



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/18 (2019.05); C07K 2317/524 (2018.08); C07K 2317/526 (2018.08); C07K 2317/72 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2014131097, 25.07.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.12.2008

Дата регистрации:
23.09.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

26.12.2007 US 61/016,793;

25.02.2008 US 61/031,353;

18.04.2008 US 61/046,353;

02.05.2008 US 61/050,172;

10.07.2008 US 61/079,779;

22.09.2008 US 61/099,178

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:

2010130851 26.12.2007

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2016 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 23.09.2019 Бюл. № 27

Адрес для переписки:

109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

ЧЕМБЕРЛЕН Аарон (US),

ДАХЪЯТ Бассил (US),

ДЕЗЬЯРЛЕЙС Джон Рудолф (US),

КАРКИ Шер Бахадур (US),

ЛАЗАР Грегори Алан (US)

(73) Патентообладатель(и):

КСЕНКОР, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2006053301 A2, 18.05.2006. RU
2224764 C2, 27.02.2004. DALL' ACQUA et al.,
"Increasing the affinity of a human IgG1 for the
neonatal Fc receptor: biological consequences",
The Journal of immunology, 2002, 169, pp.5171-
5180; М.СИНГЕР, П.БЕРГ "Гены и Геномы",
пер. с англ., Москва "Мир", 1998 г., том 1,
стр.63-64.

(54) ВАРИАНТЫ Fc С ИЗМЕНЕННЫМ СВЯЗЫВАНИЕМ С FcRn

(57) Реферат:

Изобретение относится к иммунологии и биотехнологии. Предложено рекомбинантное антитело против C5, содержащее вариант Fc нативного полипептида Fc IgG1 дикого типа, где указанный вариант включает 428L/434S/259I, а нумерация приведена согласно индексу EU. Описаны: кодирующая нуклеиновая кислота, вектор экспрессии и клетка-хозяин для экспрессии антитела на основе указанного вектора. Также

описан способ получения антитела путем культивирования указанной клетки. Использование изобретения обеспечивает повышенное связывание с FcRn мыши или человека, по сравнению с нативным полипептидом Fc IgG1, что может найти применение в медицине. 5 н. и 1 з.п. ф-лы, 23 ил., 7 пр.

Вариант	IgG	Fv	n	Кратность Среднее	$\frac{I_{FcRn}}{I_{SO}}$
Y319W	IgG1	Anti-VEGF	1	1.51	
E380A	IgG1	Anti-VEGF		ND	
E380Q	IgG1	Anti-VEGF	1	2.01	
E380R	IgG1	Anti-VEGF	1	3.41	
E380S	IgG1	Anti-VEGF	1	2.55	
E380V	IgG1	Anti-VEGF		ND	
M428L	IgG1	Anti-VEGF	3	3.00	0.37
N434A	IgG1	Anti-VEGF	4	2.15	0.54
N434S	IgG1	Anti-VEGF	6	3.77	0.79
N434M	IgG1	Anti-VEGF	3	4.83	1.23
N434T	IgG1	Anti-VEGF	1	3.32	
N434V	IgG1	Anti-VEGF		ND	
N434Y	IgG1	Anti-VEGF		ND	
P245G/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	2.89	
T250I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	6.75	0.10
T250Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	3	6.30	0.82
M252Y/V259I	IgG1	Anti-VEGF	1	3.56	
M252Q/V259I	IgG1	Anti-VEGF	1	0.14	
M252Q/T307Q	IgG1	Anti-VEGF	1	0.43	
M252Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	1.04	
M252Y/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	9.63	0.32
M252Q/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	0.21	
M252Y/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	2.37	
M252Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	0.35	
M252Y/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	5.32	
M252Y/N434A	IgG1	Anti-VEGF	1	11.94	
M252Y/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	11.46	2.73
M252Q/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	0.20	
M252Q/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	0.48	
M252Y/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	2.79	
M252Y/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	61.60	
S254T/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	3.56	
T256V/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	5.04	1.94
T256E/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	35.53	
V259I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	12	9.79	2.72
V259A/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	4.81	
V259L/V308F	IgG1	Anti-VEGF		ND	

(продолжение)

Фиг. 9



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)*C12N 15/13* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12P 21/08* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/18 (2019.05); *C07K 2317/524* (2018.08); *C07K 2317/526* (2018.08); *C07K 2317/72* (2018.08)(21)(22) Application: **2014131097, 25.07.2014**(24) Effective date for property rights:
22.12.2008Registration date:
23.09.2019

Priority:

(30) Convention priority:

26.12.2007 US 61/016,793;**25.02.2008 US 61/031,353;****18.04.2008 US 61/046,353;****02.05.2008 US 61/050,172;****10.07.2008 US 61/079,779;****22.09.2008 US 61/099,178**Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:**2010130851 26.12.2007**(43) Application published: **20.02.2016 Bull. № 5**(45) Date of publication: **23.09.2019 Bull. № 27**

Mail address:

109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):

CHEMBERLEN Aaron (US),**DAKHYAT Bassil (US),****DEZYARLEJS Dzhon Rudolf (US),****KARKI Sher Bakhadur (US),****LAZAR Gregori Alan (US)**

(73) Proprietor(s):

KSENNOR, INK. (US)(54) **VARIANTS OF Fc WITH CHANGED BINDING WITH FcRn**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to immunology and biotechnology. Disclosed is a recombinant C5 antibody comprising a variant Fc of a native wild type Fc IgG1 polypeptide, wherein said version includes 428L/434S/259I, and numbering is given according to EU index. Described are a coding nucleic acid, an expression vector and a host cell for antibody expression

based on said vector. Also described is a method for producing the antibody by culturing said cell.

