



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:  
30.05.2014

Дата 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:  
СА 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 Интернэшнл Инк.", Строкова Ольга  
Владимировна

(72) Автор(ы):

ЭСКОБАР-КАБРЕРА Эрик (СА)

(73) Патентообладатель(и):

ЗАЙМВОРКС ИНК. (СА)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2004/099249 А, 18.11.2004.  
RU2325186 С2, 27.05.2008.

(54) ГЕТЕРОМУЛЬТИМЕРЫ С УМЕНЬШЕННОЙ ИЛИ ПОДАВЛЕННОЙ ЭФФЕКТОРНОЙ  
ФУНКЦИЕЙ

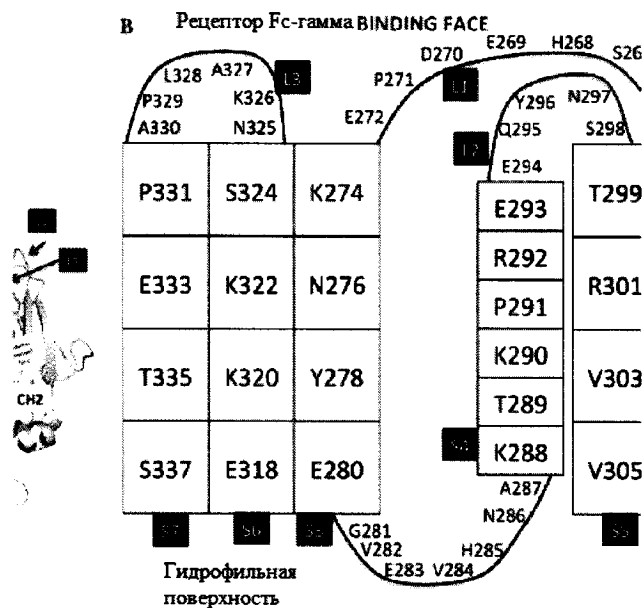
(57) Реферат:

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

модификации аминокислоты первого полипептида Fc, и 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. 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 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa 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 расстройства 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 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa 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



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 Interneshnl Ink.", Strokova Olga  
Vladimirovna**

(72) Inventor(s):

**ESCOBAR-CABRERA Eric (CA)**

(73) Proprietor(s):

**ZYMEWORKS INC. (CA)**(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

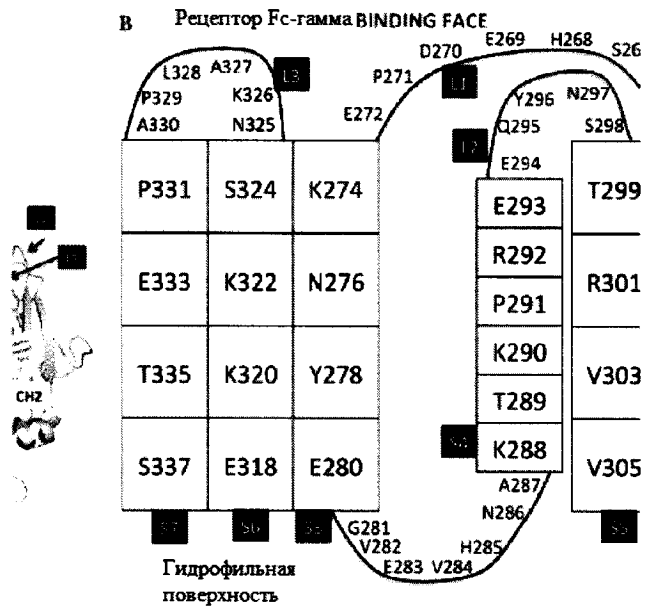
region of the second Fc polypeptide contains an amino acid modification that is different from the amino acid modification of the first Fc polypeptide, and the IgG Fc construct demonstrates reduced binding to receptors FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb and FcγRIIIa compared with the corresponding parent IgG Fc 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

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 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb and FcγRIIIa 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 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb and FcγRIIIa 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**



## 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.

## 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 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 опосредовать одну или более эффекторных функций. Данные эффекторные функции являются следствием взаимодействия антител и комплексов антитело-антиген с клетками 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 классифицируют по их специфичности к изотипам иммуноглобулинов; Fc-рецепторы для антител IgG называют FcγR, для антител IgE-FcεR, для антител IgA-FcαR и т.д. Fc-область антител также опосредует функции, такие как связывание с FcRn, которые осуществляются независимо от связывания с антигеном и которые придают антителам устойчивость в кровотоке и способность проникать через клеточные барьеры в результате транцитоза (Ward and Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77-94 (1995)).

[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 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, 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 FcγR (рецепторами Fc-гамма) и наблюдаемую в результате 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 коровью шарнирную область и СН3-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, 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 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 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 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 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 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 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.

[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.

[0021] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG обладает  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIaH, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIaR, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIb, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIIaF, составляющей более 6 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIIaV, составляющей более 6 мкМ, и  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIa, составляющей более 6,5 нМ.

[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 EC<sub>50</sub>. 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-depended cell phagocytosis, антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз), CDC или любой комбинации указанных функций.

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

45 [0029] В настоящем изобретении предложен гетеромультимер, содержащий 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 СН2-область с температурой плавления, большей или равной температуре плавления соответствующей родительской СН2-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 СН2-область с температурой плавления, которая приблизительно на 1-2°C выше температуры плавления родительской СН2-области.

[0034] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG  
25 содержит СН2-область с температурой плавления, которая приблизительно на 2-3°C выше температуры плавления родительской СН2-области.

[0035] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором конструкция Fc IgG  
30 содержит вариант СН3-области, содержащий модификации аминокислот, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc-области вместо гомодимерной Fc-области, когда экспрессируется указанный гетеромультимер. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один из указанных первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот СН3 T366L/N390R/K392M/T394W, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот СН3 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  
45 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.

[0040] Один вариант реализации настоящего изобретения представляет собой гетеромультимер, описанный в настоящей заявке, в котором IgG представляет собой  
15 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: (a) культивирование клетки-хозяина, описанной в настоящей заявке; и (b) 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.

[0042] В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция,  
30 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 Fcγ 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 после следующего подробного описания, в котором содержатся ссылки на прилагаемые чертежи.

[0046] На фигуре 1 представлены участки Fc-области, вовлеченные в связывание с FcγR. (А) Кристаллическая структура 3b/Fc (PDB.1E4K), демонстрирующая петли и нижний шарнирный CH2-домен Fc (показан серым цветом), которые вовлечены в связывание с FcγR (показан черным цветом). (В) 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 2А представлены термограммы для ДТ и AAC2-AAC6. На фигуре 2В представлена идентичность двух переходов ДТ. Первый переход соответствует разворачиванию CH2-домена, второй переход соответствует разворачиванию CH3+Fab. На фигуре 2С представлено наложение результатов анализа множества образцов, демонстрирующее, как переход вариантов CH2 смещается к большему значению Tm, что свидетельствует о большей стабильности.

[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 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 IgG1 человека (SEQ ID NO: 1); аминокислотная последовательность тяжелой цепи трастуумаба (SEQ ID NO: 2), аминокислотная последовательность легкой цепи трастуумаба (SEQ ID NO: 3), аминокислотная последовательность тяжелой цепи ритуксимаба (SEQ ID NO: 4), аминокислотная последовательность легкой цепи ритуксимаба (SEQ ID NO: 5).

[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 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.

[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 рецепторами FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb FcγRIIIaF, FcγRIIIaV и FcγRIa 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 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 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 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 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 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 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. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера демонстрирует незначительное связывание с рецепторами Fcγ по 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 Fcγ и незначительное связывание с по меньшей мере одним рецептором Fcγ. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера, описанная в настоящей заявке,

демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fcγ 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 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 указанных первого или второго полипептидов Fc также содержит модификации по меньшей мере одной аминокислоты, которая находится в СН2- или СН3-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:

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, 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. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего 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 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 Fcγ 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 Fcγ и незначительное связывание с по меньшей мере одним рецептором Fcγ. Согласно варианту реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера, описанная в настоящей заявке, демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fcγ 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, 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 СН2- или СН3-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 $\gamma$ RIIaH, составляющей по меньшей мере приблизительно 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIaR, составляющей по меньшей мере приблизительно 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIb, составляющей по меньшей мере приблизительно 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIIaF, составляющей по меньшей мере приблизительно 6 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIIaV, составляющей по меньшей мере приблизительно 6 мкМ, и  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIa, 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 $\gamma$ RIIaH, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIaR, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIb, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIIaF, составляющей более 6 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIIaV, составляющей более 6 мкМ, и  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIa, 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

10 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 модификации аминокислот, которые выбраны из E233A или E233D. Согласно определенным вариантам реализации

15 настоящего изобретения 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. 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

35 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 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

45 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 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 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 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 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/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 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: 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 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 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-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 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 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.

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

[0070] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения представляют собой конструкцию гетеромультимера, описанную в настоящей заявке, в которой 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.

[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 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 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 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.

[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-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 (b) выделение гетеромультимера из культуры клетки-хозяина.

[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 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, 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 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 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 «агликозилированные антитела» относится к антителам или гетеромультимерам, которые не гликозилируются в ходе экспрессии.

30 Агликозилированные 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  
35 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.

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

[0084] «Аминокислота с отрицательно заряженной боковой цепью» представляет собой полярную аминокислоту, боковая цепь которой депротонирована и вследствие этого отрицательно заряжена при нейтральных значениях pH. 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 pH.

[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 FcγR). 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 FcγR) слабо и имеют тенденцию легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела связываются с антигеном (или FcγR) 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 СН2-домен и СН3-домен, соответственно. СН2-домен содержит последовательность СН2-домена Цепи А и последовательность СН2-домена Цепи В. СН3-домен содержит последовательность СН3-домена Цепи А и последовательность СН3-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 СН2-домена» последовательности Fc-области IgG человека (также называемая последовательностью домена «Су2») обычно соответствует участку от приблизительно аминокислоты 231 до приблизительно аминокислоты 340. Последовательность домена СН2 уникальна тем, что данная последовательность не

полностью 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-  
 5 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  
 10 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 А и А); 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 собой нативный FcR человека. Более того, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения FcR представляет собой рецептор, который  
 45 связывается с антителом IgG (гамма рецептор, FcγR) и включает рецепторы подклассов FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), в том числе аллельные варианты и формы

данных рецепторов, которые подверглись альтернативному сплайсингу. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые содержат аналогичные аминокислотные последовательности, отличающиеся преимущественно цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в цитоплазматическом домене иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB 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)). 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 et al., *J. Immunol.* 1 17:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)). Термин «FcγR» не включает FcRn.

[0094] Термины «антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» и «ADCC» относятся к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические 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 FcγRIII и низкие уровни FcγRIIc, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Данные об экспрессии FcR на гематопозитических клетках обобщены в таблице 3 на странице 464 публикации Ravetch 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 FcγRIII и осуществляют эффекторную функцию ADCC. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют 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.

[0096] Гетеромультимер со «значительно уменьшенной», «подавленной», «незначительной» или «устраненной» аффинностью связывания с FcγR и аффинностью связывания с C1q представляет собой гетеромультимер, обладающий уменьшенной активностью связывания с FcγR и активностью связывания с C1q по сравнению с родительским полипептидом или с полипептидом, содержащим последовательность нативной Fc-области. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гетеромультимер со «значительно уменьшенной», «подавленной», «незначительной» или «устраненной» аффинностью связывания с FcγR и аффинностью связывания с C1q представляет собой также гетеромультимер со «значительно уменьшенной», «подавленной», «незначительной» или «устраненной» активностью 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 FcγR, связывается со всеми FcγR с меньшей аффинностью, чем родительский полипептид. Такие варианты,

демонстрирующие уменьшенное связывание с Fc $\gamma$ R, могут обладать небольшим или не поддающимся оценке связыванием с Fc $\gamma$ R. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вариант демонстрирует 0-20% связывания с Fc $\gamma$ R по сравнению с нативной Fc-областью IgG, например, что определено в примерах в настоящей заявке или что измеряют посредством изменения константы равновесия. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вариант демонстрирует 0-10% связывания с Fc $\gamma$ R по сравнению с нативной Fc-областью IgG. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вариант демонстрирует 0-5% связывания с Fc $\gamma$ R по сравнению с нативной Fc-областью IgG. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вариант демонстрирует 0-1% связывания с Fc $\gamma$ 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 $\gamma$ RIIaH обладает K<sub>d</sub> в отношении Fc $\gamma$ RIIaH, 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 $\gamma$ RIIaR обладает K<sub>d</sub> в отношении Fc $\gamma$ RIIaR, превышающей 10 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 $\gamma$ RIIb обладает K<sub>D</sub> в отношении Fc $\gamma$ RIIb, превышающей 30 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 $\gamma$ RIIIaF обладает K<sub>D</sub> в отношении Fc $\gamma$ RIIIaF, превышающей 20 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 $\gamma$ RIIIaV обладает K<sub>D</sub> в отношении Fc $\gamma$ RIIIaV, превышающей 6 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 $\gamma$ RIa обладает K<sub>D</sub> в отношении Fc $\gamma$ RIa, 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, 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, раскрытого в настоящей заявке, однако можно 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 варианту реализации настоящего изобретения родительское антитело представляет собой антитело, которое не содержит модификаций аминокислот в шарнирной области и содержит модификации СНЗ-домена, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc-области.

[00100] Термин «модификация аминокислоты» относится к изменению 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 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.

[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 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 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 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, 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 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 вставки представляют собой «пептидные вставки»

большого 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,  $\alpha$ -цепи FcR), отвечающей за связывание с Fc-областью. Один пригодный связывающий домен представляет собой внеклеточный домен цепи FcR $\alpha$ .

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 СН1-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. Моноклональные антитела являются высоко специфичными, направленными против  
45 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 predispose 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, 5  
необязательно последовательность оператора и сайт связывания рибосомы. Известно, что в эукариотических клетках используются промоторы, сигналы полиаденилирования 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 15  
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. 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 взаимозаменяемо, 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, 35  
обладает константой диссоциации, составляющей приблизительно 50 нМ, или худшей аффинностью. Примеры низкоаффинных рецепторов включают FcγRII и FcγRIII.

[00118] Под «Fc-слиянием» в настоящей заявке подразумевают белок, в котором один или более полипептидов функционально связаны с Fc-областью или ее производным. Fc-слияние в настоящей заявке является синонимом терминов 40  
«иммуноадгезин», «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 45



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 рецептор, вовлеченный в заболевание. Два семейства рецепторов поверхности, которые являются мишенями множества одобренных низкомолекулярных лекарственных препаратов, представляют собой рецепторы, объединенные с G-белком (GPCR), и ионные каналы, в том числе  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  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 рецепторов GABA, пуриnergических рецепторов, адренергических рецепторов, гистаминергических рецепторов, опиоидных рецепторов, хемокиновых рецепторов, глутаматных рецепторов, никотиновых рецепторов, 5HT (серотониновых) рецепторов и эстрогеновых рецепторов. 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 мишенями существующих лекарственных препаратов, но также орфанные рецепторы, 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 рецепторы. 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 подразумевают молекулу, 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 подразумевают 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:

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 $\gamma$  и с белком C1q 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 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 Fc $\gamma$  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 $\gamma$  по 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 $\gamma$  и незначительное связывание с по меньшей мере одним рецептором Fc $\gamma$ . Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера, описанная в настоящей заявке, демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fc $\gamma$  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 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 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 $\gamma$  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 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 $\gamma$  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 $\gamma$  и незначительное связывание с по меньшей мере одним рецептором Fc $\gamma$ . Согласно варианту реализации настоящего изобретения конструкция гетеромультимера, описанная в настоящей заявке, демонстрирует уменьшенное связывание с рецепторами Fc $\gamma$  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 $\gamma$  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 С-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 $\gamma$ 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-

40 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

45 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

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, атлизумаба, бапинеузумаба, бевацизумаба, биватузумаба, кантузумаба, целделизумаба, цертолизумаба пегола, цидфузитузумаба, цидтузумаба, даклизумаба, экулизумаба, эфализумаба, эпратузумаба, эрлизумаба, феллизумаба, фонтолизумаба, гемтузумаба озогамидина, инотузумаба озогамидина, ипилимумаба, лабетузумаба, линтузумаба, матузумаба, меполизумаба, мотавизумаба, 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 целмолейкина, 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 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa. 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 устраненной эффекторной функцией. Термины «первый» и «второй» в отношении полипептида Fc, которые можно применять взаимозаменяемо, 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 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 шарнирная область по меньшей мере одного из указанных первого или второго

10 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, L234D, L234E, L235K, L235R, L235E, L235A и L235D. Один вариант реализации

15 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

25 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.

