCCTGTGGTGA CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCATAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGGCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACCC GCCGGAGGACCTAGCGTGTCCCTGTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGTCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCAGGTGACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACGTACCAAG AACCAAGGTGCTCCGTGTGCTGGTAAAGGCTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACT GACCTGCCCTCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTCTGTATT CAAGCTGACAGTGGATAAATCTGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA GTTGTCAGTGTGATGCAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA</p>

		GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
11	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCGCACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCACTAATGGATAACACCCGGTATGCCACTC CGTGAAGGGGAGGTTACTATTAGCGCGATACATCCAAAAACACTG CTTACCTGAGATGAAACAGCCCTGCGAGCCGAAGATAACCGCTGTGACT ATTGAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCCTGGTGAAGTGAGCTCCGCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTCCCTGGCTCCTTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGAACTCAGGCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTC CTGCTGTGCTGCACTGAAAGCCTGGGACACAGACTTATATCTGCAACGTGA CAGTGCCTAAAGTTCAAGCCTGGGACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCAAAG AGCTGTATAAGACCCACACCTGCCCTCCGTCCAGCTCCAGAAC GAGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTCCCCCTAAGCCAAAGACACT CTGATGTTCCAGGACTCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCCTAGTCAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGGCCAAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCGCAGAGACGAACGTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGT ATTGCTGTGGAGTGGAAATCAAATGGACGCCAGAGAACAAATTACAA GACCACACCTCCAGTGTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAGCTGACAGTGGATAAAATCTCGATGGCAGCAGGGAAACGTGTT AGTTGTCAGTGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGAACTCAGGCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTC
13	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCGCACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCACTAATGGATAACACCCGGTATGCCACTC CGTGAAGGGGAGGTTACTATTAGCGCGATACATCCAAAAACACTG CTTACCTGAGATGAAACAGCCCTGCGAGCCGAAGATAACCGCTGTGACT ATTGAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCCTGGTGAAGTGAGCTCCGCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTCCCTGGCTCCTTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGAACTCAGGCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTC

		CTGCTGTGCTGCACTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTTGA CACTGCCAAGTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTGTCCAGCTCCAGCCGAC GAGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTTCCCCCTAAGCCAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCAGGGTGAACCTGCGTGGTGGACGT GTCTCACAGGAGACCCGAAGTGAAGTCACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAGAGAGAGGAACAGTACAA TCCACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGTCACCAAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAGGACTAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATGAAAAAACCATCTCAAGGCCAAGGCCAGCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGGTACCCACCCAGCAGAGACGAACGTACCAAG AACCAAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTAAAGGCTTATCTTAGTGT ATTGCTGTGGAGTGGAAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAAATTACAA GACCACACCTCCAGTGTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAGCTGACAGTGGATAAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTT AGTTGTTCACTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG AGCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAA
15	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTGAATCTATCCCCTAAATGGGATACACCCGTATGCCACTC CGTGAAGGGGAGGTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAACCGTGTGTACT ATTGAGTCGATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCTGGTGAAGTGGACTCCGCTCTACCAAGGGCC CAGTGTCTCCCTGGCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTCGGCAGCTGTGAC CGTGAAGTGGAACTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTT CTGCTGTGCTGAGTCAGCAGGGCTGTACTCCCTGTCCTGTGGTGA CAGTGCCTGAACTCAAGCCTGGGACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTGTCCAGCTCCAGGCCAG GCCGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTCCCCCTAAGCCAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCAGGGTGAACCTGCGTGGTGGACGT GTCTCACAGGAGACCCGAAGTGAAGTCACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAGAGAGAGGAACAGTACAA TCCACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGTCACCAAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAGGACTAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATGAAAAAACCATCTCAAGGCCAAGGCCAGCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGGTACCCACCCAGCAGAGACGAACGTACCAAG AACCAAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTAAAGGCTTATCTTAGTGT ATTGCTGTGGAGTGGAAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAAATTACAA GACCACACCTCCAGTGTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAGCTGACAGTGGATAAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTT AGTTGTTCACTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG AGCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAA

17	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGAGGCCAGGA GGATCTCTGCAGTGA GTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCCTAAATGGATAACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCCCGATACTCCAAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGGCCGAAGATAACCGCTGTGACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGGAGCAGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCCTGGTGAAGTGAAGCTCCGCTTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTCCCCCTGGCTCTTAGTAAATCCACCTGGAGGGAC AGCGCTCTGGGATGTCTGGTAAGGACTATTCCCGAGCCTGTGAC CGTAGTTGAACTCAGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTT CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTGTGGTGA CAGTGCCTAAGCTGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAAGTGGAGGCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCAGCTCCAGAAC CTGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTCCCCCTAAGCAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGGACGT GTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG
19	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGAGGCCAGGA GGATCTCTGCAGTGA GTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCCTAAATGGATAACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCCCGATACTCCAAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCAGGCCGAAGATAACCGCTGTGACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGGAGCAGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCCTGGTGAAGTGAAGCTCCGCTTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTCCCCCTGGCTCTTAGTAAATCCACCTGGAGGGAC AGCGCTCTGGGATGTCTGGTAAGGACTATTCCCGAGCCTGTGAC CGTAGTTGAACTCAGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTT CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTGTGGTGA CAGTGCCTAAGCTGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAAGTGGAGGCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCAGCTCCAGAAC CTGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTCCCCCTAAGCAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGGACGT GTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG

		TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCAGCAGAGACGAACGTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACATGTCCTGGTAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACGCCAGAGAACAAATTACAA GACCACACCTCCAGTGTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTGATGGCAGCAGGGGAACGTGTT AGTTGTCAGTGTGACATGAAGGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG AGCCTGTCCTGTCTCCGGCAAA
21	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGACTGGTGCAGGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCCTAAATGGGATACACCCGGTATGCCACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCCAGGCCAGAAGATAACCGCTGTGACT ATTGCACTGAGTGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGGACCTCTGGTACAGTGAGCTCCGCCCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCCTGGCTCTTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCCTGGTGAAGGACTATTCCCCGAGCCTGTGAC CGTGAAGTGGAACTCAGGCCCTGACAAGCGGAGTCACACTTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAGCCTGGTGAAGGACTCTCCCTGTGTTGGTGA CAGTGCAGTTCAGCCTGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGGCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGCCAGCTCCAGAAGT CTGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGTGCCACCCAGCAGAGACGAACGTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTGGTAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACGCCAGAGAACAGATAACAT GACCTGCCCTCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA CAAGCTGACAGTGGATAAATCTGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA GTTGTCAGTGTGACATGAAGGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA GCCTGTCCTGTCTCCGGCAAA
23	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGACTGGTGCAGGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCCTAAATGGGATACACCCGGTATGCCACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCCAGGCCAGAAGATAACCGCTGTGACT ATTGCACTGAGTGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG

		GGACAGGGGACCTGGTACAGTGAGCTCCGCCTACCAAGGGCCC CAGTGTTTCCCCCTGGCTCTTAGTAAATCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCGGTGAAGGACTATTCCCGAGCCTGTGAC CGTAGTTGAACTCAGGCCTGACAAGCGAGTGACACTTTCTGCTGTCAGTGCAAGCTGGTACTCCCTGTCTGTGTA CAGTCCAAGTCAAGCCTGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTAAATACAAAAGTGGACAAGAAAAGTGGAGCCAAAG AGCTGTATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCAGCTCCAGGCCAGA AAGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTCTTAAGCCAAGAACACT CTGATGATTCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTTCACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTCAAAGTCAGTAATAAGCCCTGCC TGCTCCAATGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAGGCCAGCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACGTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTCTGGTAAAGGCTTATCCTAGTGT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACT
25	ДНК	GAGGTGAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGGTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTG CTTACCTGAGATGAAACAGCTGCGAGCGGAAGATAACCGCTGTGTACT ATTGAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCTGGTACGTGAGCTCCGCCCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTCCCCCTGGCTCTTAGTAAATCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCGGTGAAGGACTATTCCCGAGCCTGTGAC CGTAGTTGAACTCAGGCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTCTGCTGTCAGTGCAAGCTGGTACTCCCTGTCTGTGTA CAGTCCAAGTCAAGCCTGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTAAATACAAAAGTGGACAAGAAAAGTGGAGCCAAAG AGCTGTATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCAGCTCCAGGCCAGA AAGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTCTGGTAAAGGCCAGCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACGTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTCTGGTAAAGGCTTATCCTAGTGT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACT

		GACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAAGCTTCTCTGTATTG CAAGCTGACAGTGGATAATCTCGATGGCAGCAGGGAACGTGTTA GTTGTTCAAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA GCCCTGTCCTGTCTCCCCGAA
27	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGGAGGACTGGTGAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCCTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTG CTTACCTGCAGATGACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGACT ATTGCACTGAGTGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCTGGTGAAGTGGAGCTCCGCTTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTCCCCCTGGCTCTAGTAAATCCACCTTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCAGGCTGTGAC CGTGAGTTGAACTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC CTGCTGTGCTGAGTCAGTCAGCGGGCTGTACTCCCTGCTCTGTGGTGA CAGTCCAAGTTCAAGCCTGGGACACAGACTTATATGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAAGTGGAGGCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCAGCTCCAAAGAGA AGAGGAGGACCTAGCGTGTCCCTGTTCCCCCTAAGCCAAAGACACT CTGATGATTTCAAGGACTCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGAGCT GTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCTGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAGGACTGG CTGAACCGGGAGGAGTATAAGTGCAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCAAGGG AGCCCCAGGTGACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACGTGACCAAG AACCAGGTGTCCTGCTGTGCTGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGTAT ATTGCTGTGGAGTGGAAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACT GACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTGTATTG CAAGCTGACAGTGGATAATCTCGATGGCAGCAGGGAACGTGTTA GTTGTTCAAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA GCCCTGTCCTGTCTCCCCGAA
29	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGGAGGACTGGTGAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCCTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTG CTTACCTGCAGATGACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGACT ATTGCACTGAGTGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCTGGTGAAGTGGAGCTCCGCTTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTCCCCCTGGCTCTAGTAAATCCACCTTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCAGGCTGTGAC CGTGAGTTGAACTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC

		CTGCTGTGCTGAGTCAAGCGGGCTGTAECTCCCTGCCTCTGGTGA CAAGTCCAAGTCAAGCCTGGCACACAGACTTATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCAGCTCAAAGGC AAGGGAGGACCTAGCGTGTCCCTGTTCCCCCTAACGCCAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTCACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCTCGTGAGCGTGTGACCGTGCTGCACCAAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTCAAAGTCAGTAAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAAACCATCTCTAACGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTGAAAGGCTTATCTTAGTGT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACT GACCTGCCCTCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTCTGTATT CAAGCTGACAGTGGATAATCTGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA GTTGTTAGTGTGATGAAGGCCCTGACAATCATTACACTCAGAAGA GCCGTCCCTGTCCTCCCGCAAA
31	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCACTC CGTGAAGGGGAGGTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTG CTTACCTGAGATGAACAGCCTCGCAGCCGAAGATAACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCCTGGTACAGTGAAGCTCCGCCTTACCAAGGGCC CAGTGTGTTCCCTGCTCCCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGAACTCAGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTT CTGCTGTGCTGAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGCTCTGTGGTGA CAGTCCAAGTCAAGCTGGCACACAGACTTATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCAGCTCCAGAACTG CTGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTCCCCCTAACGCCAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACAGAGACCCGAAGTGAAGTCACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCTCGTGAGCGTGTGACCGTGCTGCACCAAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTCAAAGTCAGTAAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAAACCATCTCTAACGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTGAAAGGCTTATCTTAGTGT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACT GACCTGCCCTCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTCTGTATT CAAGCTGACAGTGGATAATCTGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTA GTTGTTAGTGTGATGAAGGCCCTGACAATCATTACACTCAGAAGA GCCGTCCCTGTCCTCCCGCAAA