EFFECT: use of the invention provides higher binding of mouse or human to FcRn, as compared to native Fc IgG1 polypeptide, which can find application in medicine.

6 cl, 23 dwg, 7 ex

Вариант	IgG	Fv	n	Кратность Среднее	$\frac{I_{FcRn}}{I_{SO}}$
Y319W	IgG1	Anti-VEGF	1	1.51	
E380A	IgG1	Anti-VEGF		ND	
E380Q	IgG1	Anti-VEGF	1	2.01	
E380R	IgG1	Anti-VEGF	1	3.41	
E380S	IgG1	Anti-VEGF	1	2.55	
E380V	IgG1	Anti-VEGF		ND	
M428L	IgG1	Anti-VEGF	3	3.00	0.37
N434A	IgG1	Anti-VEGF	4	2.15	0.54
N434S	IgG1	Anti-VEGF	6	3.77	0.79
N434M	IgG1	Anti-VEGF	3	4.83	1.23
N434T	IgG1	Anti-VEGF	1	3.32	
N434V	IgG1	Anti-VEGF		ND	
N434Y	IgG1	Anti-VEGF		ND	
P245G/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	2.89	
T250I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	6.75	0.10
T250Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	3	6.30	0.82
M252Y/V259I	IgG1	Anti-VEGF	1	3.56	
M252Q/V259I	IgG1	Anti-VEGF	1	0.14	
M252Q/T307Q	IgG1	Anti-VEGF	1	0.43	
M252Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	1.04	
M252Y/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	9.63	0.32
M252Q/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	0.21	
M252Y/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	2.37	
M252Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	0.35	
M252Y/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	5.32	
M252Y/N434A	IgG1	Anti-VEGF	1	11.94	
M252Y/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	11.46	2.73
M252Q/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	0.20	
M252Q/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	0.48	
M252Y/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	2.79	
M252Y/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	61.60	
S254T/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	3.56	
T256V/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	5.04	1.94
T256E/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	35.53	
V259I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	12	9.79	2.72
V259A/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	4.81	
V259L/V308F	IgG1	Anti-VEGF		ND	

(продолжение)

Фиг. 9

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании 35 U.S.C. §119(e) в отношении USSN 61/016793, поданной 26 декабря, 2007; USSN 61/031353, поданной 25 февраля, 2008; USSN 61/046353, поданной 18 апреля, 2008; USSN 61/050172, поданной 2 мая, 2008; USSN 61/079779, поданной 10 июля, 2008; и USSN 61/099178, поданной 22 сентября, 2008; и представляет собой частичное продолжение USSN 11/932151, поданной 31 октября, 2007, которая представляет собой частичное продолжение USSN 11/436266, поданной 17 мая, 2006, которая испрашивала приоритет на основании 35 U.S.C. §119 (e) в отношении USSN 60/951536, поданной 24 июля, 2007, и представляет собой частичное продолжение USSN 11/274065, поданной 14 ноября, 2005, которая испрашивала приоритет на основании 35 U.S.C. §119(e) в отношении USSN 60/627763, поданной 12 ноября, 2004; USSN 60/642886, поданной 11 января, 2005; USSN 60/649508, поданной 2 февраля, 2005; USSN 60/662468, поданной 15 марта, 2005; USSN 60/669311, поданной 6 апреля, 2005; USSN 60/681607, поданной 16 мая, 2005; USSN 60/690200, поданной 13 июня, 2005; USSN 60/696609, поданной 5 июля, 2005; USSN 60/703018, поданной 27 июля, 2005; и USSN 60/726453, поданной 12 октября, 2005, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

Область техники

Настоящая заявка относится к оптимизированным вариантам иммуноглобулина IgG, способам их получения и их применению, в частности в терапевтических целях.

Уровень техники

Антитела представляют собой иммунологические белки, каждый из которых связывается с конкретным антигеном. У большинства млекопитающих, включая людей и мышей, антитела образуются из парных тяжелых и легких полипептидных цепей. Каждая цепь состоит из индивидуальных доменов иммуноглобулина (Ig) и поэтому для таких белков используют общий термин «иммуноглобулин». Каждая цепь состоит из двух отдельных областей, называемых «вариабельными» и «константными» областями. Вариабельные области легкой и тяжелой цепи демонстрируют существенное различие последовательностей для антител и являются ответственными за связывание с антигеном-мишенью. Константные области демонстрируют меньшее различие последовательностей и являются ответственными за связывание с рядом природных белков для стимулирования важных биохимических реакций. У человека существует пять различных классов антител, включая IgA (который включает подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgG (который включает подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM. Отличительным признаком данных классов антител являются их константные области, несмотря на то, что тонкие различия могут существовать в V-области. Антитела IgG представляют собой тетрамерные белки, состоящие из двух тяжелых цепей и двух легких цепей. Тяжелая цепь IgG состоит из четырех доменов иммуноглобулина, связанных от N- к C-терминалу в порядке VH-CH1-CH2-CH3 относительно вариабельного домена тяжелой цепи, константный домен 1 тяжелой цепи, константный домен 2 тяжелой цепи и константный домен 3 тяжелой цепи соответственно (также обозначаемая VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3 относительно вариабельного домена тяжелой цепи, константный домен гамма 1, константный домен гамма 2 и константный домен гамма 3 соответственно). Легкая цепь IgG состоит из двух доменов иммуноглобулина, связанных от N- к C-терминалу в порядке VL-CL относительно вариабельного домена легкой цепи и константного домена легкой цепи соответственно.