[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 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.

[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 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 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 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 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 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 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/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

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

- 5 [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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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 40 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.

- 45 [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, 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 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 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 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 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 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 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 L235 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 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 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 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 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 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 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

биспецифичных антител. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептиды Fc содержат вариант СН3-доменов, содержащий модификации аминокислот, которые способствуют образованию гетеродимерных Fc-областей. Подходящие варианты СН3-доменов известны в данной области техники и включают, например, варианты, описанные в международной публикации патента № WO 2012/058768 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 СН3Т366L/Ν390R/Κ392M/Τ394W, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот СН3 L351Y/S400E/F405A/Y407V.

[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.

[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 СН3-области каждого полипептида Fc, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc-области.

[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 СН2-домена. Подходящие модификации аминокислот известны в данной области техники и включают, например, модификации, описанные в международной заявке на патент № PCT/CA2012/050780.

Более конкретно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, содержащую модификации аминокислот Т350V 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: 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.

[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 СНЗ-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 СНЗ-домены гетеродимерной Fc имеют температуру плавления ( $T_m$ ), 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  $C_{H3}$ . Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит одну или более модификаций в по меньшей мере одной из последовательностей  $C_{H2}$ .

[00162] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc представляет собой Fc, описанную в заявке на патент РСТ/CA2011/001238, поданной 4 ноября 2011 г, или в заявке на патент РСТ/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 СНЗ-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 взаимозаменяемо 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 СНЗ, и второй полипептид тяжелой цепи содержит вторую последовательность СНЗ.

[00164] Две последовательности СНЗ, которые содержат одну или более модификаций аминокислот, введенных асимметричным способом, как правило, при димеризации двух последовательностей СНЗ 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 СНЗ отличается от аминокислоты в том же положении второй последовательности СНЗ, и первая и вторая последовательности СНЗ 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 СНЗ. Первая и вторая последовательность СНЗ 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 (А и В), 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 мутантную последовательность, представленную в таблице X. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит мутации Варианта 1 А-В. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит мутации Варианта 2 А-В. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит мутации Варианта 3 А-В. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит мутации Варианта 4 А-В. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит мутации Варианта 5 А-В.

Таблица X: Примеры последовательности Fc и модификаций CH3

Последовательность Fc IgG1 человека 231-447 (нумерация согласно EU)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:70)	
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

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

[00168] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения конструкция Fc, предложенная в настоящей заявке, содержит гетеродимерную Fc, содержащую модифицированный СНЗ-домен с первой последовательностью СНЗ, содержащей модификации аминокислот в положениях L351, F405 и Y407, и второй последовательностью СНЗ, содержащей модификации аминокислот в положениях T366, K392 и T394, и одной из указанных первой или второй последовательностей СНЗ, дополнительно содержащей модификацию аминокислоты D399R или D399K, и с другой последовательностью СНЗ, содержащей одну или более из T411E, T411D, K409E, K409D, K392E и K392D. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc содержит модифицированный СНЗ-домен с первой последовательностью СНЗ, содержащей модификации аминокислот в положениях L351, F405 и Y407, и второй последовательностью СНЗ, содержащей модификации аминокислот в положениях T366, K392 и T394, и одной из указанных первой или второй последовательностей СНЗ, которая дополнительно содержит модификацию аминокислоты D399R или D399K, и другой последовательностью СНЗ, содержащей одну или более из T411E, T411D, K409E, K409D, K392E и K392D, причем одна или обе из указанных последовательностей СНЗ дополнительно содержат модификацию аминокислоты T350V.

[00169] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc содержит модифицированный СНЗ-домен с первой последовательностью СНЗ, содержащей модификации аминокислот в положениях L351, F405 и Y407, и второй последовательностью СНЗ, содержащей модификации аминокислот в положениях T366, K392 и T394, причем одна или обе из указанных последовательностей СНЗ дополнительно содержат модификацию аминокислоты T350V.

[00170] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеродимерная Fc содержит модифицированный СНЗ-домен, содержащий следующие модификации аминокислот, где «А» представляет модификации аминокислот в последовательности первого СНЗ и «В» представляет модификации аминокислот в последовательности второго СНЗ: А: L351Y\_F405A\_Y407V, В: T366L\_K392M\_T394W, А: L351Y\_F405A\_Y407V, В: T366L\_K392L\_T394W, А: T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V, В: T350V\_T366L\_K392L\_T394W, А: T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V, В: T350V\_T366L\_K392M\_T394W, А: T350V\_L351Y\_S400E\_F405A\_Y407V и/или В: T350V\_T

366L\_N390R\_K392M\_T394W.

[00171] Одна или более асимметричных модификаций аминокислот могут способствовать образованию гетеродимерной Fc, в которой гетеродимерный СНЗ-домен обладает стабильностью, сравнимой со стабильностью гомодимерного СНЗ-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 аминокислот способствуют образованию гетеродимерного Fc-домена, причем гетеродимерный Fc-домен обладает стабильностью, определяемой посредством измерения температуры плавления ( $T_m$ ) в исследовании методом дифференциальной сканирующей калориметрии, и причем указанная температура плавления отличается не более чем на 4°C от температуры, наблюдаемой для соответствующего симметричного гомодимерного Fc-домена дикого типа. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Fc содержит одну или более модификаций по меньшей мере в одной из последовательностей  $C_{H3}$ , которые способствуют образованию гетеродимерной Fc со стабильностью, сопоставимой со стабильностью гомодимерной Fc дикого типа.

[00172] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения стабильность СНЗ-домена можно оценить посредством измерения температуры плавления СНЗ-домена, например, методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Таким образом, согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения СНЗ-домен обладает температурой плавления приблизительно 68°C или более. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СНЗ-домен обладает температурой плавления приблизительно 70°C или более. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СНЗ-домен обладает температурой плавления приблизительно 72°C или более. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СНЗ-домен обладает температурой плавления приблизительно 73°C или более. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СНЗ-домен обладает температурой плавления приблизительно 75°C или более. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СНЗ-домен обладает температурой плавления приблизительно 78°C или более. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения димеризованные последовательности  $C_{H3}$  имеют температуру плавления ( $T_m$ ) 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.

[00173] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция Fc, содержащая гетеродимерную Fc, которая дополнительно содержит модифицированные последовательности СНЗ, может быть получена с чистотой по 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 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 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 JI, de Goeij BE, van den Bremer ET, Neijssen J, van Kampen MD, Strumane K, Verploegen S, Kundu A, Gramer MJ, van 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 FcγR и с C1q. Кроме того, согласно 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 гетеромультимер, содержащий конструкцию Fc IgG, которая не связывается измеряемо с рецепторами FcγR, 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, ADCC и ADCC) не являются необходимыми или являются вредными.

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

#### 3а. Уменьшенное/устраненное связывание с FcγR и комплементом

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

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер согласно настоящему изобретению демонстрирует  $K_D$  в отношении FcγR 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 ими, анализы на основе FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, резонансный перенос энергии флуоресценции) и BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer, резонансный перенос энергии биолуминесценции), 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 Biacore™), 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 гетеромультимер, содержащий конструкцию Fc IgG, обладает  $K_D$  в отношении FcγRIIaH, составляющей более 5 мкМ,  $K_D$  в отношении FcγRIIaR, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении FcγRIIb, составляющей более 30 мкМ,  $K_D$  в отношении FcγRIIaF, составляющей более 20 мкМ,  $K_D$  в отношении FcγRIIaV, составляющей более 6 мкМ, и  $K_D$  в отношении FcγRIa, составляющей более 6,5 нМ, что измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер, содержащий конструкцию Fc IgG, обладает  $K_D$  в отношении FcγRIIaH, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении FcγRIIaR, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении FcγRIIb, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении FcγRIIaF, составляющей более 6 мкМ,  $K_D$  в отношении FcγRIIaV, составляющей более 6 мкМ,  $K_D$  в отношении FcγRIa, составляющей более 30 нМ, и не связывается с C1q, что измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

[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 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 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, спектроскопию кругового дихроизма, 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 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 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 ультрацентрифугирование, динамическое рассеивание света, протеолиз и перекрестное сшивание, измерение мутности, анализы оседания на фильтре, иммунологические 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 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, 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 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 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 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 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 СН2-домен с температурой плавления, большей или равной температуре плавления СН2-домена родительского полипептида или антитела. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем конструкция Fc IgG содержит СН2-домен с температурой плавления, которая приблизительно на 1-2°C выше температуры плавления родительского СН2-домена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем конструкция Fc IgG содержит СН2-домен с температурой плавления, которая приблизительно на 2-3°C выше температуры плавления родительского СН2-домена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем конструкция Fc IgG содержит СН2-домен с температурой плавления, которая приблизительно на 1-2°C выше температуры плавления родительского СН2-домена, причем гетеромультимер содержит модификации аминокислот, примерами которых являются AAC4 и AAC5. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем конструкция Fc IgG содержит СН2-домен с температурой плавления, которая приблизительно на 2-3°C выше температуры плавления родительского СН2-домена, причем гетеромультимер содержит модификации аминокислот, примерами которых являются AAC2, AAC9, AAC10, AAC11, AAC12, AAC13, AAC14 и AAC15. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, причем конструкция Fc IgG содержит СН2-домен с температурой плавления, которая приблизительно на 4°C выше температуры плавления родительского СН2-домена, причем гетеромультимер содержит модификацию аминокислоты, примером которой является AAC6.

### 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 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.

## 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 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 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  $\alpha$ -цепи (CD25) ИЛ-2R, амилоида бета, ЕpCAM, CD3, BLyS (или BAFF), CD11a, CD20, CD22, CD23, CD3, CD4, CD52, CD80, CTLA-4, EGFR, F белка РСВ (респираторно-синцитиального вируса), G250, гликопротеина IIb/IIIa R, HER2, рецептора HER2/neu, Hsp90, IgE антитела, ИЛ-12/ИЛ-  
20 23, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-5, рецептора ИЛ-6, интегрин альфа-4/бета-1, муцина 16/CA-125, RAN L, ФНО альфа, VEGF-A и других терапевтически предпочтительных мишеней.

[00190] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гетеромультимер содержит конструкцию Fc IgG, которая содержит первый и второй полипептид Fc, причем каждый полипептид Fc содержит модифицированную шарнирную  
25 область, причем указанный гетеромультимер получен из гуманизированного моноклонального антитела, обладающего терапевтическим потенциалом, которое выбрано из: алемтузумаба, аполизумаба, аселизумаба, атлизумаба, бапинеузумаба, бевализумаба, биватузумаба мертанзина, кантузумаба мертанзина, цеделизумаба, цертолизумаба пегола, цидфузитузумаба, цидтузумаба, даклизумаба, экулизумаба,  
30 эфализумаба, эпратузумаба, эрлизумаба, феллизумаба, фонтолизумаба, гемтузумаба озогамидина, инотузумаба озогамидина, ипилимумаба, лабетузумаба, линтузумаба, матузумаба, меполизумаба, мотавизумаба, 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, тефибазумаба, токилизумаба, торализумаба, трастузумаба, тукотузумаба целмолейкина, 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

5 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, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>,

10 Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> 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 альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфаорамида и

15 триметилломеламин; ацетогенины (в особенности буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотecin (в том числе синтетический аналог топотекан (HUSAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотecin, скополектин и 9-аминокамптотecin); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (в том числе его

25 адозелезиновые, карзелезиновые и бизелезиновые синтетические аналоги); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в особенности криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (в том числе синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид,

30 эстрамустин, ифосфамид, меклоретамин, гидрохлорид оксида меклоретамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевинны, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, в особенности калихеамицин гамма II и калехеамицин омега II (см.,

35 например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); динемидин, в том числе динемидин А; эсперамицин; а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые энединовые хромофоры-антибиотики), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин,

40 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 С, микофеноловая кислота, ногаламицин,

45 оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотилон и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуриновые аналоги,

такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; 5 анти-адреналовые соединения, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; средства, восполняющие фолиевую кислоту, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; 10 майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в особенности Т-2 токсин, 15 верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; 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; митоксантрон; 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 СНОР (аббревиатура, обозначающая комбинированную терапию циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном); и FOLFOX (аббревиатура, обозначающая схему лечения оксалиплатином (ELOXATIN™) вместе с 5-FU и лейковорином). 30

#### 4с. 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 40 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-связывающих доменов или гетерологичных белков. Разработка нуклеиновой кислоты, 45 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, НЕК-293, NSO и 3Т3), несущие рекомбинантные конструкции экспрессии, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний

15 промотор аденовируса; 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, индуцибельным промотором или тканеспецифичным промотором.

[00201] В клетках-хозяевах млекопитающих можно применять множество систем экспрессии на основе вирусов. В случаях применения в качестве вектора экспрессии аденовируса, последовательности, кодирующие модифицированные тяжелую и легкую

30 цепь, представляющие интерес, можно лигировать в комплекс контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например, поздний промотор и трехкомпонентную лидерную последовательность. Данный химерный ген можно затем встроить в геном аденовируса 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 (Bernt and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310), промотор, содержащийся в 3'-длинном концевом повторе вируса саркомы Раяса (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  $\beta$ -лактамазы (Villa-Komaroff et al, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731) или тас-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 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 контрольные области животных, демонстрирующие

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, 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 тестикулярных клетках, клетках молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, *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-фетопroteина, 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.* 1:161-171), контрольная область гена бета-глобина, проявляющая активность в миелоидных клетках (Mogam 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 (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. Biophys. Res. Com.* 253:818-823); промотор глиофибрилярного кислого белка (GFAP), проявляющий активность 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 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 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 транскрипта (например, гликозилирования и фосфорилирования) продукта гена. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, CHO, VERY, ВНК, 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 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-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 (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 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 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, терминаторов транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.), и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК сконструированным клеткам позволяют расти в течение 1-2 дней на обогащенной среде, а затем переносят на селективную среду. Селективируемый 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-, hgp<sup>rt</sup>- или ap<sup>rt</sup>-, 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 микофеноловой 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 hyg<sup>r</sup>, 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 гидроксипатитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является предпочтительной методикой очистки. Пригодность белка А для применения в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа любой Fc-области иммуноглобулина, которая присутствует в гетеромультимере. Белок А можно применять для очистки антител на основе тяжелых цепей  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  или  $\gamma 4$  человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуют применять для всех изотипов мыши и для  $\gamma 3$  человека (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (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(стиренивинил)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 СНЗ-домен, для очистки используют смолу Bakerbond ABX<sup>TM</sup> (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

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

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

[00210] Гетеромультимеры 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 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 гетеромультимеры очищают или выделяют. Способы экспрессии описаны в других разделах настоящей заявки. Белки можно выделить или очистить множеством 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 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 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 гетеромультимеров. 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 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 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 секретируются, 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, 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, могут также содержать вариант СНЗ-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 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 FcγR, FcRn и C1q

[00214] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения для 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.

Например, можно провести анализы связывания с Fc-рецептором (FcR), чтобы убедиться, что связывание гетеромультимера с FcγR отсутствует (вследствие этого, вероятно, отсутствует активность ADCC), но сохраняется способность к связыванию с FcRn. Среди первичных клеток, опосредующих ADCC, клетки NK экспрессируют исключительно FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Данные об экспрессии FcR на гематопозитических 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 моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) 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 вследствие 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.