33	ДНК	GAGGTGCACTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTCGCACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGGCTCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCCTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTAAGGGGAGGTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAACCGCTGTGACT ATTGCAGTCGATGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCTGGTACAGTGAGCTCCGCCCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTCCCCCTGGCTCTTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCGGTGAAGGACTATTCAGCCTGTGAC CGTGAAGTTGAACTCAGGCCCTGACAAGCGAGTGACACTTT CTGCTGTGCTGCAAGCAGGGCTGTACTCCCTGCTCTGTGGTGA CAGTCCAAGTCAAGCCTGGGACACAGACTTATCTGCAACGTGA ATCATAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGGCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCAGCTCCAGAACTG AAGGGAGGACCTAGCGTGTCCCTGTTCCCCCTAACGACAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTCACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGCATAATGCTAACAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAC TCCACTTATCGCGTGTGAGCGTGTGACCCTGTCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTCAAAGTCAAGTAAAGAAGCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTAACGGCCAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGGTGTGCCCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAAGGTGTCCCTGCTGTGTTGAAAGGCTTATCCTAGTGTAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACT GACCTGGCCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTCTGTATT CAAGCTGACAGTGGATAAACTCGATGGCAGCAGGGAACGTGTTA GTTGTCAGTGTGATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA GCCCTGCTCCCTGCTCCCCGGAA
34	ДНК	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCGTCTGCATCTGTAGGA GACAGAGTCACCATCACTTGCCTGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGC TGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAAGGGAAAGGCCCTAACGCTCTGAT CTATTCTGCATCCTTTTGTCAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGC AGTCGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT GAAGATTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCATTACACTACCCACCCA CTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAACGAACGTGGCTGCA CCATCTGCTTCATCTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGCTGTGAATAACTCTATCCAGAGAGGCCA AAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCAAATGGGTAACCCCAA GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA GCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACAGGAGAACACAAAGTC TACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTGCCGTACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
36	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACGGTCAAACCTGGCG ATCCGTAAAATGCTTGTCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGGAGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCCCTGGAAACGGCGACACTTCTATAATCAGAAGT

		TTAAAGGCAAGGCCACCTGACAGCTGATAAGAGCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGACTATT GCGCCAGAACCTACTATGGGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAGGACC AAGCGTGTTCACGGCACCAAGCTCAAGTCACCCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCGGTAAGGACTACTCCCAGAGCCGTC ACCGTGCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTCCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATGCAACGTG AATCACAAACCTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGATAAGACACATACTGGCCACCTTGTCTGCACCAAGGAGCT GCTGGGAGGACCATCGTGTCTGTGTTCCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTGTGGACGT GAGGCCACGGAGGACCCGAAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGATAATGCCAAACAAAGCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGCTGTGAGCGTCTGTACTGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTAAATGCAAGGTGTCACAAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCAGCCTAGG
38	ДНК	CAGGTCACGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCG ATCCGTAAAATGCTTGCAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCTCTGGAAACGGCAGACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCTGACAGCTGATAAGAGCTCCCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGACTATT GCGCCAGAACCTACTATGGGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAGGACC AAGCGTGTTCACCTGGCAGGACTCAGTCCACCAAGTCACCCAGGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCGGTAAGGACTACTTCCAGAGCCGTC ACCGTGCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTCCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATGCAACGTG AATCACAAACCTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGATAAGACACATACTGGCCACCTTGTCTGCACCAAGGAGCT GCTGGGAGGACCATCGTGTCTGTGTTCCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTGTGGACGT GAGGCCACGGAGGACCCGAAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGATAATGCCAAACAAAGCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGCTGTGAGCGTCTGTACTGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTAAATGCAAGGTGTCACAAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCAGCCTAGG

		GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCTCAAGCCGGGACGAGCTGACTAA AAACCAAGGTCTCCCTGCTGTCTGGTGAAGGGGTTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCAGAACATTACC TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTCTGTATT CAAACGTACCGTGGATAAGTCTGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCACCCGGCAA
40	ДНК	CAGGTCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAAGTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTAAAATGTCTTGCAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCCTGACAGCTGATAAGAGCTCTTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTCCACTGGCACCAAGCTCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGGACTACTCCAGAGCCGTC ACCGTGTCTGGAACAGTGGCCCTGACAAGGGGGCCATACTTT CCCGCTGTGCTGAGTCTAGTGGCTGTACAGCCTGTCAGCGTGGC ACCGTCCCTCCCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAACCTTCAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAACAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTGCCACCTTGTCTGCACCAAGAGGA CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCTGAGTCAACTGCTGGTGTGGACGT GAGCCACGAGGACCCGAAGTCAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGATAATGCCAAAACAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGACTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTAAATGCAAGGTGTCACAGGCGCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCTTAGG GAACCAAGGTGTACGTGACCTCTCAAGCCGGACGAGCTGACTAA AAACCAAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCAGAACATTACA AGACTACCCCTGGACTCAGATGGGAGCTTGTGGCTGGCAGCAGGGAAATGTCTT CCCTGAGCCTGTCACCCGGCAA
42	ДНК	CAGGTCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAAGTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTAAAATGTCTTGCAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCCTGACAGCTGATAAGAGCTCTTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTCCACTGGCACCAAGCTCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGGACTACTCCAGAGCCGTC ACCGTGTCTGGAACAGTGGCCCTGACAAGGGGGCCATACTTT

		CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGGGCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTCTAATAACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAACAAA AAGTTGTATAAGACACATACTTCCCCACCTTGTCTGCACCAAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGAECTCTGAAGTCACCTGCGTGTTGACGTGG GAGCCACGAGGCCCGAAGTCAACTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCTATAATGCCAAAACAAAGCCCAGGAGAACAGTACAAAC TCAACATATAGACTGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAATGCAAGGTGCTCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAACAGTATTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGACCTGCTGGTAAGGGGTTCTATCCAAGTGA AAACCAAGGTCTCCCTGACCTGCTGTCTGGTAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGAAATCAAATGGACAGCCCAGAACATTAC AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGAGCTTGCCTGGTGT CCAAACTGACCGTGGATAAGTCTGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCCTGAGCCTGTACCCGGAAAC
	ДНК	CAGGTCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACCTGGCA ATCCGTAAAATGCTTGCAGGCTAGTGGTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCTGGAAACGGCAGACTTCTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCTGACAGCTGATAAGAGCTCTTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAACGACCTACTATGGGGGGATTGGTACTTCAACGGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTACCAAAGGACC AAGCGTCTTCACTGGCAGCAAGCTCAAGTCAACAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGATGTCTGGTAAGGACTACTTCCAGAGCCGTC ACCGTGTCTGGAAACAGTGGCAGCTGACAAGGGGGTCCATACTTT CCCGCTGTGCTGAGTCTAGTGGCTGTACAGCTGTCAAGGGTGGTC ACCGTCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTCTAATAACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAACAAA AAGTTGTATAAGACACATACTTCCCCACCTTGTCTGCACCAAGGAG CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGAECTCTGAAGTCACCTGCGTGTTGAGCGT GAGCCACGAGGCCCGAAGTCAACTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCTATAATGCCAAAACAAAGCCCAGGAGAACAGTACAAAC TCAACATATAGACTGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAATGCAAGGTGCTCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAACAGTATTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGACCTGCTGGTAAGGGGTTCTATCCAAGTGA AAACCAAGGTCTCCCTGACCTGCTGTCTGGTAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGAAATCAAATGGACAGCCCAGAACATTAC AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGAGCTTGCCTGGTGT CCAAACTGACCGTGGATAAGTCTGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCCTGAGCCTGTACCCGGAAAC

46	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACCTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTAAAATGTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCCCTGAAACCGGCGACACTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCTACCGCCT ACATGAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAACCTACTATGGGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCAAGTCACCGTGGAGCGCCGCTTCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCACGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTGGAAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACCTTT CCCGCTGTGCTGCACTGAGTGTGCTGTACAGCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTCCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAACCTCTAATACAAAGGTGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTATAAGACACATACTTGGCCACCTTGTCTGCACCAAAGAG AAGAGGAGGACCATCGTGTCTGTTCCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCGTGAGCGT GAGCCACAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG
48	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACCTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTAAAATGTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCCCTGAAACCGGCGACACTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCC TGACAGCTGATAAGAGCTCTACCGCCT ACATGAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAACCTACTATGGGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCAAGTCACCGTGGAGCGCCGCTTCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCACGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTGGAAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACCTTT CCCGCTGTGCTGCACTGAGTGTGCTGTACAGCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTCCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAACCTCTAATACAAAGGTGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTATAAGACACATACTTGGCCACCTTGTCTGCACCAAAGAG CGAGGGAGGACCATCGTGTCTGTTCCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGT GAGCCACAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG

		TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGCTCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTCTAAAGCCAAGGGCAGCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTACCTCTCAAGCCGACGAGCTGACTAA AAACCAAGGTCTCCCTGACCTGCTGGTAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGAAATCAAATGGACAGCCGAGAACATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCATGGAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTT TCCTGTTCTGTGATGACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGTCAACCCGGCAA
50	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACCTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGA TCGGAGCAATCTACCTCTGGAAACGGCGACACTTCTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGGCACCCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCACTGGTGTGGACTCATGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGGGGGATTGGTACTTCAACGGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAGGACC AAGCGTCTTCACTGGCACCAAGCTCAAGTCAACAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCGTC ACCGTGTCTGGAAACAGTGGCCCTGACAAAGCGGGGTCCATACCTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTCTAATACAAAGTCGACAAGAAAGTGGAAACCAA AAGTTGTGATAAGACACATACTGGCCACCTTGTCTGCACCAAAGAG AAGAGGAGGACCATCGTGTCTGGGGACACTTCAACTGGTACGTGGG TCTGATGATTAGCCGGACTCTGAAGTCACCTGCGTGGTGTGGACGT GAGCCACAAGGACCCGAAGTCACATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGCTCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTCTAAAGCCAAGGGCAGCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTGCTGCCCTCAAGCCGACGAGCTGACTAA AAACCAAGGTCTCCCTGCTGTCTGGTAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGAAATCAAATGGACAGCCGAGAACATTACA TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCATGGAGCTTCTTCTGTATT CAAACGTACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT CCTGTTCTGTGATGACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCAACCCGGCAA
52	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACCTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGA TCGGAGCAATCTACCTCTGGAAACGGCGACACTTCTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGGCACCCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCACTGGTGTGGACTCATGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG

		GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAGGACC AAGCGTGTCCCCTGGCACCAAGCTCAAGTCACCCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGATGTCTGGTAAGGACTACTTCCCAGAGCCGTC ACCGTGTCTGGAACAGTGGGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT CCCGCTGTCTGCAGTCTAGTGGCTGTACAGCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCCTCTAAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAAACCTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAACCAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGGCCACCTTGTCTGCACAGAGGA CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGT GAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCTATAATGCCAAAACAAGGCCGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGTACTGTGCTGACCCAGGACTG GCTGAAACGGCAAGGAGTATAAATGCGCGTGTCAAACAGGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCAAGGTGTACGTGCTGCCTCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAAGGTCTCCCTGCTGTCTGGTAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCGAGAACAAATTACC
54	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCG ATCCGTAAAATGTCTTGCAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCACCTGGAAACGGCGACACTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCACTGGTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCCCGCTTCCACAAAGGACC AAGCGTGTCCCCTGGCACCAAGCTCAAGTCACCCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTAAGGACTACTTCCCAGAGCCGTC ACCGTGTCTGGAAACAGTGGGCCCTGACAAGGGGGTCCATACTTTT CCCGCTGTCTGCAGTCTAGTGGCTGTACAGCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCCTCTAAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAAACCTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAACCAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGGCCACCTTGTCTGCACCAAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGT GAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCTATAATGCCAAAACAAGGCCGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGTACTGTGCTGACCCAGGACTG GCTGAAACGGCAAGGAGTATAAATGCGCGTGTCAAACAGGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCAAGGTGTACGTGCTGCCTCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAAGGTCTCCCTGCTGTCTGGTAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCGAGAACAAATTACC

		TGACTTGGCCCCGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTCTGTATT CAAACGTACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGAAATGTCTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTACCCGGCAAA
56	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACCTGGCGC ATCCGTAAAATGTCTTGCAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCCAGGACGAGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCCCTGAAACGGGCACACTTCTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCCTGACAGCTGATAAGAGCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCAGAAGCACCTACTATGGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCACGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAAGCGGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCCTC ACCGTGTCTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT CCCGCTGTGCTGCACTGCTAGTGGCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTCCCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTCTAATAACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAACAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTGCCACCTTGTCTGCACCAAGAGGA CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGAACCTCTGAAGTCACCTGCGTGGTGGACGT GAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAACTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAGCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGTCGAGCGCTCTGACTGTGTCGACCCAGGACTG GCTGAAACGGCAAGGAGTATAATGCAAGGTGTCACAGGCCCTGT GGGCACCTATCGAGAAGACTATTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCCACGGGTGACGTGACCTTCAAGCCGGACGAGCTGACTAA AAACCAAGGTCTCCCTGACCTGTCGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCGAGAACATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCCGCTGGTGT CCAAACTGACCGTGGATAAGTCTGGTGGCAGCAGGAAATGTCTTT TCCCTGAGCCTGTACCCGGCAAA
58	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACCTGGCGC ATCCGTAAAATGTCTTGCAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCCAGGACGAGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCCCTGAAACGGGCACACTTCTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCCTGACAGCTGATAAGAGCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCAGAAGCACCTACTATGGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCACGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAAGCGGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCCTC ACCGTGTCTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT

		CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCCCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTATAAGACACATACTTGCCCCACCTTGTCTGCACCAAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTGTGGACGT GAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGATAATGCCAAACAAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGACTGTGAGGGTCTGACTGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAATGCGCGTGTCAACAAGGCCGTG CCGCACCTATCGAGAAGACTATTCTAAAGCCAAGGGCCAGCTTAGG GAACCACAGGTGACGTGACCTGCCAGGTGAGCTGACTAA AAACCAAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTAAGGGGTTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCGAGAACAAATTAC AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTGACATGGGAGCTTGCCTGGTGT CCAAACTGACCGTGGATAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCCTGAGCCTGTACCGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGTACCCGGAAAC
60	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACCTGGTAAACCTGGCGC ATCCGTAAAATGCTTGTCAAGGGTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACGGGTGAAGCAGACACCAGGACGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCACCTGAAACGGCGACACTTCTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGGGGATTGTAATTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGGCCGTTCCACAAAGGACC AAGCGTGTCCACTGGACCAAGCTCCAAGTCACCCAGCGAGGAA CAGCAGCCCTGGATGTCTGGTAAGGACTACTTCCAGAGCCGTC ACCGTGTGGAAACAGTGGCCCTGACAAGGGGTCCATACTTT CCCGCTGTGCTGAGTCTAGTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG ACCGTCCCTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTATAAGACACATACTTGCCCCACCTTGTCTGCACCAAGGAG CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTGTGAGCGT GAGCCACAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGATAATGCCAAACAAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGACTGTGAGGGTCTGACTGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAATGCGCGTGTCAACAAGGCCGTG CCGCACCTATCGAGAAGACTATTCTAAAGCCAAGGGCCAGCTTAGG GAACCACAGGTGACGTGACCTGCCAGGTGAGCTGACTAA AAACCAAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTAAGGGGTTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCGAGAACAAATTAC AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTGACATGGGAGCTTGCCTGGTGT CCAAACTGACCGTGGATAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCCTGAGCCTGTACCGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGTACCCGGAAAC

62	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACCTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTAAAATGTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCSTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGGAGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCTGAAACCGGCACACTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCTCACCGCCT ACATGAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCAGAAGCACCTACTATGGGGGGATTGGTACCTAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTAGCGCCGCTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCACGGCACCAAGCTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCGGTAAGGACTACTTCCAGAGCCCCTC ACCGTGTCTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGGGGGTCCATACTTT CCCGCTGTGCTGCACTGAGTGGCTGTACAGCCTGTCAGCGTGGTC ACCGTCCCTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAACCTCTAATACAAAGGTGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTATAAGACACATACTTGCACCTTGTCTGCAACAAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCGGACTCCTGAAAGTCACCTGCGTGGTGTAGCGT GAGCCACAAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG
64	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACCTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTAAAATGTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCSTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGGAGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCTGAAACCGGCACACTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCC TGACAGCTGATAAGAGCTCTCACCGCCT ACATGAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCAGAAGCACCTACTATGGGGGGATTGGTACCTAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTAGCGCCGCTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCACGGCACCAAGCTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCGGTAAGGACTACTTCCAGAGCCCCTC ACCGTGTCTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGGGGGTCCATACTTT CCCGCTGTGCTGCACTGAGTGGCTGTACAGCCTGTCAGCGTGGTC ACCGTCCCTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAACCTCTAATACAAAGGTGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTATAAGACACATACTTGCACCTTGTCTGCAACCAAGAG CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCGGACTCCTGAAAGTCACCTGCGTGGTGTAGCGT GAGCCACAAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG

		TCGAGGGCATAATGCCAAAACAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGAGGTCTCAACAAGGCCCTGC CCGACCTATCAAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCAGCCTAGG GAACCAACAGGTGTACGTGACCCCTCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCAAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCGAGAACATTACA AGACTACCCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTG CCAAACTGACCCTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTT TCCCTGTTCTGTGATGCACTGCAAGCAGCTGACAATCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGTCAACCGGCAAAG
66	ДНК	CAGGTCAGCTGCAGCAGCCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCG ATCCGTAAAATGCTTGTCAAGGCTAGTGGTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCCAGGACGAGGACTGGAGTGG TCGGAGCAATCTACCCCTGGAAAGGCCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCCTGACAGCTGATAAGAGCTCTACCGCCT ACATGCACTGGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAACGACCTACTATGGGGGATTGGTACTTCAACGGTGG GGGGCAGGAAGCACACTGACCGTGAAGCAGCTCAGCAGTGTACTATT AAGCGTGTGGGATGCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCGTC ACCGTGTCTGGAAAGTGGCCTGACAAGGGGTCCATACCTTT CCCGCTGTGCTGCACTGCTAGTGGCCTGACAGCTGTCAGCGTGGTC ACCGTCCCTCCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATGCAACGTG AATCACAACCTCTAAACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAACAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTGGCCACCTTGTCTGACCAAAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGAACCTCTGAAGTCACCTGCGTGGTGAAGCG GAGCCACAAGGACCCGAACCTAAACACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGATAATGCCAAAACAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGAGGTCTCAACAAGGCCCTGC CCGACCTATCAAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCAGCCTAGG GAACCAACAGGTGTACGTGCTCCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAAGGTCTCCCTGCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCAAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCGAGAACATTACC TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTGTATT CAAACGTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTT CCTGTTCTGTGATGCACTGCAAGCAGCTGACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCAACCGGCAAAG
69	ДНК	CAGATTGCTCTGCTCAGAGTCCCCTATCCTGTCAGCAAGCCCTGGG GAGAAGGTGACCATGACATGCCGAGCCAGCTCTGTGTCAGTACATC CACTGGTTCCAGCAGAACGCCAGGCACTCACCTAAACCATGGATCTAC GCCACATCTAACCTGGCTAGTGGAGTGCCGTCGGTTTCCGGCTCT GGGAGTGGAAACATCATAACGGCTGACTATTTCCAGAGTGGAGGCGA AGACGGCCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGACCTTAATCCCCCTAC ATTGGGGGGAACTAAGCTGGAGATCAAAGGACTGTGGCAGCC

		CCTTCTGTCTTCATTTCCACCCAGTGACGAACAGCTGAAATCAGGAA CCGCTTCCGTGGTCTGCTGCTGAAACAACCTCTACCCCCGCGAGGCAA AGGTGCAGTGAAAGTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAATTCTAG GAGAGTGTGACCGAACAGGACTCAAAGGATAGCACATATTCCCTGAG CTCCACTCTGACCCCTGTCCAAAGCTGATTACGAAAAGCATAAAGTGT TGCATGTGAGGTACCCACCAGGGGCTGAGTAGTCCCCTGACAAAGA GTTTCAATAGAGGGAGGTGT
--	--	---