В IgG участок Fc между доменами C γ 2 и C γ 3 опосредует взаимодействие с неонатальным рецептором FcRn. Связывание с FcRn. возвращает подвергнувшееся эндоцитозу антитело из эндосомы обратно в кровоток (Raghavan et al., 1996, Annu Rev

Cell Dev Biol 12: 181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18: 739-766, оба полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки). Данный процесс, сопряженный с нарушением фильтрации почек вследствие большого объема полноразмерной молекулы, приводит к подходящему времени полужизни антител в сыворотке в диапазоне от одной до трех недель. Связывание Fc с FcRn также играет ключевую роль в переносе антитела. Центр (сайт) связывания в области Fc для FcRn также представляет собой участок, на котором связываются бактериальные белки А и G. Прочное связывание данными белками, как правило, используют в качестве способа очистки антител путем применения аффинной хроматографии с белком А или белком G в ходе очистки белка. Таким образом, специфичность данного участка Fc имеет важное значение как для клинических свойств антител, так и для их очистки. Имеющиеся структуры комплекса Fc/FcRn крысы (см. публикации Burmeister et al., 1994, Nature, 372: 379-383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7: 867-877, обе полностью включены в настоящее описание посредством ссылки) и комплексов Fc с белками А и G (Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20: 2361-2370; Sauer-Eriksson et al., 1995, Structure 3: 265-278; Tashiro et al., 1995, Curr Opin Struct Biol 5: 471-481, все полностью включены в настоящее описание посредством ссылки), дают представление о взаимодействии Fc с указанными белками. Рецептор FcRn также ответственен за перенос IgG в кишечник новорожденных и в полость эпителия кишечника у взрослых (Ghetie and Ward, Annu. Rev. Immunol, 2000, 18: 739-766; Yoshida et al., Immunity, 2004, 20(6): 769-783, оба полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки).

Исследования доменов Fc крысы и человека продемонстрировали важное значение некоторых остатков Fc для связывания FcRn. Последовательности крысы и человека обладают примерно 64% идентичности последовательностей в областях Fc (остатки 237-443 согласно нумерации индекса EU). См. фиг. 3, 4 и 5 на предмет выравниваний Fc крысы/человек, тяжелая цепь FcRn и легкая цепь FcRn (бета-2-микроглобулин). Была создана модель комплекса Fc/FcRn человека исходя из имеющейся структуры комплекса Fc/FcRn крысы (Martin et al., 2001, Mol Cell 7: 867-877, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Последовательности крысы и человека содержат некоторые общие остатки, имеющие ключевое значение для связывания FcRn, например H310 и H435 (Medesan et al., 1997 J. Immunol. 158(5): 221-7; Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276(9): 6591-6604, оба полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки). Однако во многих положениях белки человека и крысы содержат разные аминокислоты, обеспечивающие указанным остаткам в последовательности человека различное окружение и возможно отличную идентичность, чем в последовательности крысы. Указанная вариабельность ограничивает способность передавать особенности одного гомолога другому гомологу.

В Fc мышей случайная мутация и выбор фагового отображения на участках T252, T254 и T256 приводит к тройному мутанту T252L/T254S/T256F, обладающему 3.5-кратным повышением аффинности к FcRn и 1.5-кратным увеличением времени полужизни в сыворотке (Ghetie et al., 1997, Nat. Biotech. 15(7): 637-640, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Нарушение взаимодействия Fc/FcRn посредством мутаций в положениях 253, 310 и 435 также приводит к уменьшению времени полужизни *in vivo* (Medesan et al J. Immunol. 1997 158(5): 2211-7, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки).

Были проведены исследования мутаций в Fc γ человека в некоторых остатках, имеющих важное значение для связывания с FcRn, и данные исследования продемонстрировали увеличенное время полужизни в сыворотке. В Fc γ 1 человека Hinton

et al. индивидуально подвергли мутации три остатка в другие 19 обычных аминокислот. Hinton et al. обнаружили, что некоторые мутанты, двойной мутант, повышали аффинность к связыванию FcRn (Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216. Hinton et al. Journal of Immunology 2006, 176:346-356, оба полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки). Две мутации обладали увеличенным временем полужизни у обезьян. Shields et al. подвергли мутации остатки практически исключительно в Ala и исследовали их связывание с FcRn и FcγR's (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem., 276(9): 6591-6604, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки).

Dall'Acqua et al. использовали фаговое отображение для выбора мутаций Fc, которые связывали FcRn с повышенной аффинностью. (Dall'Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169: 5171-5180, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Выбранные последовательности ДНК преимущественно представляли собой двойные и тройные мутанты. Dall'Acqua et al. экспрессировали белки, кодируемые многими выбранными последовательностями, и были обнаружены некоторые из них, которые связывались с FcRn более прочно, чем в случае Fc дикого типа.

Для введения антител и гибридных белков Fc в качестве лекарственных средств необходимы инъекции с заданной частотой относительно клиренса и параметров времени полужизни белка. Более продолжительное время полужизни *in vivo* позволяет реже осуществлять инъекции или уменьшать дозу, что очевидно является благоприятным. Несмотря на то, что проведенные мутации в домене Fc привели к получению некоторых белков, обладающих повышенной аффинностью к связыванию FcRn и увеличенным временем полужизни *in vivo*, данные мутации не определили оптимальные мутации и увеличенное время полужизни *in vivo*.

Одним из признаков области Fc является консервативное N-связанное гликозилирование, происходящее в N297. Данный углевод или олигосахарид, как его иногда называют, играет ключевую структурную и функциональную роль для антитела и представляет собой одну из основных причин, по которой антитела должны быть получены с использованием систем экспрессии млекопитающих. (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17: 176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74: 288-294; Mimura et al., 2001, J Biol Chem 276: 45539-45547.; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276: 16478-16483; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276: 6591-6604; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277: 26733-26740; Simmons et al., 2002, J Immunol Methods 263: 133-147; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276: 16469-16477; и Krapp et al., 2003, J Mol Biol 325: 979-989, все полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки).