[00215] Связывание с FcγR и C1q также можно измерить методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) или способами на основе ELISA. Связывание с FcγR 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 агликозилирование 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-доме, 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, глицоль, воду, этанол и подобные вещества. Композиция, при необходимости, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих

средств, или буферных средств для поддержания pH. Данные композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, препаратов с замедленным высвобождением и подобные формы. Композиция может быть  
 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 солубилизирующее средство и анестезирующее средство местного действия, такое как лидокаин, 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 композиции, описанные в настоящей заявке, приготовлены в состав в виде нейтральной  
 30 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,  
 35 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  
 40 нарушения, связанного с нарушением экспрессии и/или активности терапевтического 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 связывания с рецептором Fc-гамма и указанных эффекторных 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.

[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 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 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 $\gamma$ R эффекторной функции, оказывает побочные эффекты.

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

[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 Fc $\gamma$ R- и комплемент-опосредованных эффекторных функций, для лечения заболевания. Предполагают, что гетеромультимеры, содержащие конструкции Fc IgG согласно настоящему изобретению, пригодны для получения антител, лишенных Fc $\gamma$ R- и комплемент-опосредованных эффекторных функций, для лечения заболевания.

## 9. Наборы

[00227] В настоящем изобретении дополнительно предложены наборы, содержащие один или более гетеромультимеров. Отдельные компоненты набора будут упакованы в отдельные контейнеры, и к таким контейнерам может быть присоединено указание в форме, установленной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических препаратов, причем 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 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 высушенной 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  
10 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 будут включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

### ПРИМЕРЫ

Ниже приведены примеры для иллюстрации применения настоящего изобретения  
15 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  
20 (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 СН3-домен тяжелой цепи, которые были введены для способствования образованию гетеродимера Fc-домена с увеличенной стабильностью по сравнению с доменом СН3,  
25 не содержащим мутации 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  
30 системы нумерации EU.

[00232] На основе v791 были сконструированы дополнительные варианты с модификациями аминокислот в шарнирной области и/или СН2-домене тяжелой цепи, как показано в таблице А1. Все варианты содержали последовательность легкой цепи трастузумаба, которая приведена в SEQ ID NO: 67 (аминокислоты) и/или SEQ ID NO:  
35 34 (ДНК).

**Таблица А1: Асимметричные конструкции антитела на основе трастузумаба**

40

45

Вариант	Тяжелая цепь А	SEQ ID No.: (аминокислоты/ДНК)	Тяжелая цепь В	SEQ ID No.: (аминокислоты/ДНК)
1051/контроль	L234A/L235A	6/7	L234A/L235A	8/9
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
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.

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.

[00233] Антитела и контроли клонировали и экспрессировали следующим образом. v791 получали путем сайт-направленного мутагенеза с применением стандартных способов. Итоговую ДНК субклонировали в вектор рТТ5 (см. международную публикацию патента № WO 2009/137911). Экспрессию проводили в 2 мл, или 50 мл, или 500 мл клеток CHO 3E7. Клетки CHO трансфицировали в экспоненциальной фазе роста (1,5-2 миллиона клеток/мл) 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)). Для определения оптимального диапазона концентрации для образования гетеродимеров ДНК трансфицировали в оптимальных соотношениях ДНК тяжелой цепи А (НС-А), легкой цепи (LC) и тяжелой цепи В, позволяющих образование гетеродимера (например, соотношение НС-А/НС-В/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.

[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, эксклюзионная хроматография). 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.

[00235]

В таблице A2 обобщены выходы экспрессии для различных образцов.

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

\*н/о = не определено

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

Пример 2: Асимметричные конструкции антитела на основе трастузумаба не связываются с FcγR

[00237] Способность асимметричных конструкций антитела к связыванию с FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb FcγRIIaF, FcγRIIaV и FcγRIa оценивали методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

[00238] Аффинность FcγR в отношении Fc антитела измеряли методом ППП с помощью системы ProteOn XPR36 при температуре 25°C с применением 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3,4 mM 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 mM 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/пеу 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. FcγR 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.

[00239] Соотношение  $K_a$  связывания in vitro, которое определяли методом ППП, для каждого варианта относительно ДТ представлено в таблице В.

Таблица В: Соотношения  $K_d$  связывания с рецепторами  $F_{cy}$ , которое определяли методом ППР, относительно трастузумаба дикого типа

Вариант	2aH <sup>1</sup>	2aR <sup>2</sup>	2b <sup>3</sup>	3aF <sup>4</sup>	3aV <sup>5</sup>	1a <sup>6</sup>
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.  $K_d$  2aH составила 0,48 мкМ. Рецептор анализировали в концентрации 10 мкМ. НИЗКОЕ означает, что  $K_d \gg 10$  мкМ, ОС означает  $K_d \gg 100$  мкМ, где  $\gg$  означает «намного больше».

2.  $K_d$  2aR составила 0,87 мкМ. Рецептор анализировали в концентрации 10 мкМ. НИЗКОЕ означает, что  $K_d \gg 10$  мкМ, ОС означает  $K_d \gg 100$  мкМ.

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

4.  $K_d$  3aF составила 1,9 мкМ. Рецептор анализировали в концентрации 6 мкМ. НИЗКОЕ означает, что  $K_d \gg 6$  мкМ, ОС означает  $K_d \gg 60$  мкМ.

5.  $K_d$  3aV составила 0,60 мкМ. Рецептор анализировали в концентрации 6 мкМ. НИЗКОЕ означает, что  $K_d \gg 6$  мкМ, ОС означает  $K_d \gg 60$  мкМ.

6.  $K_d$  1a составила 0,65 нМ. Рецептор анализировали в концентрации 30 нМ. НИЗКОЕ означает, что  $K_d \gg 30$  нМ, ОС означает  $K_d \gg 300$  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 инъецировали над вариантами МАТ, 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 <sup>1</sup>
ДТ	да
Контроль/1051	ОС
AAC1	частичное
AAC2	ОС
AAC3	ОС
AAC4	ОС
AAC5	ОС
AAC6	ОС
AAC7	ОС
AAC8	ОС

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

[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

[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.

Таблица D: Связывание с FcRn

Вариант	FcRn <sup>1</sup>
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 СН2-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).

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.

[00246] Температурные кривые разворачивания исследованных гетеродимеров представлены на фигуре 2. Температуры плавления исследованных гетеродимеров представлены в таблице E ниже.

[00247]

Таблица Е: Температурная стабильность гетеромультимеров

Вариант	Начало T <sub>m</sub> (ДТ ~66,5С) <sup>1</sup>	T <sub>m</sub> (ДТ ~71,0С) <sup>2</sup>
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 T<sub>m</sub> определяли визуально как первую точку, в которой термограмма на фигуре 2 значительно поднималась над базовой линией.

2. T<sub>m</sub> 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 T<sub>m</sub> и T<sub>m</sub> 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]L234K/L235K[Цепь В]) и AAC5 (L234D/L235E[Цепь А]E233K/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

эксклюзионной 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 рН): Растворители: А, 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 4,44; В, 0,1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 9,20; С, вода MilliQ; D, 0,5 М Ацетат Na, рН 9,13 (кат. №03-Dec-12). Исходный буфер: 18% А, 2% В, 68% С, 12% D=20 мМ NaPO<sub>4</sub>, 60 мМ Ацетат Na, рН~5,9; Градиент: до 2% А, 18% В, 68% С, 12% D=20 мМ NaPO<sub>4</sub>, 60 мМ Ацетат Na, рН~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 рН, как описано выше, или при градиенте соли следующим

образом: Растворители: А 0,1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 4,44; В 0,1 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 9,20; С вода MilliQ; D 0,5 М  $\text{NaCl}$ . Исходный буфер: 18% А, 2% В, 68% С, 12% D=20 мМ  $\text{NaPO}_4$ , 60 мМ  $\text{NaCl}$ , pH~5,9. Градиент соли до 18% А, 2% В, 0% С, 80% D (=20 мМ  $\text{NaPO}_4$ , 400 мМ  $\text{NaCl}$ , 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.

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

10 [00255] Исследовали способность иллюстративного варианта стимулировать ADCC на клетках SK-BR-3 для оценки того, вызывает ли отсутствие измеряемого связывания с Fc $\gamma$ R неспособность опосредовать эффекторную функцию, которую измеряли посредством определения ADCC. Клетки SK-BR-3 экспрессируют на своей поверхности 15 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).

[00257] Культура клеток. Замороженные клетки оттаивали посредством аккуратного вращения виалы на водяной бане при температуре 37°C. Через 1-2 мин. среда в виале 25 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 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%  $\text{CO}_2$  в течение ночи.

[00258] Клетки поддерживали при условиях 37°C/5%  $\text{CO}_2$  и регулярно субкультивировали в подходящей среде с добавлением 10% ЭБС (эмбриональной бычьей сыворотки) согласно протоколу ATCC. 35

[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 40 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/FcR $\gamma$ 3a(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; средой над осадком полностью удаляли. Клетки аккуратно суспендировали со средой для анализа для получения раствора отдельных клеток. Количество клеток-мишеней 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 30 мин. в инкубаторе для культивирования клеток. Для запуска реакции добавляли 100 мкл эффекторных клеток (Е/Т=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 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 неспецифического высвобождения LDH, когда обе клетки инкубировали вместе. Планшет инкубировали в инкубаторе при условиях 37°C/5%CO<sub>2</sub> 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 согласно формуле:

Лизис клеток % =  $100 \cdot (1 - (\text{ОП}_{\text{данные для образца}} - \text{ОП}_{\text{опухолевые клетки плюс эффекторные клетки}}) / (\text{ОП}_{\text{максимальное высвобождение}} - \text{ОП}_{\text{минимальное высвобождение}}))$

[00264] Результаты представлены на фигуре 4 и свидетельствуют, что в данном анализе иллюстративный гетеромультимер АА6 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 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 СН3-домен тяжелой цепи, которые были введены для способствования образованию гетеродимерного Fc-домена с увеличенной стабильностью по сравнению с доменом СН3, не содержащим мутации 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 модификациями аминокислот в шарнирной области и/или СН2-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 рТТ5 (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 (НС-А), легкой цепи (LC) и тяжелой цепи В (соотношение НС-А/НС-В/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 А, выход [мг/л]	Экспрессия в 50 мл, ЭХ, выход [мг/л]	Экспрессия в 250 мл, белок А, выход [мг/л]	Экспрессия в 250 мл, ЭХ, выход [мг/л]
Контроль, Ритуксимаб ДТ 1261			28	15
ААС9	11	6	8	3
ААС10	12	5	24	11
ААС11	12	3	24	9
ААС12	11	4	11	9
ААС13	15	5	7	3
ААС14	10	3	13	11
ААС15	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 FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb, FcγRIIIaF и FcγRIIIaV 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.

Таблица Н: Соотношения Ка связывания с рецепторами Fcγ, 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 Fcγ.

Пример 10: Асимметричные конструкции антитела на основе ритуксимаба являются термостабильными

[00276] Температурную стабильность СН2-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 <sub>m</sub> [°C] <sup>1</sup>
<b>Контроль, Ритуксимаб ДТ 1261</b>	73,0
<b>AAC9</b>	75,3
<b>AAC10</b>	75,3
<b>AAC11</b>	75,4
<b>AAC12</b>	75,4
<b>AAC13</b>	75,4
<b>AAC14</b>	75,2 (сигнал с шумом)
<b>AAC15</b>	67,5

1. Первый переход включал разворачивание как FАВ, так и СН2-домена Ритуксимаба. Т<sub>m</sub> измеряли посредством деконволюции с применением недвухуровневой модели первого перехода.

[00278] Данные результаты свидетельствуют, что множество конструкций обладают большим началом Т<sub>m</sub> и Т<sub>m</sub> СН2-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 FcγR 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 водяной 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 ресуспендировали посредством многократного пипетирования вверх и вниз. Жизнеспособность клеток определяли с помощью окрашивания трипановым синим. Затем суспензию клеток высевали на культуральные матрасы. Клетки инкубировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи.

[00282] Клетки поддерживали при условиях 37°C/5% CO<sub>2</sub> 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 MEM, 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 MEM, 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 суспендировали со средой для анализа для получения раствора отдельных клеток. Количество клеток-мишеней  
10 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  
15 30 мин. в инкубаторе для культивирования клеток. Для запуска реакции добавляли 100 мкл эффекторных клеток (Е/Т=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  
20 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 неспецифического 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 % =  $100 * (1 - (\text{ОП Данные для образца} - \text{ОП опухолевые клетки плюс эффекторные клетки}) / (\text{ОП максимальное высвобождение} - \text{ОП минимальное высвобождение}))$

[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:

40

45

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 литическую активность ADCC, и у многих вариантов данная активность полностью отсутствовала.

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

[00291] Хотя исследование способности к связыванию с C1q 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 повторях). 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% CO<sub>2</sub> 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 =  $100 \times (1 - (\text{О.С.Е.образец}) / (\text{О.С.Е.клетка} + \text{NHS}))$ , где NHS означает нормальную сыворотку человека.

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

**[00296]** Таблица К: 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 литическую 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:

а. 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,

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

с. 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 Fc $\gamma$ RIIaH, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIaR, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIb, составляющей более 10 мкМ,  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIaF, составляющей более 6 мкМ, и  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIIaV, составляющей более 6 мкМ, и  $K_D$  в отношении Fc $\gamma$ RIa, 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 (комплемент-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 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 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 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 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 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 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 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 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

h. 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

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

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 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa по сравнению с соответствующей родительской конструкцией Fc IgG.

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

23. Гетеромультимер по любому из пп. 1-6 или 21, отличающийся тем, что указанная конструкция Fc IgG содержит вариант СН3-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 СН3 T366L/N390R/K392IWT394W, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот СН3 L351Y/S400E/F405A/Y407V; или

35 b. один из первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот СН3 L351Y/F405A/Y407V, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот СН3 T366L/K392M/T394W; или

c. один из первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот СН3 L351Y/F405A/Y407V, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот СН3 T366L/K392L/T394W; или

40 d. один из первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот СН3 T350V/L351Y/F405A/Y407V, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот СН3 T350V/T366L/K392L/T394W; или

e. один из первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот СН3 T350V/L351Y/F405A/Y407V, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот СН3 T350\AT366L/K392M/T394W; или

f. один из первого или второго полипептидов Fc содержит модификации аминокислот СН3 T350V/L351Y/S400E/F405A/Y407V, и другой полипептид Fc содержит модификации аминокислот СН3 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 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.

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.

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.

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 (b) выделение

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.