Известно создание антител для терапевтического применения. Такие способы терапии описаны, например, в публикациях Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14: 52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9: 195-200, Cragg et al., 1999, Curr Opin Immunol 11: 541-547; Glennie et al., 2000, Immunol Today 21: 403-410, McLaughlin et al., 1998, J Clin Oncol 16: 2825-2833 и Cobleigh et al., 1999, J Clin Oncol 17: 2639-2648, каждая из которых полностью включена в настоящее описание посредством ссылки. В настоящее время в противораковой терапии любое небольшое снижение в уровне смертности считается успехом. Некоторые варианты IgG, указанные в настоящем описании, увеличивают способность антител ограничивать дальнейший рост или разрушать, по меньшей мере, частично целевые раковые клетки.

Противоопухолевая активность антител реализуется посредством увеличения их способности опосредовать цитотоксические эффекторные функции, такие как ADCC, ADCP и CDC. См, например, публикации Clynes et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95: 652-656; Clynes et al., 2000, Nat Med 6: 443-446 и Cartron et al., 2002, Blood 99: 754-758, обе

из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

IgG1 человека представляет собой чаще всего используемое в терапевтических целях антитело, и в связи с этим было проведено большинство поисковых исследований.

Однако различные изотипы класса IgG, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, обладают уникальными физическими, биологическими и клиническими свойствами. В данной области техники существует необходимость создания улучшенных вариантов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Также существует необходимость создания указанных вариантов для улучшения связывания с FcRn и/или увеличения времени полужизни *in vivo*, по сравнению с нативными полипептидами IgG. Кроме того, существует необходимость комбинирования вариантов, обладающих улучшенными фармакокинетическими свойствами, с вариантами, содержащими модификации, для улучшения эффективности посредством измененного связывания FcγR. Настоящая заявка соответствует этим и другим потребностям.

Краткое описание изобретения

Настоящая заявка относится к вариантам Fc исходного полипептида, содержащим, по меньшей мере, одну модификацию в области Fc указанного полипептида. В различных вариантах реализации вариантные полипептиды демонстрируют измененное связывание с FcRn по сравнению с исходным полипептидом. В некоторых вариантах модификация может быть выбрана из группы, включающей: 428L, 434M и 434S, где нумерация приведена согласно Индексу EU у Kabat et al.

В другом варианте реализации вариант Fc содержит, по меньшей мере, две модификации, выбранные из группы, включающей; 252Y/428L, 428L/434H, 428L/434F, 428L/434Y, 428L/434A, 428L/434M и 428L/434S.

В другом варианте реализации вариант Fc содержит, по меньшей мере, одну модификацию, выбранную из группы, включающей; M428L/N434S, V308F/M428L/N434S.

В другом варианте реализации вариант Fc содержит, по меньшей мере, одну модификацию, выбранную из группы, включающей: 259I/434S, 308F/434S, 308F/428L/434S, 259I/308F/434S, 307Q/308F/434S, 250I/308F/434S и 308F/319L/434S.

В другом варианте реализации вариант Fc содержит, по меньшей мере, одну модификацию, выбранную из группы, включающей:

В другом варианте реализации настоящее изобретение включает способ лечения пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение эффективного количества варианта Fc, указанного в настоящем описании.

В другом варианте реализации настоящее изобретение включает способ увеличения времени полужизни антитела или иммуноадгезина путем модификации Fc согласно модификациям, указанным в настоящем описании

В другом варианте реализации настоящее изобретение включает вариант Fc, обладающий усиленным связыванием FcRn с дополнительными вариантами Fc, модулирующими эффекторную функцию.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Выравнивания последовательностей константных тяжелых цепей IgG человека. Серым показаны отличия от IgG1, а заключенные в квадрат остатки показывают общие аллотипические вариации в популяции человека.

Фиг. 2. (SEQ ID NO: 1-6). Аминокислотные последовательности константных областей, используемых согласно настоящему изобретению.

Фиг. 3. (SEQ ID NO: 7-12). Аминокислотные последовательности константных областей типичных вариантов.

Фиг. 4. (SEQ ID NO: 13-22). Аминокислотные последовательности вариабельных

областей VH и VL, используемых согласно настоящему изобретению.

Фиг. 5. (SEQ ID NO: 23-29). Аминокислотные последовательности типичных вариантных антител.

Фиг. 6. Относительное связывание VEGF диким типом и выбранными вариантными антителами IgG1 анти-VEGF. На графике показаны единицы реакции (RU) Biotec в конце фазы ассоциации для связывания антитела-аналита с иммобилизованным антигеном VEGF. Антитело IgG1 анти-Her2 использовали в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 7. Сенсограммы Biotec антител IgG1 дикого типа и вариантных антител IgG1 к иммобилизованному FcRn человека при низком (6.0) и высоком (7.4) значении pH.

Фиг. 8. Аффинности к связыванию FcRn антител IgG1 дикого типа и выбранных вариантных антител IgG1 в отношении FcRn человека при pH 6.0, как определено Biotec. На графике показана константа псевдоаффинности (K_a^*) на логарифмической шкале.