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

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 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa по сравнению с соответствующей родительской конструкцией 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 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
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
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
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

4

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic monoclonal antibody sequence - trastuzumab light chain

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 451

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic monoclonal antibody sequence - Rituximab+Heavy chain

&lt;400&gt; 4

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



5

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

6

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<sub>85</sub> Tyr Cys Gln Gln Trp<sub>90</sub> Thr Ser Asn Pro<sub>95</sub> Thr

Phe Gly Gly Gly<sub>100</sub> Thr Lys Leu Glu Ile<sub>105</sub> Lys Arg Thr Val Ala<sub>110</sub> Ala Pro

Ser Val Phe<sub>115</sub> Ile Phe Pro Pro Ser<sub>120</sub> Asp Glu Gln Leu Lys<sub>125</sub> Ser Gly Thr

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu<sub>135</sub> Asn Asn Phe Tyr Pro<sub>140</sub> Arg Glu Ala Lys

Val Gln Trp Lys Val Asp<sub>150</sub> Asn Ala Leu Gln Ser<sub>155</sub> Gly Asn Ser Gln Glu<sub>160</sub>

Ser Val Thr Glu Gln<sub>165</sub> Asp Ser Lys Asp Ser<sub>170</sub> Thr Tyr Ser Leu Ser<sub>175</sub> Ser

Thr Leu Thr Leu<sub>180</sub> Ser Lys Ala Asp Tyr<sub>185</sub> Glu Lys His Lys Val<sub>190</sub> Tyr Ala

Cys Glu Val<sub>195</sub> Thr His Gln Gly Leu<sub>200</sub> Ser Ser Pro Val<sub>205</sub> Thr Lys Ser Phe

Asn Arg Gly Glu Cys<sub>210</sub>

<210> 6

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

<400> 6

Glu val Gln Leu Val<sub>5</sub> Glu Ser Gly Gly<sub>10</sub> Leu Val Gln Pro Gly<sub>15</sub> Gly

Ser Leu Arg Leu<sub>20</sub> Ser Cys Ala Ala Ser<sub>25</sub> Gly Phe Asn Ile Lys<sub>30</sub> Asp Thr

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn<sub>55</sub> Gly Tyr Thr Arg Tyr<sub>60</sub> Ala Asp Ser Val

Lys Gly Arg Phe Thr Ile<sub>70</sub> Ser Ala Asp Thr Ser<sub>75</sub> Lys Asn Thr Ala Tyr<sub>80</sub>

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

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	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		

9

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> Artificial Sequence
```

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

<400>	7						
gaggtgcagc	tggctgaaaag	cggaggagga	ctggtgcagc	caggaggatc	tctgcgactg		60
agttagcgccg	cttcaggatt	caacatcaag	gacacctaca	ttcactgggt	gcgacaggct		120
ccaggaaaaag	gactggagtg	ggtggctcga	atctatccca	ctaattggata	caccgcgtat		180
gccgactccg	tgaaggggag	gtttactatt	agcgccgata	catccaaaaa	cactgcttac		240
ctgcagatga	acagcctgcg	agccaagat	accgctgtgt	actattgcag	tcgatgggga		300
ggagacggat	tctacgctat	ggattatttg	ggacagggga	ccctggtgac	agtgagctcc		360
gcctctacca	agggccccag	tgtgtttccc	ctggctcctt	ctagtaaatc	cacctctgga		420
gggacagccg	ctctgggatg	tctggtgaag	gactatttcc	ccgagcctgt	gaccgtgagt		480
tggaactcag	gcgccttgac	aagcggagtg	cacacttttc	ctgctgtgct	gcagtcaagc		540
gggctgtact	ccctgtcctc	tgtggtgaca	gtgccaaagt	caagcctggg	cacacagact		600
tatatctgca	acgtgaatca	taagccctca	aatacaaaa	tggacaagaa	agtggagccc		660
aagagctgtg	ataagacca	cacctgcctt	ccctgtccag	ctccagaagc	cgccggagga		720
cctagcgtgt	tcctgtttcc	ccctaagcca	aaagacactc	tgatgatttc	caggactccc		780
gaggtgacct	gcgtggtggt	ggacgtgtct	cacgaggacc	ccgaagtga	gttcaactgg		840
tacgtggatg	gcgtggaagt	gcataatgct	aagacaaaac	caagagagga	acagtacaac		900
tccacttatc	gcgtcgtgag	cgtgctgacc	gtgctgcacc	aggactggct	gaacgggaag		960
gagtataagt	gcaaagtcat	taataaggcc	ctgcctgctc	caatcgaaaa	aacctctctt		1020
aaggccaaga	gccagccaag	ggagccccag	gtgtacgtgt	acccacccag	cagagacgaa		1080
ctgaccaaga	accaggtgtc	cctgacatgt	ctggtgaaa	gcttctatcc	tagtgatatt		1140
gctgtggagt	gggaatcaaa	tggacagcca	gagaacaatt	acaagaccac	acctccagt		1200
ctggacgagg	atggcagctt	cgccctgggt	tccaagctga	cagtggataa	atctcgatgg		1260
cagcaqqqqa	acgtgtttaq	ttgttcagtq	atgcatgaag	ccctgcacaa	tcattacact		1320

cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa

1350

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

&lt;400&gt; 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 tgggtggaaag cggaggagga ctggtgcagc caggaggatc tctgcgactg 60  
 agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcactgggt gcgacaggct 120  
 ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata caccggtat 180

12

```

gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac      240
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga      300
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctggtgac agtgagctcc      360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagtaaatc cacctctgga      420
gggacagccg ctctgggatg tctggtgaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt      480
tggaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc      540
gggctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact      600
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc      660
aagagctgtg ataagacca cacctgccct ccctgtccag ctccagaagc cgccggagga      720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc      780
gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgtct cagcaggacc ccgaagtga gttcaactgg      840
tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac      900
tccacttatc gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag      960
gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct    1020
aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccaccag cagagacgaa    1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgctgtgt ctggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt    1140
gctgtggagt gggaatcaaa tggacagcca gagaacagat acatgacctg gcctccagtg    1200
ctggacagcg atggcagctt cttcctgtat tccaagctga cagtggataa atctcgatgg    1260
cagcagggga acgtgtttag ttgttcagtg atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact    1320
cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa                                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<sub>100</sub> Gly Asp Gly Phe Tyr<sub>105</sub> Ala Met Asp Tyr Trp<sub>110</sub> Gly Gln  
 Gly Thr Leu<sub>115</sub> Val Thr Val Ser Ser<sub>120</sub> Ala Ser Thr Lys Gly<sub>125</sub> Pro Ser Val  
 Phe Pro<sub>130</sub> Leu Ala Pro Ser Ser<sub>135</sub> Lys Ser Thr Ser Gly<sub>140</sub> Gly Thr Ala Ala  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys<sub>150</sub> Asp Tyr Phe Pro Glu<sub>155</sub> Pro Val Thr Val Ser<sub>160</sub>  
 Trp Asn Ser Gly Ala<sub>165</sub> Leu Thr Ser Gly Val<sub>170</sub> His Thr Phe Pro Ala<sub>175</sub> Val  
 Leu Gln Ser Ser<sub>180</sub> Gly Leu Tyr Ser Leu<sub>185</sub> Ser Ser Val Val Thr<sub>190</sub> Val Pro  
 Ser Ser Ser<sub>195</sub> Leu Gly Thr Gln Thr<sub>200</sub> Tyr Ile Cys Asn Val<sub>205</sub> Asn His Lys  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp<sub>215</sub> Lys Lys Val Glu Pro<sub>220</sub> Lys Ser Cys Asp  
 Lys Thr His Thr Cys Pro<sub>230</sub> Pro Cys Pro Ala Pro<sub>235</sub> Glu Asp Glu Gly Gly<sub>240</sub>  
 Pro Ser Val Phe Leu<sub>245</sub> Phe Pro Pro Lys Pro<sub>250</sub> Lys Asp Thr Leu Met<sub>255</sub> Ile  
 Ser Arg Thr Pro<sub>260</sub> Glu Val Thr Cys Val<sub>265</sub> Val Val Asp Val Ser<sub>270</sub> His Glu  
 Asp Pro Glu<sub>275</sub> Val Lys Phe Asn Trp<sub>280</sub> Tyr Val Asp Gly Val<sub>285</sub> Glu Val His  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg<sub>295</sub> Glu Glu Gln Tyr Asn<sub>300</sub> Ser Thr Tyr Arg  
 Val Val Ser Val Leu Thr<sub>310</sub> Val Leu His Gln Asp<sub>315</sub> Trp Leu Asn Gly Lys<sub>320</sub>  
 Glu Tyr Lys Cys Lys<sub>325</sub> Val Ser Asn Lys Ala<sub>330</sub> Leu Pro Ala Pro Ile<sub>335</sub> Glu  
 Lys Thr Ile Ser<sub>340</sub> Lys Ala Lys Gly Gln<sub>345</sub> Pro Arg Glu Pro Gln<sub>350</sub> Val Tyr  
 Val Tyr Pro<sub>355</sub> Pro Ser Arg Asp Glu<sub>360</sub> Leu Thr Lys Asn Gln<sub>365</sub> Val Ser Leu  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

14

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  
gagggtgcagc tgggtggaag cggaggagga ctggtgcagc caggaggatc tctgcgactg 60  
agttgcgccc cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcactgggt gcgacaggct 120  
ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata caccgggtat 180  
gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcggcgata catccaaaaa cactgcttac 240  
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga 300  
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc 360  
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagtaaadc cacctctgga 420  
gggacagccg ctctgggatg tctgtgtaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480  
tggaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc 540  
gggctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600  
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc 660  
aagagctgtg ataagaccca cacctgccct ccctgtccag ctccagaaga cgaggaggga 720  
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780  
gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgtct cagcaggacc ccgaagtga gttcaactgg 840  
tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac 900  
tccacttata gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag 960  
gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct 1020  
aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgt acccaccag cagagacgaa 1080  
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacatgt ctggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140  
gctgtggagt gggaatcaaa tggacagcca gagaacaatt acaagaccac acctccagtg 1200

15

ctggacgagg atggcagctt cgccctggtg tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260  
 cagcagggga acgtgttttag ttgttcagtg atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320  
 cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa 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 ctggtgcagc caggaggatc tctgcgactg

60

```

agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcactgggt gcgacaggct 120
ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata caccgggtat 180
gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac 240
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga 300
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc 360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagtaaatt cacctctgga 420
gggacagccc ctctgggatg tctgtggaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480
tggaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc 540
gggctgtact ccctgtcctc tgtgtggaag gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600
tatactctga acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc 660
aagagctgtg ataagacca cacctgccct ccctgtccag ctccagccga cgagggagga 720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780
gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtct cagcaggacc ccgaagtga gttcaactgg 840
tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac 900
tccacttacc gcgtcgtgag cgtgtgacc gtgtgcacc aggactggct gaacgggaag 960
gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgcctgtc caatcgaaaa aaccatctct 1020
aaggccaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgt acccaccag cagagacgaa 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacatgt ctggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140
gctgtggagt gggaatcaaa tggacagcca gagaacaatt acaagaccac acctccagt 1200
ctggacgagg atggcagctt cgccctgggt tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260
cagcagggga acgtgttttag ttgttcagt atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320
cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa 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 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

```

18

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

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  
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggaggagga ctggtgcagc caggaggatc tctgcgactg 60  
 agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttactgggt ggcacaggct 120  
 ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata caccgggtat 180  
 gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac 240  
 ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga 300  
 ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc 360  
 gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagttaaac cacctctgga 420  
 gggacagccg ctctgggatg tctggtgaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480  
 tggaaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc 540  
 gggctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600  
 tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaag tggacaagaa agtggagccc 660  
 aagagctgtg ataagacca cacctgccct ccctgtccag ctccagccaa ggccggagga 720  
 cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780  
 gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgtct cagcaggacc ccgaagtga gttcaactgg 840  
 tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac 900  
 tccacttate gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag 960  
 gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct 1020  
 aaggccaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgt acccaccag cagagacgaa 1080

20

ctgaccaaga accaggtgtc cctgacatgt ctggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140  
 gctgtggagt gggaatcaaa tggacagcca gagaacaatt acaagaccac acctccagtg 1200  
 ctggacgagg atggcagctt cgccctggtg tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260  
 cagcagggga acgtgttttag ttgttcagtg atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320  
 cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa 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 tggtggaaag cggaggagga ctggtgcagc caggaggatc tctgcgactg      60
agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcactgggt gcgacaggct      120
ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata cacccggtat      180
gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catcaaaaa cactgcttac      240
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga      300
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc      360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagtaaatc cacctctgga      420
gggacagccg ctctgggatg tctgtgaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt      480
tggaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc      540
gggctgtact ccctgtcctc tgtgtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact      600
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc      660
aagagctgtg ataagacca cacctgccct ccctgtccag ctccagaact gctgggagga      720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc      780
gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtct caccagaacc ccgaagtga gttcaactgg      840
tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac      900
tccacttate gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag      960
gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct      1020
aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgt acccaccag cagagacgaa      1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacatgt ctggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt      1140
gctgtggagt gggaatcaaa tggacagcca gagaacaatt acaagaccac acctccagt      1200
ctggacgagg atggcagctt cgccctgggt tccaagctga cagtggataa atctcgatgg      1260
cagcagggga acgtgttttag ttgttcagt atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact      1320
cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa      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 65	Gly Arg Phe Thr	Ile 70	Ser Ala Asp Thr	Ser 75 Lys Asn Thr Ala Tyr 80
Leu 145	Gln Met Asn 85	Leu Arg Ala Glu 90	Asp Thr Ala Val Tyr 95	Cys
Ser	Arg Trp Gly 100	Gly Asp Gly Phe Tyr 105	Ala Met Asp Tyr Trp 110	Gly Gln
Gly 115	Thr Leu Val Thr Val	Ser 120	Ser Ala Ser Thr Lys Gly 125	Pro Ser Val
Phe 130	Pro Leu Ala Pro	Ser 135	Ser Lys Ser Thr Ser Gly 140	Gly Thr Ala Ala
Leu 145	Gly Cys Leu Val	Lys 150	Asp Tyr Phe Pro Glu 155	Pro Val Thr Val Ser 160
Trp	Asn Ser Gly Ala 165	Leu Thr Ser Gly Val 170	His Thr Phe Pro Ala 175	Val
Leu	Gln Ser Ser 180	Gly Leu Tyr Ser Leu 185	Ser Ser Val Val Thr 190	Val Pro
Ser	Ser Ser 195	Leu Gly Thr Gln Thr 200	Tyr Ile Cys Asn Val 205	Asn His Lys
Pro 210	Ser Asn Thr Lys Val	Asp 215	Lys Lys Val Glu Pro 220	Lys Ser Cys Asp
Lys 225	Thr His Thr Cys Pro 230	Pro Cys Pro Ala Pro 235	Glu Leu Leu Gly Gly 240	
Pro	Ser Val Phe Leu 245	Phe Pro Pro Lys Pro 250	Lys Asp Thr Leu Met 255	Ile
Ser	Arg Thr Pro 260	Glu Val Thr Cys Val 265	Val Val Asp Val Ser 270	His Glu
Asp	Pro Glu Val Lys Phe Asn 280	Trp Tyr Val Asp Gly Val 285	Glu Val His	
Asn 290	Ala Lys Thr Lys Pro	Arg 295	Glu Glu Gln Tyr Asn 300	Ser Thr Tyr Arg
Val 305	Val Ser Val Leu Thr 310	Val Leu His Gln Asp 315	Trp Leu Asn Gly Lys 320	
Glu	Tyr Lys Cys Lys 325	Val Ser Asn Lys Ala 330	Leu Pro Ala Pro Ile 335	Glu
Lys	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			

24

340 345 350

Val Tyr Pro<sub>355</sub> Pro Ser Arg Asp Glu<sub>360</sub> Leu Thr Lys Asn Gln<sub>365</sub> Val Ser Leu

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro<sub>390</sub> Glu Asn Asn Tyr Lys<sub>395</sub> Thr Thr Pro Pro Val<sub>400</sub>

Leu Asp Glu Asp Gly<sub>405</sub> Ser Phe Ala Leu Val<sub>410</sub> Ser Lys Leu Thr Val<sub>415</sub> Asp

Lys Ser Arg Trp<sub>420</sub> Gln Gln Gly Asn Val<sub>425</sub> Phe Ser Cys Ser Val<sub>430</sub> Met His

Glu Ala Leu<sub>435</sub> His Asn His Tyr Thr<sub>440</sub> Gln Lys Ser Leu Ser<sub>445</sub> Leu Ser Pro

Gly Lys<sub>450</sub>

<210> 19  
 <211> 1350  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 19  
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggaggagga ctggtgcagc caggaggatc tctgcgactg 60  
 agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttacttgggt gcgacaggct 120  
 ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata caccgggtat 180  
 gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catcaaaaa cactgcttac 240  
 ctgcagatga acagcctgag agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga 300  
 ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctggtgac agtgagctcc 360  
 gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagttaaacc cacctctgga 420  
 gggacagccg ctctgggatg tctggtgaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480  
 tggaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc 540  
 gggctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600  
 tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc 660  
 aagagctgtg ataagaccca cacctgccct ccctgtccag ctccagaact gctgggagga 720  
 cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780  
 gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtct cagcaggacc ccgaagtga gttcaactgg 840  
 tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac 900  
 tccacttatc gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag 960

25

gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct 1020  
aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgt acccaccag cagagacgaa 1080  
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacatgt ctggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140  
gctgtggagt gggaatcaaa tggacagcca gagaacaatt acaagaccac acctccagt 1200  
ctggacgagg atggcagctt cgccctggtg tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260  
cagcagggga acgtgttttag ttgttcagt atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320  
cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa 1350

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

&lt;400&gt; 20

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

26

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 tggaggaaag cggaggagga ctggtgcagc caggaggatc tctgcgactg      60
agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcactgggt gcgacaggct      120
ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata caccgggtat      180
gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac      240
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga      300
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc      360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagtaaatt cacctctgga      420
gggacagccc ctctgggatg tctgtggaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt      480
tggaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc      540
gggctgtact ccctgtcttc tgtggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact      600
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc      660
aagagctgtg ataagacca cacctgccct ccctgtccag ctccagaact gctgggagga      720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc      780
gaggtgacct gcgtgggtgg ggacgtgtct cagcaggacc ccgaagtga gttcaactgg      840
tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac      900
tccacttatt gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag      960
gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct 1020
aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccacccag cagagacgaa 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgctgtgt ctggtgaaa gcttctatcc tagtgatatt 1140
gctgtggagt gggaatcaaa tggacagcca gagaacagat acatgacctg gcctccagt 1200
ctggacagcg atggcagctt cttcctgtat tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260
cagcagggga acgtgttttag ttgttcagt atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320
cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa 1350

```

<210> 22

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic monoclonal antibody polypeptide sequence - variant

<400> 22

```

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

```

28

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	Gln



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

gagggtgcagc tgggtgaaag cggaggagga ctgggtgcagc caggaggatc tctgcgactg	60
agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcactgggt gcgacaggct	120
ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata cacccggtat	180
gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac	240
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga	300
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc	360
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagttaaact cacctctgga	420
gggacagccg ctctgggatg tctggtgaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt	480
tggaaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc	540
gggctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact	600
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc	660
aagagctgtg ataagacca cacctgccct ccctgtccag ctccagaaaa gaagggagga	720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc	780
gagggtgacct gcgtggtggt ggacgtgtct cagcaggacc ccgaagtga gttcaactgg	840

30

```

tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac      900
tccacttatac gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag      960
gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct      1020
aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccaccag cagagacgaa      1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgctgtgt ctggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt      1140
gctgtggagt gggaaatcaaa tggacagcca gagaacagat acatgacctg gcctccagtg      1200
ctggacagcg atggcagctt cttcctgtat tccaagctga cagtggataa atctcgatgg      1260
cagcagggga acgtgttttag ttgttcagtg atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact      1320
cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa      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 cggaggagga ctggtgcagc caggaggatc tctgcgactg 60  
 agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttactgggt gcgacaggct 120  
 ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatcca ctaatggata caccgggtat 180  
 gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catcaaaaa cactgcttac 240  
 ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga 300  
 ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc 360  
 gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagtaaadc cacctctgga 420  
 gggacagccg ctctgggatg tctggtgaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480  
 tggaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc 540  
 gggctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600  
 tatactgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc 660  
 aagagctgtg ataagacca cacctgccct ccctgtccag ctccagccag aagaggagga 720  
 cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780  
 gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgtct cagcaggacc ccgaagtga gttcaactgg 840  
 tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac 900  
 tccacttatc gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag 960  
 gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgctgtctc caatcgaaaa aaccatctct 1020  
 aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccaccag cagagacgaa 1080  
 ctgaccaaga accaggtgtc cctgctgtgt ctggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140  
 gctgtggagt gggaaatcaaa tggacagcca gagaacagat acatgacctg gcctccagtg 1200  
 ctggacagcg atggcagctt cttcctgtat tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260  
 cagcagggga acgtgtttag 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 210 Ser Asn Thr Lys Val Asp 215 Lys Lys Val Glu 220 Pro Lys Ser Cys Asp

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 325	Val	Ser	Asn	Lys	Ala 330	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 335	Glu
Lys	Thr	Ile	Ser 340	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln 345	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 350	Val	Tyr
Val	Leu	Pro 355	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu 360	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln 365	Val	Ser	Leu
Leu	Cys 370	Leu	Val	Lys	Gly	Phe 375	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile 380	Ala	Val	Glu	Trp
Glu 385	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro 390	Glu	Asn	Arg	Tyr	Met 395	Thr	Trp	Pro	Pro	Val 400
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly 405	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr 410	Ser	Lys	Leu	Thr	Val 415	Asp
Lys	Ser	Arg	Trp 420	Gln	Gln	Gly	Asn	Val 425	Phe	Ser	Cys	Ser	Val 430	Met	His
Glu	Ala	Leu 435	His	Asn	His	Tyr	Thr 440	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser 445	Leu	Ser	Pro
Gly	Lys 450														

<210>	27
<211>	1350
<212>	DNA
<213>	Artificial Sequence

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

<400>	27	gaggtgcagc	tggtggaaag	cggaggagga	ctggtgcagc	caggaggatc	tctgcgactg	60
		agttgcgccg	cttcaggatt	caacatcaag	gacacctaca	ttcactgggt	gcgacaggct	120
		ccaggaaaag	gactggagtg	ggtggctcga	atctatccca	ctaattggata	cacccggtat	180
		gccgactccg	tgaaggggag	gtttactatt	agcgccgata	catccaaaaa	cactgcttac	240
		ctgcagatga	acagcctgcg	agccgaagat	accgctgtgt	actattgcag	tcgatgggga	300
		ggagacggat	tctacgctat	ggattatttg	ggacagggga	ccctggtgac	agtgagctcc	360
		gcctctacca	agggccccag	tgtgtttccc	ctggctcctt	ctagtaaatc	cacctctgga	420
		gggacagccg	ctctgggatg	tctggtgaag	gactatttcc	ccgagcctgt	gaccgtgagt	480
		tggaaactcag	gcgccctgac	aagcggagtg	cacacttttc	ctgctgtgct	gcagtcaagc	540
		gggctgtact	ccctgtcctc	tgtggtgaca	gtgccaaagt	caagcctggg	cacacagact	600
		tatatctgca	acgtgaatca	taagccctca	aatacaaaag	tggacaagaa	agtggagccc	660
		aagagctgtg	ataagaccga	cacctgccct	ccctgtccag	ctccaaagag	aagaggagga	720

35

```

cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc      780
gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtct cacgaggacc ccgaagtga gttcaactgg      840
tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac      900
tccacttata gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag      960
gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct    1020
aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccaccag cagagacgaa    1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgctgtgt ctggtgaaa gcttctatcc tagtgatatt    1140
gctgtggagt gggaatcaaa tggacagcca gagaacagat acatgacctg gcctccagtg    1200
ctggacagcg atggcagctt cttcctgtat tccaagctga cagtggataa atctcgatgg    1260
cagcagggga acgtgttttag ttgttcagt atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact    1320
cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa                                1350

```

```

<210> 28
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 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
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  
gagggtgcagc tgggtgaaag cggaggagga ctggtgcagc caggaggatc tctgcgactg 60  
agttgcgccc ctccaggatt caacatcaag gacacctaca ttactgggt gcgacaggct 120  
ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata caccgggtat 180  
gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaa cactgcttac 240  
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga 300  
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc 360  
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagttaaac cacctctgga 420  
gggacagccc ctctgggatg tctgggaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480  
tggaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc 540  
gggctgtact ccctgtcctc tgtgtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600  
tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc 660  
aagagctgtg ataagaccca cacctgccct ccctgtccag ctccaaaggc caagggagga 720  
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780  
gagggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtct cagcaggacc ccgaagtga gttcaactgg 840  
tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac 900  
tccacttata gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag 960  
gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct 1020  
aaggccaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccacccag cagagacgaa 1080  
ctgaccaaga accaggtgtc cctgctgtgt ctggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140  
gctgtggagt gggaatcaaa tggacagcca gagaacagat acatgacctg gcctccagtg 1200  
ctggacagcg atggcagctt cttcctgtat tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260  
cagcagggga acgtgttttag ttgttcagt atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320  
cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa 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
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 Leu Leu Gly
	225	230	235
Pro Ser Val	Phe Leu Phe Pro	Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met
	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

39

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> 31  
<211> 1350  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

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

<400> 31  
gaggtgcagc tgggtgaaag cggaggagga ctggtgcagc caggaggatc tctgcgactg 60  
agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttactgggt gcgacaggct 120  
ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata caccgggtat 180  
gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catcaaaaa cactgcttac 240  
ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga 300  
ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctggtgac agtgagctcc 360  
gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagttaaacc cacctctgga 420  
gggacagccg ctctgggatg tctggtgaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480  
tggaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc 540  
gggctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600

40

```

tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc      660
aagagctgtg ataagaccca cacctgccct ccctgtccag ctccagaact gctgggagga      720
cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc      780
gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgtct cacaagagac ccgaagtga gttcaactgg      840
tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac      900
tccacttata gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag      960
gagtataagt gcaaagtcag taataaggcc ctgcctgctc caatcgaaaa aaccatctct    1020
aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccaccag cagagacgaa    1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgctgtgt ctggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt    1140
gctgtggagt gggaaatcaaa tggacagcca gagaacagat acatgacctg gcctccagtg    1200
ctggacagcg atggcagctt cttcctgtat tccaagctga cagtggataa atctcgatgg    1260
cagcagggga acgtgttttag ttgttcagt atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact    1320
cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa                                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          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 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  
 gaggtgcagc tggaggaaag cggaggagga ctggtgcagc caggaggatc tctgcgactg 60  
 agttgcgccg cttcaggatt caacatcaag gacacctaca ttcactgggt gcgacaggct 120  
 ccaggaaaag gactggagtg ggtggctcga atctatccca ctaatggata caccgggtat 180  
 gccgactccg tgaaggggag gtttactatt agcgccgata catccaaaaa cactgcttac 240  
 ctgcagatga acagcctgcg agccgaagat accgctgtgt actattgcag tcgatgggga 300  
 ggagacggat tctacgctat ggattattgg ggacagggga ccctgggtgac agtgagctcc 360  
 gcctctacca agggccccag tgtgtttccc ctggctcctt ctagtaaadc cacctctgga 420  
 gggacagccg ctctgggatg tctgggtaag gactatttcc ccgagcctgt gaccgtgagt 480  
 tggaaactcag gcgccctgac aagcggagtg cacacttttc ctgctgtgct gcagtcaagc 540  
 gggctgtact ccctgtcctc tgtggtgaca gtgccaagtt caagcctggg cacacagact 600  
 tatatctgca acgtgaatca taagccctca aatacaaaaag tggacaagaa agtggagccc 660  
 aagagctgtg ataagaccca cacctgccct ccctgtccag ctccagaact gaagggagga 720  
 cctagcgtgt tcctgtttcc ccctaagcca aaagacactc tgatgatttc caggactccc 780  
 gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtct cagcaggacc ccgaagtga gttcaactgg 840  
 tacgtggatg gcgtggaagt gcataatgct aagacaaaac caagagagga acagtacaac 900  
 tccacttatt gcgtcgtgag cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacgggaag 960  
 gagtataagt gcaaagtcag taataagaag ctgcctgtct caatcgaaaa aaccatctct 1020  
 aaggccaaag gccagccaag ggagccccag gtgtacgtgc tgccaccag cagagacgaa 1080  
 ctgaccaaga accagggtgt cctgctgtgt ctgggtgaaag gcttctatcc tagtgatatt 1140  
 gctgtggagt gggaaatcaa tggacagcca gagaacagat acatgacctg gcctccagt 1200  
 ctggacagcg atggcagctt cttcctgtat tccaagctga cagtggataa atctcgatgg 1260  
 cagcagggga acgtgtttag ttgttcagt atgcatgaag ccctgcacaa tcattacact 1320  
 cagaagagcc tgtccctgtc tcccggcaaa 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 ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca ggacgttaac accgctgtag cttggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctattct gcatcctttt tgtacagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtcgatac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag cattacacta cccacccac tttcggccaa 300  
gggaccaaag tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga 360  
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccaa 480  
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 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

44

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  
 caggctccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtcaaac ctggcgcac cgtgaaaatg 60  
 tcttgcaagg ctagtggtcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120  
 ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180  
 aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240  
 atgcagctga gtctactgac aagtgaagac tcagcagtg actattgcgc cagaagcacc 300  
 tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360  
 gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt ccaactggcac caagctcaa gtcaaccagc 420  
 ggaggaacag cagccctggg atgtctgggt aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg 480  
 tcttggaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt tccccgctgt gctgcagtct 540  
 agtggcctgt acagcctgtc aagcgtgggt accgtccctt cctctagtct ggggactcag 600  
 acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa 660  
 ccaaaaagt gtgataagac acatacttgc ccaccttgtc ctgcaccaga gctgctggga 720  
 ggaccatccg tgttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact 780  
 cctgaagtca cctgcgtgggt cgtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac 840  
 tgggtacgtg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac 900  
 aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960  
 aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgccc cactatcga gaagactatt 1020  
 tctaaagcca agggccagcc tagggaacca caggtgtacg tgtaccctcc aagccgcgac 1080  
 gagctgacta aaaaccaggt ctccctgacc tgtctgggtga aggggttcta tccaagtgat 1140  
 atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacaagac tccccccct 1200  
 gtgctggact cagatgggag cttcgccctg gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcgg 1260  
 tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac 1320  
 acccagaagt ccctgagcct gtcaccggc aaa 1353

<210> 37  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

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

## variant

&lt;400&gt; 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

47

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	
cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtcaaac ctggcgcatc cgtgaaaatg	60
tcttgcaagg ctagtggcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca	120
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat	180
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac	240
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaagcacc	300
tactatggcg gggattggtta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc	360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt cactggcac caagctccaa gtcaaccagc	420

48

```

ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg      480
tcttgaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctgcagtct      540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtgggc accgtccctt cctctagtct ggggactcag      600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa      660
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccaccttgtc ctgcaccaga gctgctggga      720
ggaccatccg tgttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact      780
cctgaagtca cctgctggtt cgtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaatccaac      840
tggtacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac      900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgcccg cacctatcga gaagactatt     1020
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca caggtgtacg tgctgcctcc aagccgcgac     1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgctg tgtctggtga aggggttcta tccaagtgat     1140
atcgtgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccct     1200
gtgctggact cagatgggag cttctttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcgg     1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac     1320
accagaagt ccctgagcct 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

49

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

50

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 tgcagcagcc cggagctgaa ctgggtcaaac ctggcgcatc cgtgaaaatg 60  
 tcttgcaagg ctagtggcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120  
 ccaggacgag gactggagtg gatcgagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180  
 aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240  
 atgcagctga gtctactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaagcacc 300  
 tactatggcg gggattggtg cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360  
 gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt cactggcac caagctcaa gtcaaccagc 420  
 ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg 480  
 tcttggaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgtg gctgcagtct 540  
 agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag 600  
 acctatatct gcaacgtgaa tcacaacct tctaatacaa aggtcgaca gaaagtggaa 660  
 ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccacctgtc ctgcaccaga ggacgagggg 720  
 ggaccatccg tgttctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact 780  
 cctgaagtca cctgcgtggt cgtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac 840  
 tgggtacgtg atggcgctga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac 900  
 aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960  
 aaggagtata aatgcaagggt gtccaacaag gccctgcccc cacctatcga gaagactatt 1020  
 tctaagcca agggccagcc tagggaacca cagggtgacg tgtaccctcc aagccgcgac 1080  
 gagctgacta aaaaccagggt ctccctgacc tgtctggtga aggggttcta tccaagtgat 1140  
 atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag ccgagaaca attacaagac tccccccct 1200  
 gtgctggact cagatgggag cttcgccctg gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcgg 1260  
 tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac 1320  
 acccagaagt ccctgagcct gtcacccggc aaa 1353

<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

52

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 ctggtcaaac ctggcgcacg cgtgaaaatg 60

tcttgaagg ctagtggcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120

ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180