Фиг. 9. Относительное связывание вариантных антител IgG1 анти-VEGF с FcRn человека, как определено Biotec. В таблице показана кратность K_a^* каждого варианта относительно IgG1 человека дикого типа (нативного). n показывает, сколько раз тестировали каждый вариант, «Среднее» и «SD» означают среднее и стандартное отклонение соответственно для каждого варианта в n экспериментах по связыванию. Кратность FcRn рассчитывали для всех вариантов относительно IgG1 дикого типа в рамках каждого соответствующего эксперимента по связыванию. «NB» означает, что связывание не было обнаружено. «ND» означает, что связывание не было определено для данного конкретного варианта. «NF» означает, что соответствие было невозможно исходя из данных связывания.

Фиг. 10. Относительное связывание вариантных антител IgG2 и IgG1/2 анти-VEGF с FcRn человека, как определено Biotec. Таблица является такой, как описано на фиг. 9.

Фиг. 11. Анализ аддитивных и синергических комбинаций замещения. На фиг. На показан график зависимости экспериментально определенного кратного связывания каждого варианта с FcRn. человека от предполагаемого кратного связывания FcRn, как определено результатом отдельных вариантов. Отмечены базовые точки вариантов, при этом линия отображает абсолютную аддитивность. На фиг. 11b показано отличие между экспериментальной и предполагаемой кратностью для каждого комбинированного варианта. На фиг. 11c показана синергия каждой комбинации вариантов. % синергии рассчитывают как $100 \times [(\text{экспериментальная кратность} / \text{предполагаемая кратность}) - 1]$.

Фиг. 12. Относительное связывание вариантных антител анти-TNF, -CD25, -EGFR и -IgE с FcRn человека, как определено Biotec. Таблица является такой, как описано на фиг. 9.

Фиг. 13. Фармакокинетические характеристики in vivo антител дикого типа и вариантных антител у мышей mFcRn-/- hFcRn+. На графиках изображена зависимость сывороточной концентрации антитела от времени после введения одной дозы внутривенно. На фиг. 13a показаны данные одного из четырех исследований, проведенных с использованием антител IgG1 (Исследование 3), а на фиг. 13b показаны данные исследования, проведенного с использованием антител IgG2 (Исследование 5).

Фиг. 14. Подобранные ФК параметры всех ФК исследований in vivo, выполненных у мышей mFcRn-/- hFcRn+ с использованием вариантных антител и антител дикого типа. n означает число мышей в группе с данными среднего и стандартного отклонения (SD),

предусмотренными ФК параметрами. «Время полужизни (время полувыведения)» представляет собой бета-фазу, характеризующую выведение антитела из сыворотки. Стах представляет собой максимальную наблюдаемую сывороточную концентрацию, ППК представляет собой площадь под кривой «концентрация-время», а «клиренс» представляет собой клиренс антитела из сыворотки. Кратное время полужизни рассчитывают как время полужизни вариантного антитела относительно времени полужизни исходного IgG1 или IgG2 дикого типа в рамках каждого исследования.

Фиг. 15. Корреляция между временем полужизни вариантных антител IgG1 (фиг. 15a) и IgG2 (фиг. 15b) у мышей mFcRn-/-hFcRn+ и кратное связывание FcRn относительно IgG1 дикого типа. Данные на оси-Y взяты с фиг. 14, а данные на оси-X взяты с фиг. 9 и 10. Выбранные варианты отмечены, а данные вариантов повторных экспериментов обведены в кружок. На фиг. 15c показаны как данные корреляции IgG1, так и данные корреляции IgG2, при этом черные и серые линии представляют соответствие данных IgG1 and IgG2 соответственно.

Фиг. 16 (SEQ ID NO: 30-35). Аминокислотные последовательности вариантных и исходных иммуноадгезинов Fc анти-TNF, используемых согласно настоящему изобретению.

Фиг. 17. Связывание иммуноадгезинов анти-TNF с антигеном TNF, как определено Biacore.

Фиг. 18. Относительное связывание вариантных иммуноадгезинов Fc с FcRn человека, как определено Biacore. В таблице показана кратность Ka* каждого варианта относительно IgG1 человека дикого типа (нативного). n показывает, сколько раз тестировали каждый вариант, а «Среднее» и «SD» означают среднее и стандартное отклонение соответственно для каждого варианта в n экспериментах по связыванию. Кратность FcRn рассчитывали для всех вариантов относительно соответствующего исходного IgG1 в рамках каждого соответствующего эксперимента по связыванию.

Фиг. 19. Фармакокинетические характеристики in vivo исходных и вариантных иммуноадгезинов Fc у мышей mFcRn-/- hFcRn+. На графиках изображена зависимость сывороточной концентрации гибрида Fc от времени после введения одной дозы внутривенно.

Фиг. 20. Подобранные ФК параметры гибрида Fc, полученные в результате ФК исследования in vivo у мышей mFcRn-/- hFcRn+. Параметры являются такими как описано на фиг. 14. % увеличения времени полужизни рассчитывают как умноженное на 100 время полужизни вариантного гибрида Fc относительно времени полужизни исходного IgG1 или IgG2 дикого типа.

Фиг. 21. Относительное связывание вариантных антител IgG1 анти-VEGF с FcRn яванской макаки и человека, как определено Biacore. На фиг. 21 а представлены данные в форме таблицы. Описание указанной фигуры соответствует описанию на фиг. 9, а данные связывания с FcRn человека взяты с фиг. 9. На фиг. 21b представлен график указанных данных.

Фиг. 22. Фармакокинетические характеристики in vivo антител дикого типа и вариантных антител у яванских макаков. На графиках изображена зависимость сывороточной концентрации антитела от времени после введения одной дозы внутривенно.

Фиг. 23. Подобранные ФК параметры, полученные в результате ФК исследования in vivo у яванских макаков с использованием вариантных антител и антител дикого типа. Параметры являются такими, как описано на фиг. 14.