```

aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac      240
atgcagctga gttcactgac 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
tcttgaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgtg gctgcagtct      540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag      600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa      660
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccaccttgtc ctgcaccaa gagaagagga      720
ggaccatccg tgttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact      780
cctgaagtca cctgcgtggt cgtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac      840
tggtacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac      900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgcccg cacctatcga gaagactatt     1020
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca cagggtgtacg tgctgcctcc aagccgcgac     1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgctg tgtctggtga aggggttcta tccaagtgat     1140
atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccct     1200
gtgctggact cagatgggag cttctttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcgg     1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac     1320
accagaagt ccctgagcct gtcacccggc 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          80

```

54

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

55

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 ctgggtcaaac ctggcgcatc cgtgaaaatg 60  
tcttgaagg ctagtggtta cacattcact tcctataaca tgactgggt gaagcagaca 120  
ccaggacgag gactggagtg gatcgagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180  
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcttc taccgcttac 240  
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtg actattgctc cagaagcacc 300  
tactatggcg gggattggtta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360  
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt cactggcac caagctcaa gtcaaccagc 420  
ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg 480  
tcttgaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctgcagtct 540  
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag 600  
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa 660  
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccaccttgtc ctgcaccaga ggacgaggga 720  
ggaccatccg tgttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact 780  
cctgaagtca cctgcgtggt cgtgagcgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac 840  
tggtacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaaca agccccggga ggaacagtac 900  
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960  
aaggagtata aatgaagggt gtccaacaag gccctgcccg cacctatcga gaagactatt 1020  
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca caggtgtacg tgtaccctcc aagccgcgac 1080  
gagctgacta aaaaccaggt ctcctgacc tgtctggtga aggggttcta tccaagtgat 1140

atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacaagac tacccccct 1200  
 gtgctggact cagatgggag cttcgccctg gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcgg 1260  
 tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac 1320  
 acccagaagt ccctgagcct gtcacccggc aaa 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

57

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
cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctgggtcaaac ctggcgcatc cgtgaaaatg      60
tcttgcaagg ctagtggcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca      120
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat      180
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac      240
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtggt actattgcgc cagaagcacc      300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc      360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt ccactggcac caagctcaa gtcaaccagc      420
ggaggaacag cagccctggg atgtctgggt aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg      480
tcttggaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgtg gctgcagtct      540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag      600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa      660
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccaccttgtc ctgcaccaa gagaagagga      720
ggaccatccg tggttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact      780
cctgaagtca cctgcgtggg cgtgagcgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac      840
tggtacgtgg atggcgctga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac      900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaggagtata aatgcaagggt gtccaacaag gccctgcccg cacctatcga gaagactatt     1020
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca cagggtgtacg tgctgcctcc aagccgcgac     1080
gagctgacta aaaaccagggt ctccctgctg tgtctgggtg aggggttcta tccaagtgat     1140
atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccct     1200
gtgctggact cagatgggag cttctttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcgg     1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac     1320
accagaagt ccctgagcct 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          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

```

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 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  
cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctgggtcaaac ctggcgcacg cgtgaaaatg 60  
tcttgcaagg ctagtggtcta cacattcact tcctataaca tgcaactgggt gaagcagaca 120  
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180  
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240  
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtggt actattgcgc cagaagcacc 300  
tactatggcg gggattggtta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360  
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt ccaactggcac caagctccaa gtcaaccagc 420  
ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg 480  
tcttggaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgtg gctgcagctc 540  
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtgggt accgtccctt cctctagtct ggggactcag 600  
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa 660  
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccaccttgtc ctgcaccaga ggacgagggg 720  
ggaccatccg tggttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact 780  
cctgaagtca cctgcgtggt cgtggacgtg agccacaagg accccgaagt caaattcaac 840  
tggtacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac 900



61

```

aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgcccg cacctatcga gaagactatt      1020
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca caggtgtacg tgtaccctcc aagccgcgac      1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgacc tgtctggtga aggggttcta tccaagtgat      1140
atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacaagac tccccccct      1200
gtgctggact cagatgggag cttcgccctg gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcgg      1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac      1320
accagaagt ccctgagcct 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
cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtcaaac ctggcgcatac cgtgaaaatg      60
tcttgcaagg ctagtggcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca      120
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat      180
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac      240
atgcagctga gtctactgac aagtgaagac tcagcagtggt actattgcgc cagaagcacc      300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc      360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc      420
ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg      480
tcttggaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgtg gctgcagtct      540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag      600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa      660
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccaccttgtc ctgcaccaa gagaagagga      720
ggaccatccg tgttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact      780
cctgaagtca cctgcgtggt cgtggacgtg agccacaagg accccgaagt caaattcaac      840
tggtacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac      900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaggagtata aatgcaaggt gtccaacaag gccctgcccg cacctatcga gaagactatt     1020
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca cagggtgtacg tgctgcctcc aagccgcgac     1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgctg tgtctggtga aggggttcta tccaagtgat     1140
atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccct     1200
gtgctggact cagatgggag cttctttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcgg     1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct 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
  
```

64

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

cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtcaaac ctggcgcacg cgtgaaaatg	60
tcttgcaagg ctagtggtcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca	120
ccaggacgag gactggagtg gatcgagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat	180
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac	240
atgcagctga gtctactgac aagtgaagac tcagcagtggt actattgcgc cagaagcacc	300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc	360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt cactggcac caagctcca gtcaaccagc	420
ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg	480
tcttgaaca gtggcgcctt gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctgcagtct	540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag	600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa	660

66

```

ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccaccttgtc ctgcaccaga ggacgagggg 720
ggaccatccg tgttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact 780
cctgaagtca cctgctggtt cgtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac 840
tggtacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac 900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggagtata aatgcgccgt gtccaacaag gccctgcccg cacctatcga gaagactatt 1020
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca caggtgtacg tgtaccctcc aagccgcgac 1080
gagctgacta aaaaccaggt ctcctgacc tgtctggtga aggggttcta tccaagtgat 1140
atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacaagac tccccccct 1200
gtgctggact cagatgggag cttgccctg gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcgg 1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac 1320
accagaagt 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

```

67

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 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 ctgggtcaaac ctggcgcac cgtgaaaatg      60
tcttgcaagg ctagtggtcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca      120
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat      180
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac      240
atgcagctga gtctactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaagcacc      300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc      360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt cactggcac caagctcaa gtcaaccagc      420
ggaggaacag cagccctggg atgtctgggt aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg      480
tcttggaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctgcagtct      540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag      600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa      660
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccacctgtc ctgcaccaa gagaagagga      720
ggaccatccg tgttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact      780
cctgaagtca cctgcgtggg cgtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac      840
tggtacgtgg atggcgctga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac      900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaggagtata aatgcgccgt gtccaacaag gccctgcccg cacctatcga gaagactatt     1020
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca cagggtgacg tgtgcctcc aagccgcgac     1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgctg tgtctgggtga aggggttcta tccaagtgat     1140
atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccct     1200
gtgctggact cagatgggag cttctttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcgg     1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac     1320
accagaagt ccctgagcct gtcaccggc aaa                                     1353

```

<210> 55  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

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



## variant

&lt;400&gt; 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

70

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 ctggtcaaac ctggcgcac cgtgaaaatg	60
tcttgcaagg ctagtggcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca	120
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat	180
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac	240
atgcagctga gtctactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaagcacc	300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc	360
gccgcttcca caaaggacc aagcgtgttt ccactggcac caagctccaa gtcaaccagc	420

71

```

ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg      480
tcttgaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgtg gctgcagtct      540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag      600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa      660
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccaccttgtc ctgcaccaga ggacgagggg      720
ggaccatccg tgttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact      780
cctgaagtca cctgcgtggt cgtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac      840
tgggtacgtg atggcgctga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac      900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaggagtata aatgcaagggt gtccaacaag gccctgtggg cacctatcga gaagactatt     1020
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca caggtgtacg tgtaccctcc aagccgcgac     1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgacc tgtctggtga aggggttcta tccaagtgat     1140
atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacaagac tccccccct      1200
gtgctggact cagatgggag cttcgccctg gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcgg      1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac      1320
accagaagt ccctgagcct 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

```

72

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

73

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> 58  
 <211> 1353  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 58  
 cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctgggtcaaac ctggcgcatc cgtgaaaatg 60  
 tcttgcaagg ctagtggcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120  
 ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180  
 aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240  
 atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaagcacc 300  
 tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360  
 gccgcttcca caaaggacc aagcgtgttt cacttggcac caagctcaa gtcaaccagc 420  
 ggaggaacag cagccctggg atgtctgggt aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg 480  
 tcttggaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccataact ttcccgtgtg gctgcagtct 540  
 agtggcctgt acagcctgtc aagcgtgttc accgtccctt cctctagtct ggggactcag 600  
 acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa 660  
 ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccacctgtc ctgcaccaa gagaagagga 720  
 ggaccatccg tgttctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact 780  
 cctgaagtca cctgcgtggg cgtggacgtg agccacgagg accccgaagt caaattcaac 840  
 tgggtacgtg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac 900  
 aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960  
 aaggagtata aatgcaagggt gtccaacaag gccctgtggg cacctatcga gaagactatt 1020  
 tctaagcca agggccagcc tagggaacca cagggtgtacg tgctgcctcc aagccgcgac 1080  
 gagctgacta aaaaccagggt ctccctgctg tgtctgggtga aggggttcta tccaagtgat 1140  
 atcgctgtgg agtgggaatc aatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccct 1200  
 gtgctggact cagatgggag cttctttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcgg 1260  
 tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct 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

75

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

cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtcaaac ctggcgcattc cgtgaaaatg 60

tcttgaagg ctagtggcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120

ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180

```

aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac      240
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtgt actattgcgc cagaagcacc      300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc      360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt ccaactggcac caagctccaa gtcaaccagc      420
ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg      480
tcttgaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt tccccgctgt gctgcagtct      540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag      600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa      660
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccaccttgtc ctgcaccaga ggacgaggga      720
ggaccatccg tgttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact      780
cctgaagtca cctgcgtggt cgtgagcgtg agccacaagg accccgaagt caaattcaac      840
tggtagctgg atggcgctga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac      900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaggagtata aatgcgccgt gtccaacaag gccctgcccg cacctatcga gaagactatt     1020
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca cagggtgacg tgtaccctcc aagccgcgac     1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgacc tgtctggtga aggggttcta tccaagtgat     1140
atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag ccgagaaca attacaagac tccccccct      1200
gtgctggact cagatgggag cttcgccctg gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcgg      1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac     1320
accagaaggt ccctgagcct gtcaccggc 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

```



77

Met Gln Leu Ser Ser<sub>85</sub> Leu Thr Ser Glu Asp<sub>90</sub> Ser Ala Val Tyr Tyr<sub>95</sub> Cys  
 Ala Arg Ser Thr<sub>100</sub> Tyr Tyr Gly Gly Asp<sub>105</sub> Trp Tyr Phe Asn Val<sub>110</sub> Trp Gly  
 Ala Gly Thr<sub>115</sub> Thr Val Thr Val Ser<sub>120</sub> Ala Ala Ser Thr Lys<sub>125</sub> Gly Pro Ser  
 Val Phe<sub>130</sub> Pro Leu Ala Pro Ser<sub>135</sub> Ser Lys Ser Thr Ser<sub>140</sub> Gly Gly Thr Ala  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val<sub>150</sub> Lys Asp Tyr Phe Pro<sub>155</sub> Glu Pro Val Thr Val<sub>160</sub>  
 Ser Trp Asn Ser Gly<sub>165</sub> Ala Leu Thr Ser Gly<sub>170</sub> Val His Thr Phe Pro<sub>175</sub> Ala  
 Val Leu Gln Ser<sub>180</sub> Ser Gly Leu Tyr Ser<sub>185</sub> Leu Ser Ser Val Val<sub>190</sub> Thr Val  
 Pro Ser Ser<sub>195</sub> Ser Leu Gly Thr Gln<sub>200</sub> Thr Tyr Ile Cys Asn<sub>205</sub> Val Asn His  
 Lys Pro<sub>210</sub> Ser Asn Thr Lys Val<sub>215</sub> Asp Lys Lys Val Glu<sub>220</sub> Pro Lys Ser Cys  
 Asp<sub>225</sub> Lys Thr His Thr Cys<sub>230</sub> Pro Pro Cys Pro Ala<sub>235</sub> Pro Lys Arg Arg Gly<sub>240</sub>  
 Gly Pro Ser Val Phe<sub>245</sub> Leu Phe Pro Pro Lys<sub>250</sub> Pro Lys Asp Thr Leu Met<sub>255</sub>  
 Ile Ser Arg Thr<sub>260</sub> Pro Glu Val Thr Cys<sub>265</sub> Val Val Val Ser Val<sub>270</sub> Ser His  
 Lys Asp Pro<sub>275</sub> Glu Val Lys Phe Asn<sub>280</sub> Trp Tyr Val Asp Gly<sub>285</sub> Val Glu Val  
 His Asn<sub>290</sub> Ala Lys Thr Lys Pro<sub>295</sub> Arg Glu Glu Gln Tyr<sub>300</sub> Asn Ser Thr Tyr  
 Arg Val Val Ser Val Leu<sub>310</sub> Thr Val Leu His Gln<sub>315</sub> Asp Trp Leu Asn Gly<sub>320</sub>  
 Lys Glu Tyr Lys Cys<sub>325</sub> Ala Val Ser Asn Lys<sub>330</sub> Ala Leu Pro Ala Pro<sub>335</sub> Ile  
 Glu Lys Thr Ile<sub>340</sub> Ser Lys Ala Lys Gly<sub>345</sub> Gln Pro Arg Glu Pro<sub>350</sub> Gln Val  
 Tyr Val Leu<sub>355</sub> Pro Pro Ser Arg Asp<sub>360</sub> Glu Leu Thr Lys Asn<sub>365</sub> Gln Val Ser

78

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  
cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtcaaac ctggcgcatc cgtgaaaatg 60  
tcttgcaagg ctagtggcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120  
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180  
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240  
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtggt actattgcgc cagaagcacc 300  
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360  
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt ccaactggcag caagctcaa gtcaaccagc 420  
ggaggaacag cagccctggg atgtctgggt aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg 480  
tcttggaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctgcagtct 540  
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtgggt accgtccctt cctctagtct ggggactcag 600  
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa 660  
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccacctgtc ctgcaccaa gagaagagga 720  
ggaccatccg tgttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact 780  
cctgaagtca cctgcgtggg cgtgagcgtg agccacaagg accccgaagt caaattcaac 840  
tggtacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac 900  
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960  
aaggagtata aatgcgccgt gtccaacaag gccctgccc cactatcga gaagactatt 1020  
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca cagggtgtacg tgctgcctcc aagccgcgac 1080  
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgctg tgtctgggtga aggggttcta tccaagtgat 1140

79

atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccct 1200  
 gtgctggact cagatgggag cttctttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcgg 1260  
 tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac 1320  
 acccagaagt ccctgagcct gtcacccggc aaa 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
cagggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtcaaac ctggcgcatc cgtgaaaatg      60
tcttgcaagg ctagtggtcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca      120
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat      180
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac      240
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtggt actattgcgc cagaagcacc      300
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc      360
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt ccactggcac caagctcaa gtcaaccagc      420
ggaggaacag cagccctggg atgtctgggt aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg      480
tcttggaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgtg gctgcagtct      540
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtggtc accgtccctt cctctagtct ggggactcag      600
acctatatct gcaacgtgaa tcacaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa      660
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccacctgtc ctgcaccaga ggacgagggg      720
ggaccatccg tgttcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact      780
cctgaagtca cctgcgtggt cgtgagcgtg agccacaagg accccgaagt caaattcaac      840
tggtacgtgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac      900
aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaggagtata aatgcgaggt gtccaacaag gccctgcccg cacctatcaa gaagactatt     1020
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca cagggtgtacg tgtaccctcc aagccgcgac     1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgacc tgtctgggtga aggggttcta tccaagtgat     1140
atcgtgtggt agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacaagac tccccccct      1200
gtgctggact cagatgggag cttcgcctg gtgtccaaac tgaccgtgga taagtctcgg      1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac      1320
accagaagt ccctgagcct 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 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