Подробное описание изобретения

Согласно настоящему изобретению описано получение новых вариантов доменов Fc, включая варианты, содержащиеся в антителах, гибридах Fc и иммуноадгезинах, которые обладают увеличенным связыванием с рецептором FcRn. Как указано в настоящем описании, связывание с FcRn приводит к более продолжительному

5 удерживанию в сыворотке *in vivo*.

Для того, чтобы увеличить удержание белков Fc *in vivo* повышение аффинности к связыванию должно происходить при значении pH около 6, тогда как поддержание более низкой аффинности - при значении pH около 7.4. Несмотря на продолжающиеся исследования, считают, что области Fc обладают более продолжительным временем полужизни *in vivo*, т.к. связывание с FcRn при pH 6 в эндосоме секвестрирует Fc (Ghetie and Ward, 1997 Immunol Today. 18(12): 592-598, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Затем эндосомальный компартмент возвращает Fc на поверхность клетки. Как только компартмент открывает внеклеточное пространство, более высокое значение pH, ~7.4, индуцирует высвобождение Fc обратно в кровь. У

15 мышей Dall' Acqua et al. показали, что мутанты Fc, обладающие увеличенным связыванием FcRn при pH 6 и pH 7.4, в действительности уменьшали сывороточные концентрации и время полужизни, как и Fc дикого типа (Dall' Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169: 5171-5180, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Считают, что повышенная аффинность Fc к FcRn при pH 7.4 не позволяет высвободить

20 Fc обратно в кровь. Следовательно, мутации Fc, которые увеличат время полужизни Fc *in vivo* в идеальном случае увеличат связывание FcRn при более низком значении pH, в то же время, позволяя высвободить Fc при более высоком значении pH. Аминокислота гистидин меняет свое заряженное состояние в диапазоне pH 6.0-7.4. Следовательно, неудивительно, что остатки His расположены в комплексе Fc/FcRn

25 (фиг. 6) в положениях, имеющих важное значение.

Дополнительный аспект настоящего изобретения представляет собой увеличение связывания FcRn по сравнению с диким типом, в частности при более низком значении pH, pH около 6.0, для облегчения связывания Fc/FcRn в эндосоме. Также описаны варианты Fc, обладающие измененным связыванием FcRn и измененным связыванием

30 с другим классом рецепторов Fc, FcγR's (иногда пишут FcγR's), т.к. было показано, что дифференцированное связывание с FcγRs, в частности увеличенное связывание с FcγRIIIb и уменьшенное связывание с FcγRIIb, приводит к повышенной эффективности.

Определения

Для более полного понимания настоящей заявки ниже приведены некоторые

35 определения. Подразумевается, что указанные определения включают грамматические эквиваленты.

В настоящем описании термин «ADCC» или «антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» означает опосредуемую клетками реакцию, в которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие FcγRs, распознают

40 связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис данной клетки-мишени.

В настоящем описании термин «ADCP» или «антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз» означает опосредуемую клетками реакцию, в которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие FcγRs, распознают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают фагоцитоз данной клетки-

45 мишени.

В настоящем описании термин «модификация» означает замещение, встраивание и/или делецию аминокислот в полипептидной последовательности или преобразование во фрагмент, химически связанный с белком. Например, модификация может

представлять собой измененную структуру углевода или PEG, присоединенную к белку. В настоящем описании термин «модификация аминокислот» означает замещение, встраивание и/или делецию аминокислот в полипептидной последовательности.

В настоящем описании термин «замещение аминокислот» или «замещение» означает замену аминокислоты в конкретном положении в исходном полипептиде на другую аминокислоту. Например, замещение E272Y относится к вариантному полипептиду, в данном случае варианту Fc, в котором глутаминовая кислота в положении 272 заменена на тирозин.

В настоящем описании термин «встраивание аминокислот» или «встраивание» означает добавление аминокислотной последовательности в конкретное положение в исходной полипептидной последовательности. Например -233E или ^233E означает встраивание глутаминовой кислоты после положения 233 и перед положением 234. Кроме того, -233ADE или ^233ADE означает встраивание AlaAspGlu после положения 233 и перед положением 234.

В настоящем описании термин «деления аминокислот» или «деления» означает удаление аминокислотной последовательности в конкретном положении в исходной полипептидной последовательности. Например, E233- или E233# означает делецию глутаминовой кислоты в положении 233. Кроме того, EDA233- или EDA233# означает делецию последовательности GluAspAla, начинающуюся в положении 233.

В настоящем описании термин «вариантный белок» или «вариант белка», или «вариант» означает белок, отличающийся от исходного белка наличием, по меньшей мере, одной модификации аминокислоты. Термин «вариант белка» может относиться к самому белку, композиции, содержащей указанный белок, или аминокислотной последовательности, кодирующей его. Предпочтительно вариант белка содержит, по меньшей мере, одну модификацию аминокислот по сравнению с исходным белком, например, от примерно одной до примерно семидесяти модификаций аминокислот, и предпочтительно от примерно одной до примерно пяти модификаций аминокислот по сравнению с исходным белком. В настоящем описании последовательность варианта белка предпочтительно будет обладать, по меньшей мере, около 80% гомологии с последовательностью исходного белка и более предпочтительно, по меньшей мере, около 90% гомологии, наиболее более предпочтительно, по меньшей мере, около 95% гомологии. Термин «вариантный белок» может относиться к самому вариантному белку, композициям, содержащим указанный вариант белка, или последовательности ДНК, кодирующей его. Соответственно, в настоящем описании термин «вариант антитела» или «вариантное антитело» означает антитело, отличающееся от исходного антитела наличием, по меньшей мере, одной модификации аминокислоты, термин «вариант IgG» или «вариантный IgG» означает антитело, отличающееся от исходного IgG наличием, по меньшей мере, одной модификации аминокислоты и термин «вариант иммуноглобулина» или «вариантный иммуноглобулин» означает последовательность иммуноглобулина, отличающуюся от исходной последовательности иммуноглобулина наличием по меньшей мере одной модификации аминокислоты. В настоящем описании термин «вариант Fc» или «вариантный Fc» означает белок, содержащий модификацию в домене Fc. Варианты Fc согласно настоящему изобретению определены в соответствии с модификациями аминокислот, которые они содержат. Таким образом, например, N434S или 434S представляет собой вариант Fc, содержащий замещение, серин, в положении 434 относительно исходного полипептида Fc, при этом нумерация приведена согласно индексу EU. Аналогичным образом, M428L/N434S определяет вариант Fc, содержащий замещения M428L и N434S относительно исходного полипептида Fc.