```

82

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

83

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  
caggtccagc tgcagcagcc cggagctgaa ctggtcaaac ctggcgcac cgtgaaaatg 60  
tcttgcaagg ctagtggcta cacattcact tcctataaca tgcactgggt gaagcagaca 120  
ccaggacgag gactggagtg gatcggagca atctaccctg gaaacggcga cacttcttat 180  
aatcagaagt ttaaaggcaa ggccaccctg acagctgata agagctcctc taccgcctac 240  
atgcagctga gttcactgac aagtgaagac tcagcagtggt actattgcgc cagaagcacc 300  
tactatggcg gggattggta cttcaacgtg tggggggcag gaaccacagt caccgtgagc 360  
gccgcttcca caaaaggacc aagcgtgttt ccaactggcac caagctcaa gtcaaccagc 420  
ggaggaacag cagccctggg atgtctggtg aaggactact tcccagagcc cgtcaccgtg 480  
tcttggaaca gtggcgccct gacaagcggg gtccatactt ttcccgtgt gctgcagtct 540  
agtggcctgt acagcctgtc aagcgtgggt accgtccctt cctctagtct ggggactcag 600  
acctatatct gcaacgtgaa tcacaaacct tctaatacaa aggtcgacaa gaaagtggaa 660  
ccaaaaagtt gtgataagac acatacttgc ccacctgtc ctgcaccaa gagaagagga 720  
ggaccatccg tggtcctgtt tccacccaaa cccaaggaca ctctgatgat tagccggact 780  
cctgaagtca cctgcgtggt cgtgagcgtg agccacaagg accccgaagt caaattcaac 840  
tggtagctgg atggcgtcga ggtgcataat gccaaaacaa agccccggga ggaacagtac 900

84

```

aactcaacat atagagtcgt gagcgtcctg actgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaggagtata aatgcgaggt gtccaacaag gccctgcccg cacctatcaa gaagactatt      1020
tctaaagcca agggccagcc tagggaacca caggtgtacg tgctgcctcc aagccgcgac      1080
gagctgacta aaaaccaggt ctccctgctg tgtctgggtga aggggttcta tccaagtgat      1140
atcgctgtgg agtgggaatc aaatggacag cccgagaaca attacctgac ttggccccct      1200
gtgctggact cagatgggag cttctttctg tattccaaac tgaccgtgga taagtctcgg      1260
tggcagcagg gaaatgtctt ttcctgttct gtgatgcacg aagcactgca caatcactac      1320
accagaagt ccctgagcct gtcacccggc aaa                                  1353

```

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic polypeptide sequence - variant trastuzumab light chain

&lt;400&gt; 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 tcccgtatc ctgtcagcaa gccctgggga gaaggtgacc 60  
atgacatgcc gagccagctc ctctgtcagc tacatccact ggttcagca gaagccaggc 120  
agttcaccta aaccatggat ctacgccaca tctaacctgg ctagtggagt gcccgccgg 180  
ttttccggct ctgggagtgg aacatcatac agcctgacta tttccagagt ggaggccgaa 240  
gacgccgcta cctactattg ccagcagtgg acctctaata cccctacatt cggcggggga 300  
actaagctgg agatcaaaag gactgtggca gcccttctg tcttcatttt tccaccagct 360  
gacgaacagc tgaatcagg aaccgcttcc gtggtctgtc tgcgaacaa cttctacccc 420  
cgcgaggcaa aggtgcagtg gaaagtcgat aacgccctgc agtccggcaa ttctcaggag 480  
agtgtagaccg aacaggactc aaaggatagc acatattccc tgagctccac tctgaccctg 540  
tccaaagctg attacgaaaa gcataaagtg tatgcattgt aggtcaccca ccaggggctg 600  
agtagtcccg 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

87

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

88

<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

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic 'core' hinge IgG polypeptide sequence for IgG3

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic 'upper' hinge IgG polypeptide sequence for IgG4

&lt;400&gt; 80

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
 1 5

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

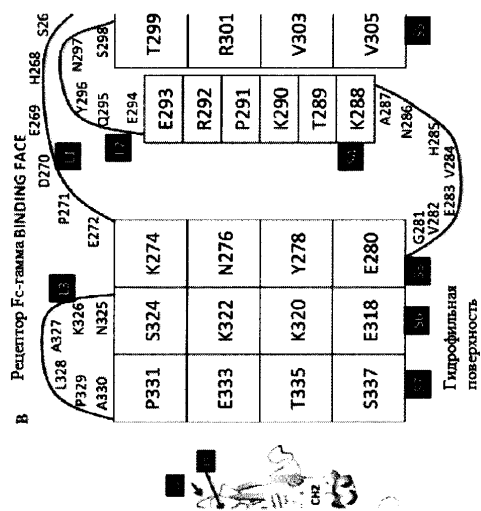
&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic 'core' hinge IgG polypeptide sequence for IgG4

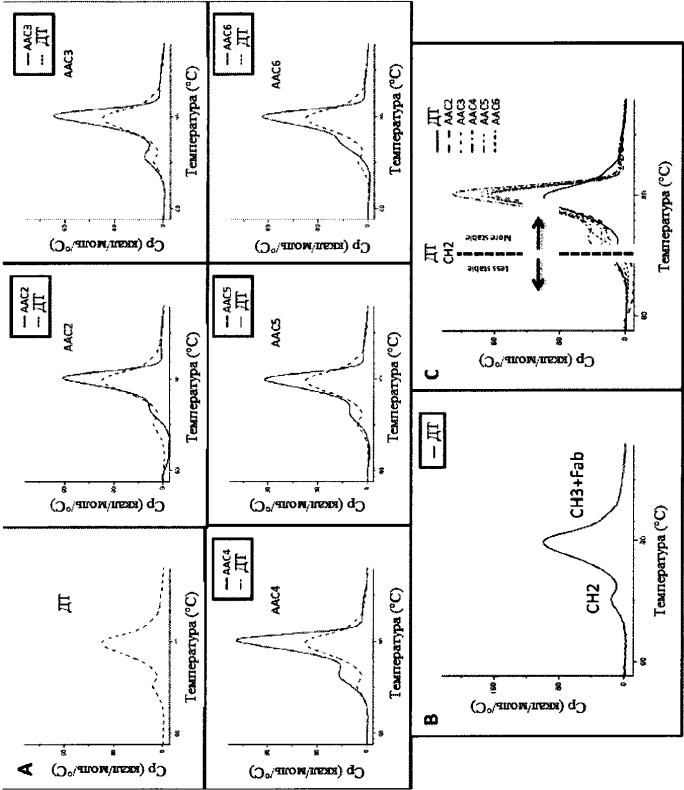
&lt;400&gt; 81

Cys Pro Ser Cys Pro  
 1 5

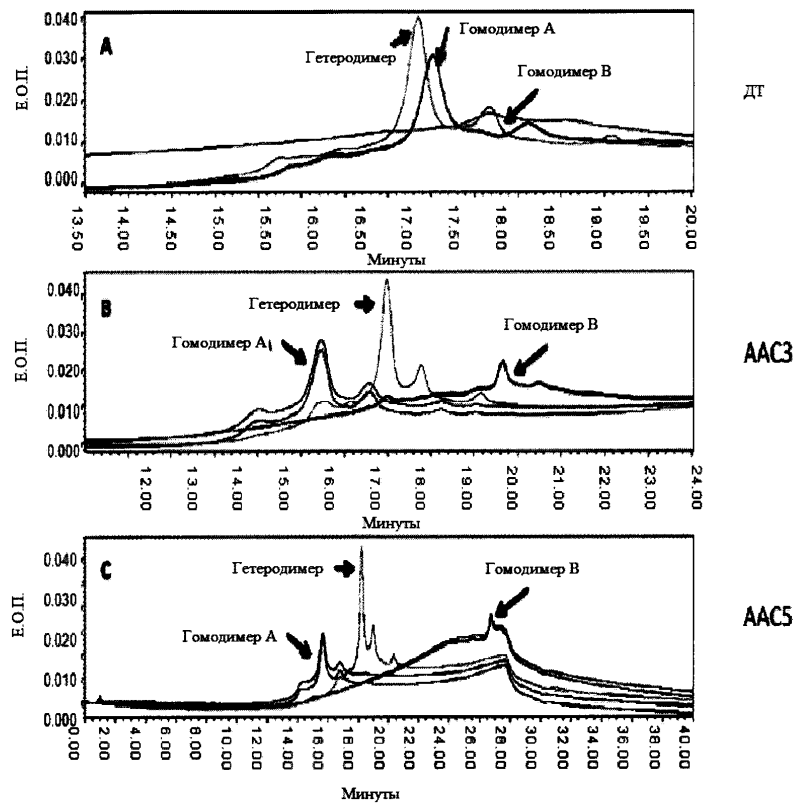
Фиг. 1А



Фиг. 2

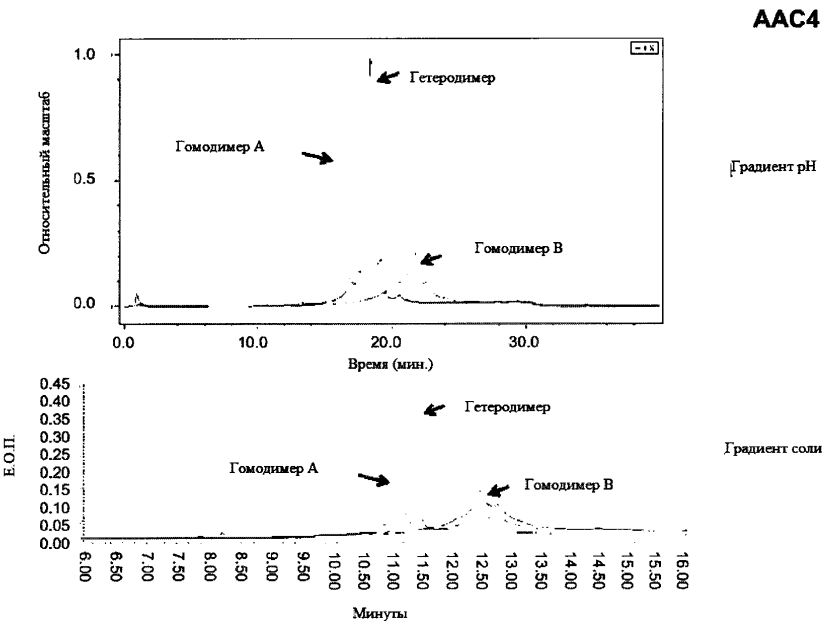


Фиг. 3А

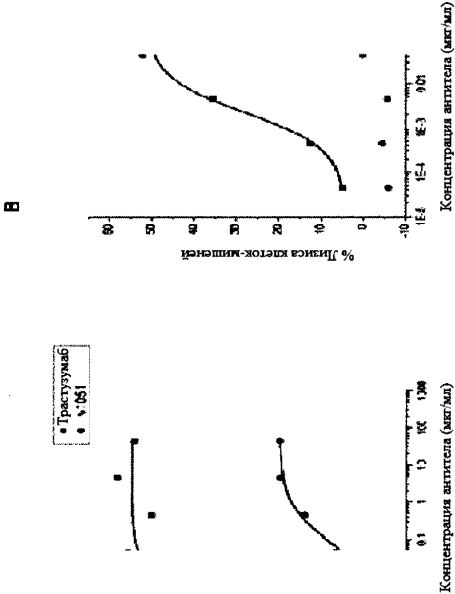




Фиг. 3В



Фиг. 4



**Фиг. 5****SEQ ID NO:1:**

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF  
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO:2:**

>Трастузумаб, тяжелая цепь

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTR  
 YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS  
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO:3:**

>Трастузумаб, легкая цепь

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSVGP  
 SRFSGSRSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQGHYTTPTTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPP  
 SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL  
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO:4:**

>Ритуксимаб, тяжелая цепь

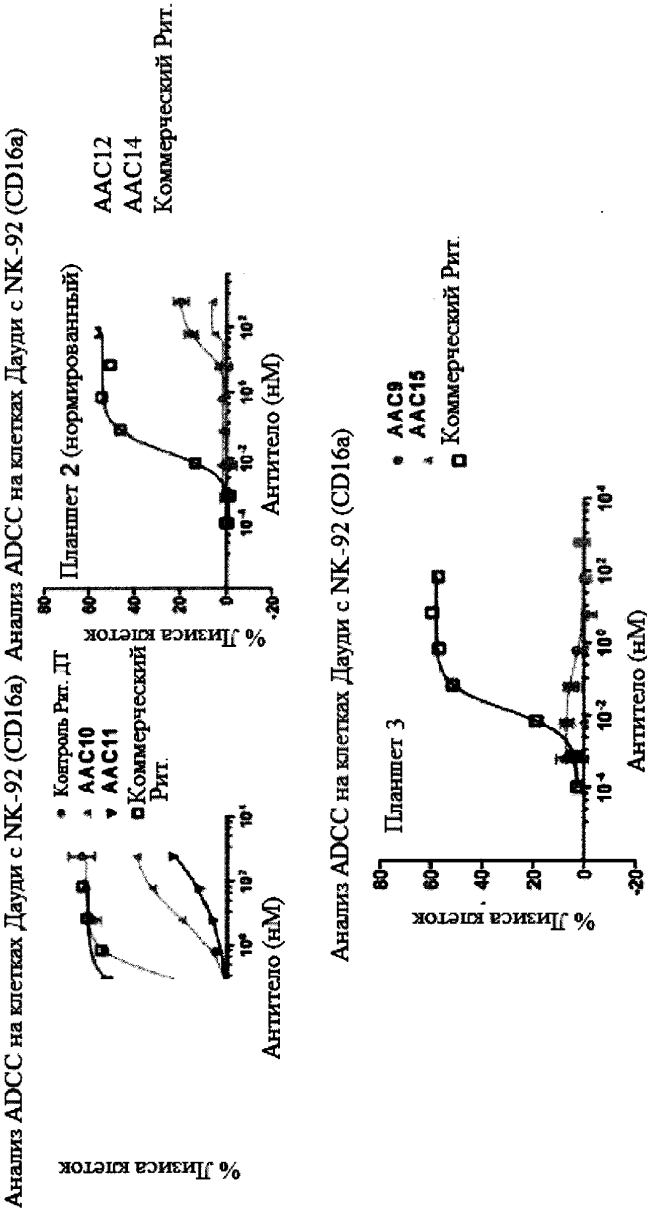
QVQLQQGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGD  
 TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGT  
 TVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
 PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ  
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL  
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO:5:**

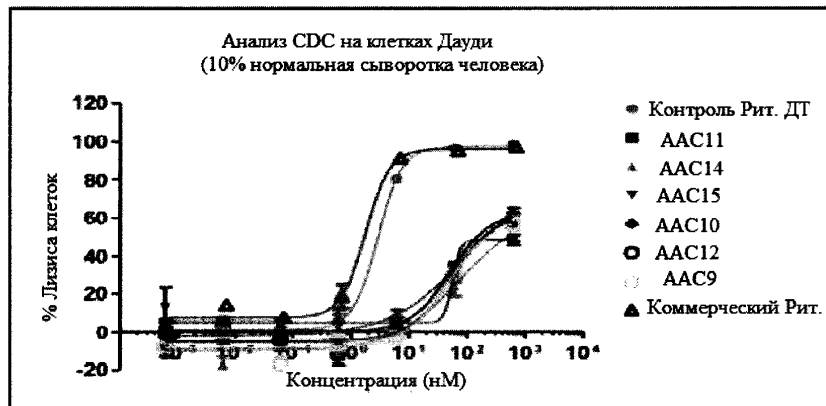
>Ритуксимаб, легкая цепь

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPR  
 FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS  
 DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL  
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