Идентичность аминокислоты дикого типа может быть не определена и в этом случае вышеуказанный вариант обозначается 428L/434S. Отмечают, что порядок, в котором предложены замещения, является произвольным, т.е., например, 428L/434S представляет собой тот же вариант Fc, что и M428L/N434S и т.д. Для всех положений, описанных согласно настоящему изобретению, нумерация приведена согласно индексу EU. Термин «индекс EU» или «индекс EU согласно Kabat», или «схема нумерации EU» относится к нумерации антитела EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85, тем самым полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Модификация может представлять собой добавление, делецию или замещение. Замещения могут включать встречающиеся в природе аминокислоты и не встречающиеся в природе аминокислоты. Варианты могут содержать неприродные аминокислоты. Примеры включают US 6586207; WO 98/48032; WO 03/073238; US 2004-0214988 A1; WO 05/35727 A2; WO 05/74524 A2; J.W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124: 9026-9027; J.W. Chin, & P.G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11: 1135-1137; J.W. Chin, et al., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024; and, L. Wang, & P.G. Schultz, (2002), Chem. 1-10, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

В настоящем описании термин «белок» означает, по меньшей мере, две ковалентно присоединенные аминокислоты, при этом указанный термин включает белки, полипептиды, олигопептиды и пептиды. Пептидная группа может содержать встречающиеся в природе аминокислоты и пептидные связи или синтетические пептидомиметические структуры, т.е. «аналоги», такие как пептоиды (см. Simon et al., PNAS USA 89(20): 9367 (1992), который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки). Аминокислоты могут быть либо встречающимися в природе, либо не встречающимися в природе, что очевидно для специалистов в данной области техники. Например, гомофенилаланин, цитруллин и норлейцин считаются аминокислотами для целей настоящего изобретения и могут быть использованы аминокислоты как D-, так и L-(R или S) конфигураций. Варианты согласно настоящему изобретению могут содержать модификации, включающие использование неприродных аминокислот с использованием, например, технологий, разработанных Schultz и коллегами, включая, без ограничения, способы, описанные Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12): 625-30, Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101(2): 7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656): 371-3 и Chin et al., 2003, Science 301(5635): 964-7, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Кроме того, полипептиды могут включать синтетическую дериватизацию одной или нескольких боковых цепей или терминалов, гликозилирование, пегалирование (PEGylation), циклическую перестановку, циклизацию, линкеры для соединения с другими молекулами, гибридизацию в белки или домены белков и добавление пептидных тегов или меток.

В настоящем описании термин «остаток» означает положение в белке и связанную аминокислотную идентичность. Например, Аспарагин 297 (также обозначаемый Asn297 или N297) представляет собой остаток в положении 297 в антителе IgG1 человека.

В настоящем описании термин «Fab» или «область Fab» означает полипептид, содержащий домены VH, CH1, VL и CL иммуноглобулина. Термин «Fab» может относиться к данной области отдельно или в контексте полноразмерного антитела, фрагмента антитела или гибридного белка Fab. В настоящем описании термин «Fv» или «фрагмент Fv». или «область Fv» означает полипептид, содержащий домены VL и VH одного антитела.

В настоящем описании термин «модификация подкласса IgG» означает модификацию

аминокислот, превращающую одну аминокислоту одного изотипа IgG в соответствующую аминокислоту другого, выровненного изотипа IgG. Например, т.к. IgG1 содержит тирозин, а IgG2 содержит фенилаланин в положении EU 296, замещение F296Y в IgG2 считают модификацией подкласса IgG.

5 В настоящем описании термин «не встречающаяся в природе модификация» означает модификацию аминокислот, которая не является изотипической. Например, т.к. ни один из IgGs не содержит серин в положении 434, замещение 434S в IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 считают не встречающейся в природе модификацией.

10 В настоящем описании термины «аминокислота» и «аминокислотная идентичность» означают одну из 20 встречающихся в природе аминокислот или любые неприродные аналоги, которые могут присутствовать в конкретном, определенном положении.

В настоящем описании термин «эффекторная функция» означает биохимическую реакцию, являющуюся следствием взаимодействия области Fc антитела с рецептором или лигандом Fc. Эффекторные функции включают без ограничения ADCC, ADCP и

15 CDC.

В настоящем описании термин «лиганд Fc IgG» означает молекулу, предпочтительно полипептид, происходящую из любого организма, которая связывается с областью Fc антитела IgG с образованием комплекса Fc/лиганд Fc. Лиганды Fc включают без ограничения FcγRs, FcγRs, FcγRs, FcRn, C1q, C3, маннан-связывающий лектин, маннозный

20 рецептор, стафилококковый белок A, стрептококковый белок G и вирусный FcγR. Лиганды Fc также включают гомологи рецептора Fc (FcRH), которые представляют собой семейство рецепторов Fc, гомологичных FcγRs (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190: 123-136, полностью включенный в настоящее описание посредством

ссылки). Лиганды Fc могут включать неисследованные молекулы, связывающие Fc.