SEQ ID NO:	Тип	
6	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLEDEGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

14	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPAKAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDEGGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS PGK
16	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCAPELLGGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHQNPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDEGGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS PGK
18	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCAPELLGGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDEGGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK
20	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCAPELLGGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWP PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS PGK
22	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCAPEKKGGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP

		QVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK
24	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPARRGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
26	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPKRRGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
28	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPKAGGSPVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
30	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHKRPVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTW PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK
32	полипептид	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ



		TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAELKGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKCLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
37	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
39	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
41	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRRGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

43	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY YKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
45	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRRGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
47	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHKDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY YKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
49	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRRGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHKDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
51	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKG

		QPREPQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRRGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
55	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALWAPIEKTISKAKGQPREPQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPKRRGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALWAPIEKTISKAKGQPREPQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEDEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHKDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL

		LGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPKRRGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVSVSVDKDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNY LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
63	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEDEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVSVSVDKDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCEVSNKALPAPIKKTISKAKG QPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
65	полипептид	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPKRRGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVSVSVDKDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCEVSNKALPAPIKKTISKAKG QPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNY LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
67	полипептид	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHYHTPTPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
68	полипептид	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVSIIHWFQKPGSSPKPWYIATS NLASGVPPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
7	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCAAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC

		CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGACTCCCTGTCTCTGTGGTGA CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGCC GCCGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTTCCAGGACTCCCAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAA GACCACACCTCCAGTGCTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTT AGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG AGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
9	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGACTCCCTGTCTCTGTGGTGA CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGCC GCCGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTTCCAGGACTCCCAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAAGATACAT GACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTCCTGTATTTC CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTA GTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA

		GCCTGTCCTGTCTCCCGCAA
11	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGAC GAGGGAGGACCTAGCGTGTCTCTGTTTCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCAGGAGGACCCGAAGTGAAGTTCACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCTGAGCGTGTGACCGTGTGACACAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAA GACCACACCTCCAGTGTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAGCTGACAGTGGATAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTT AGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG AGCCTGTCCCTGTCTCCCGCAA
13	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC

		<p>CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGCCGAC  GAGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGT  GTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAAATTACAA  GACCACACCTCCAGTGCTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT  CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTT  AGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG  AGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>
15	ДНК	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT  ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAACCTAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC  CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGCCAAAG  GCCGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGT  GTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAAATTACAA  GACCACACCTCCAGTGCTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT  CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTT  AGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG  AGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>

17	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACATTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGA CAGTGCCAAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGTCCAGAACTG CTGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTTCCCTTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACCAGAACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAAGTAAATAGGCCCTGCC TGCTCAATCGAAAAACCATCTTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAAGG AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGCAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAA GACCACACCTCCAGTGCTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTT AGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG AGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
19	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACATTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGA CAGTGCCAAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGTCCAGAACTG CTGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTTCCCTTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCAGGAGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG



		TGGAAGTGATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAA GACCACACCTCCAGTGCTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTT AGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAG AGCCTGTCCCTGTCTCCGGCAAA
21	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCAAAAAACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCTGGTGACAGTGAGCTCCCGCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGAACTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGTG CTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT GACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTTC CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTA GTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA GCCTGTCCCTGTCTCCGGCAAA
23	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCAAAAAACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG

		GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTCCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAAGTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC CTGCTGTGCTGACAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGA CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGTCCAGAAAAAG AAGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCGAAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT GACCTGGCCCTCCAGTGTGGACAGCGATGGCAGCTTCTCTGTATTC CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTA GTTGTTCAAGTATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA GCCTGTCCTGTCTCCGGCAAA
25	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCAGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTCCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAAGTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC CTGCTGTGCTGACAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGA CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGTCCAGCCAGA AGAGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCGAAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT

		GACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTC CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTA GTTGTTCACTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAA
27	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCACTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACATTTTC CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAAAGAGA AGAGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACT CTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCTCAGGAGGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTCTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGAT ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT GACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTC CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTA GTTGTTCACTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAA
29	ДНК	GAGGTGCAGCTGGTGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACTG CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT ATTGCACTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG GGACAGGGGACCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCTCTACCAAGGGCCC CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC CGTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACATTTTC

		<p>CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTA C TCCCTGTCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAAAGGCC  AAGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTTCCCTTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGCTGTGCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT  GACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTTC  CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTA  GTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA  GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>
31	ДНК	<p>GAGGTGCAGCTGGTGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCGATACATCCAAAACACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTA  ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCTCTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC  CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTA C TCCCTGTCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTG  CTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTTCCCTTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTTCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCACAAGAGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGCTGTGCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT  GACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATTTC  CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTA  GTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA  GCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA</p>

33	ДНК	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGA  GGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCAACATCAAGGAC  ACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGGAGTG  GGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTC  CGTGAAGGGGAGGTTTACTATTAGCGCCGATACATCAAAAAACTG  CTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACT  ATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGG  GGACAGGGGACCCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCC  CAGTGTGTTTCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGAC  AGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCGAGCCTGTGAC  CGTGAGTTGGAACCTAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGACACTTTTC  CTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTGA  CAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGA  ATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAG  AGCTGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAAGTG  AAGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTTCCCTTAAGCCAAAAGACACT  CTGATGATTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT  GTCTCACGAGGACCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAAC  TCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAAGGACTGG  CTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGAAGCTGCC  TGCTCCAATCGAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGG  AGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAG  AACCAGGTGTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGAT  ATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACAT  GACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTCCTGTATTTC  CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTA  GTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGA  GCCTGTCCCTGTCTCCGGCAAA</p>
34	ДНК	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  GACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGC  TGAGCTTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGAT  CTATTCTGCATCCTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGC  AGTCGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCATTACACTACCCACCCA  CTTTGCGCCAAGGGACCAAAAGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCA  CCATCTGTCTTCATCTTCCGCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA  CTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCA  AAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAA  GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA  GCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC  TACGCTGCGAAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>
36	ДНК	<p>CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC  ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCATTCTCTAT  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAAGGACGAGGACTGGAGTGGAA  TCGGAGCAATCTACCTGGAAACGGCGACACTTCTATAATCAGAAGT</p>

		<p>TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT  ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT  GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG  GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC  AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC  ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT  CCCGCTGTGCTGAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG  AATCACAAACCTTCTAATACAAAGTTCGACAAGAAAGTGGAACAAA  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAGACT  GCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCAAAACCAAGGACAC  TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGGACGT  GAGCCACGAGGACCCGGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC  TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAAGACTG  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG  GAACCACAGGTGTACGTGTACCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA  AAACCAGGTCTCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTCTATCCAAGTGA  TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACA  AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTGT  CCAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT  TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACCCAGAAG  TCCCTGAGCCTGTACCCGGCAAA</p>
38	ДНК	<p>CAGGTCAGCTGCAGCAGCCCGAGCTGAAGTGGTCAAACCTGGCGC  ATCCGTGAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTCTAT  AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGA  TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT  TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT  ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT  GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG  GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC  AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA  CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC  ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT  CCCGCTGTGCTGAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC  ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG  AATCACAAACCTTCTAATACAAAGTTCGACAAGAAAGTGGAACAAA  AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAGACTG  GCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCAAAACCAAGGACAC  TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGGACGT  GAGCCACGAGGACCCGGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG  TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC  TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAAGACTG  GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC  CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG</p>

		GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAAATTACC TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATT CAAACGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCAACCCGGCAA
40	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTCCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGGA TCGGAGCAATCTACCTGGAAACGGCGACACTTCTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCAAGTCAACGTGAGCGCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTTCACTGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCTGACAAGCGGGGTCCATACCTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTCCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGAACCAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAGAGGA CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCAAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTACCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAAATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTGT CCAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCTGAGCCTGTCAACCCGGCAA
42	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTCCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGGA TCGGAGCAATCTACCTGGAAACGGCGACACTTCTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCAAGTCAACGTGAGCGCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTTCACTGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCTGACAAGCGGGGTCCATACCTTT

		CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGAACCAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTGGTGGCGT GAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACC TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATTC CAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCAACCCGGCAAA
44	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGGA TCGGAGCAATCTACCCTGAAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCCACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGAACCAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAGAGGA CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTGGTGGCGT GAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTACCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTGT CCAAAGTACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGTCAACCCGGCAAA



46	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCATTCTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGGA TCGGAGCAATCTACCCTGGAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCACAAAAGGACC AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGAAGTCAAGTCACTGCGTGGTGGTGGAGCGT GAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCTCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCAGAGAACAATTACC TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATTC CAAAGTACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCAACCCGGCAAA
48	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCATTCTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGGA TCGGAGCAATCTACCCTGGAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCACAAAAGGACC AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAGAGGA CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCACCCAAACCCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGAAGTCAAGTCACTGCGTGGTGGTGGAGCGT GAGCCACAAGGACCCGAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG

		TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGCCAACAAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTACCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCAGAACAAATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTGT CCAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCTGAGCCTGTCACCCGGCAAA
50	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAAGTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGCTTGAAGGCTAGTGGCTACACATTCATTCCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGGA TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCAGTACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACACAGTCACCGTGAGCGCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTTCACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATCTTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAACCTTCTAATACAAAGGTGCAAGAAGTGGAAACCAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCACCTTGTCTGCACCAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACAAGGACCCCAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGCCAACAAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTGCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCAGAACAAATTACC TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATT CAAACGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCACCCGGCAAA
52	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAAGTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGCTTGAAGGCTAGTGGCTACACATTCATTCCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGGA TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCAGTACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG

		GGGGCAGGAACCAAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAACCAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAGAGGA CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGGACGT GAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGCCGTGTCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTACCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAAATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTG CCAAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTT TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCTGAGCCTGTACCCGGCAAA
54	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCATTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGA TCGGAGCAATCTACCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCT ACATGCAGCTGAGTTCAGTACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCAAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACCAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGGACGT GAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGCCGTGTCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAAATTACC

		TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATTC CAAACCTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCAACCGGCAAA
56	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTCCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGA TCGGAGCAATCTACCCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAAGTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGGAAAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAACCTTCTAATACAAAGGTGCACAAGAAAGTGAACCAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAGAGGA CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAACCCAGGACAC TCTGATGATTAGCCGACTCCTGAAGTCACTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGT GGGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTACCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTGT CCAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGTCAACCGGCAAA
58	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACCTCCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGA TCGGAGCAATCTACCCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTTCCACTGGCACCAAGTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGGAAAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT

		CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGAGCGT GAGCCACGAGGACCCGAAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGT GGGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCTCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAAATTACC TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATTC CAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT CCTGTTCTGTGATGCAGAAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTCAACCGGCAAA
60	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCACTTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGGA TCGGAGCAATCTACCCTGGAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAGGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCT ACATGCAGCTGAGTTCAGTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCAAGTCAACGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTTCACTGGCACCAAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTCGACAAGAAAGTGGAAACAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAGGGA CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGACTCCTGAAGTCACCTGCGTGGTCTGAGCGT GAGCCACAAGGACCCGAAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGCCGTGTCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTACCCTCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAAATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCCGCTTGGTGT CCAAAGTACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCTGTTCTGTGATGCAGAAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCTGAGCCTGTCAACCGGCAAA

62	ДНК	CAGGTCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCATTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGA TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCCTACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGT ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTGACAAGAAAGTGGAACCAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCAAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGAAGTCAAGTCACTGCGTGGTGGTGGAGCGT GAGCCACAAGGACCCCGAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCTGACTGTGCTGCACAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGCCGTGTCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCGAGAAGACTATTTCTAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGCTGCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCGAGAACAATTACC TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGAAGTCAAGTGGGAGCTTCTTCTGTATTC CAAAGTGAACGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACCCAGAAAGT CCCTGAGCCTGTCAACCGGCAAA
64	ДНК	CAGGTCAGCTGCAGCAGCCCGGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGCAAGGCTAGTGGCTACACATTCATTCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGA TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCCTACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGGAACAGTGGCGCCCTGACAAGCGGGGTCCATACTTTT CCCGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGT ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAAACCTTCTAATACAAAGGTGACAAGAAAGTGGAACCAAA AAGTTGTGATAAGACACATACTTGCCACCTTGTCTGCACAGAGGA CGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCAAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGAAGTCAAGTCACTGCGTGGTGGTGGAGCGT GAGCCACAAGGACCCCGAAGTCAAATCAACTGGTACGTGGATGGCG

		TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGAGGTGCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCAAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTACCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCAGAGAACAATTACA AGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCGCCCTGGTGT CCAACTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTT TCCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGTACCCGGCAAA
66	ДНК	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCCCGAGCTGAACTGGTCAAACCTGGCGC ATCCGTGAAAATGTCTTGAAGGCTAGTGGCTACACATTCATTCCTAT AACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGGA TCGGAGCAATCTACCCTGGAAACGGCGACACTTCTATAATCAGAAGT TTAAAGGCAAGGCCACCCTGACAGCTGATAAGAGCTCCTCTACCGCT ACATGCAGCTGAGTTCACTGACAAGTGAAGACTCAGCAGTGTACTATT GCGCCAGAAGCACCTACTATGGCGGGGATTGGTACTTCAACGTGTGG GGGGCAGGAACCACAGTCACCGTGAGCGCCGCTTCACAAAAGGACC AAGCGTGTTCCTACTGGCACCAGCTCCAAGTCAACCAGCGGAGGAA CAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCAGAGCCCGTC ACCGTGTCTTGAACAGTGCGCCCTGACAAGCGGGTCCATACTTTT CCCGCTGTGCTGCACTAGTGGCCTGTACAGCCTGTCAAGCGTGGTC ACCGTCCCTTCTCTAGTCTGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTG AATCACAACCTTCTAATACAAAGGTGACAAGAAAGTGGAACCAAA AAGTTGTGATAAGACATACTTGCCACCTTGTCTGCACCAAGAG AAGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCCACCAAAACCAAGGACAC TCTGATGATTAGCCGGAAGTCTGAAAGTCACTGCGTGGTGGTGGCGT GAGCCACAAGGACCCGAAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCG TCGAGGTGCATAATGCCAAAACAAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAAC TCAACATATAGAGTCGTGAGCGTCCTGACTGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTATAAATGCGAGGTGCCAACAAGGCCCTGC CCGCACCTATCAAGAAGACTATTTCTAAAGCCAAGGGCCAGCCTAGG GAACCACAGGTGTACGTGTGCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACTAA AAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGGTTCTATCCAAGTGA TATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCCAGAGAACAATTACC TGACTTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGGAGCTTCTTTCTGTATT CAAACCTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTT CCTGTTCTGTGATGCACGAAGCACTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGTACCCGGCAAA
69	ДНК	CAGATTGTCCTGTCTCAGAGTCCCGCTATCCTGTCAGCAAGCCCTGGG GAGAAGGTGACCATGACATGCCGAGCCAGCTCCTCTGTCAGCTACATC CACTGTTCCAGCAGAAGCCAGGCAGTTCACCTAAACCATGGATCTAC GCCACATCTAACCTGGCTAGTGGAGTGCCCGTCCGGTTTTCCGGCTCT GGGAGTGGAACATCATACAGCCTGACTATTTCCAGAGTGGAGGCCGA AGACGCCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTGGACCTCTAATCCCTTAC ATTGCGCGGGGAACTAAGCTGGAGATCAAAGGACTGTGGCAGCC

		CCTTCTGTCTTCATTTTCCACCCAGTGACGAACAGCTGAAATCAGGAA CCGCTTCCGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCAA AGGTGCAGTGGAAGTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAATTCTCAG GAGAGTGTGACCGAACAGGACTCAAAGGATAGCACATATTCCTGAG CTCCACTCTGACCCTGTCCAAAGCTGATTACGAAAAGCATAAAGTGTA TGCATGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGTAGTCCCGTCACAAAGA GTTTCAATAGAGGAGAGTGT
--	--	---