25 Конкретные лиганды Fc IgG представляют собой FcRn и гамма рецепторы Fc. В настоящем описании термин «лиганд Fc» означает молекулу, предпочтительно полипептид, происходящую из любого организма, которая связывается с областью Fc антитела с образованием комплекса Fc/лиганд Fc.

В настоящем описании термин «гамма рецептор Fc», «FcγR» или «FcгаммаR» означает

30 любой член семейства белков, который связывается с областью Fc антитела IgG и кодируется геном FcγR. У людей данное семейство включает без ограничения FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 и R131), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2) и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158)

35 и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки), а также любые неисследованные изоформы FcγRs или FcγR или аллотипы человека. FcγR может происходить из любого организма, включая без ограничения людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. FcγRs мыши включают без ограничения FcγRI (CD64), FcγRII

40 (CD32), FcγRIII (CD16) и FcγRIII-2 (CD16-2), а также любые неисследованные изоформы FcγRs или FcγR или аллотипы мыши.

В настоящем описании термин «FcRn» или «неонатальный рецептор Fc» означает белок, который связывается с областью Fc антитела IgG и, по меньшей мере, частично кодируется геном FcRn. FcRn может происходить из любого организма, включая без

45 ограничения людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Как известно в данной области техники, функциональный белок FcRn содержит два полипептида, часто называемых «тяжелой цепью» и «легкой цепью». Легкая цепь представляет собой бета-2-микроглобулин, а тяжелая цепь кодируется геном FcRn. Если в настоящем описании

не указано иное, термин «FcRn» или «белок FcRn» относится к комплексу тяжелой цепи FcRn с бета-2-микроглобулином. Последовательности FcRn, в частности людей, представляющие особый интерес, показаны на фигурах.

В настоящем описании термин «исходный полипептид» означает
 5 немодифицированный пептид, который затем модифицируют с получением варианта. Исходный полипептид может представлять собой встречающийся в природе полипептид или вариант, или созданную версию встречающегося в природе полипептида. Термин «исходный полипептид» может относиться к самому полипептиду, композициям, содержащим указанный исходный полипептид, или аминокислотной последовательности,
 10 кодирующей его. Соответственно, в настоящем описании термин «исходный иммуноглобулин» означает немодифицированный пептид иммуноглобулина, который модифицируют с получением варианта, а термин «исходное антитело» означает немодифицированное антитело, которое модифицируют с получением вариантного антитела. Следует отметить, что термин «исходное антитело» включает известные
 15 коммерчески доступные, полученные рекомбинантными способами антитела, как указано ниже.

В настоящем описании термин «положение» означает место в последовательности белка. Положения могут быть пронумерованы по порядку или в соответствии с установленной схемой, например, индексом EU для нумерации антитела.

20 В настоящем описании термин «антиген-мишень» означает молекулу, специфически связанную вариабельной областью указанного антитела. Антиген-мишень может представлять собой белок, углевод, липид или другое химическое соединение.

В настоящем описании термин «клетка-мишень» означает клетку, экспрессирующую антиген-мишень.

25 В настоящем описании термин «вариабельная область» означает область иммуноглобулина, которая содержит один или несколько доменов иммуноглобулина, по существу кодируемых любым из генов V_κ, V_λ и/или V_H, составляющих каппа, лямбда локусы и генетические локусы тяжелых цепей иммуноглобулина соответственно.

В настоящем описании термин «дикий тип или WT» означает аминокислотную
 30 последовательность или нуклеотидную последовательность, которая встречается в природе, включая аллельные вариации. Белок дикого типа содержит аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, которую целенаправленно не модифицировали.

Настоящее изобретение относится к антителам, демонстрирующим увеличенное
 35 связывание с FcRn по сравнению с антителом дикого типа. Например, в ряде случаев увеличенное связывание приводит к клеточной рециркуляции антитела, и, следовательно, к увеличенному времени полужизни. Кроме того, антитела, демонстрирующие увеличенное связывание с FcRn и измененное связывание с другими рецепторами Fc, например FcγRs, находят применение согласно настоящему изобретению.

40 Антитела

Настоящее изобретение относится к антителам, которые содержат модификации аминокислот, модулирующие связывание с FcRn. Особый интерес представляют
 антитела, минимально содержащие область Fc или ее функциональный вариант, демонстрирующий повышенную аффинность к связыванию с FcRn при пониженном
 45 значении pH и по существу не демонстрирующий измененное связывание при более высоком значении pH.

Традиционные структурные единицы антитела, как правило, содержат тетрамер. Каждый тетрамер, как правило, состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей,

при этом каждая пара содержит одну «легкую» (как правило, имеющую молекулярную массу примерно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (как правило, имеющую молекулярную массу примерно 50-70 кДа). Легкие цепи человека делят на каппа и лямбда легкие цепи. Тяжелые цепи делят на мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon и они определяют изотип антитела IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая без ограничения IgM1 и IgM2. Таким образом, в настоящем описании термин «изотип» означает любой из подклассов иммуноглобулинов, определяемый химическими и антигенными свойствами своих константных областей. Известные изотипы иммуноглобулина человека представляют собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD и IgE.

N-конец каждой цепи содержит переменную область, состоящую из примерно 100-110 или более аминокислот, главным образом ответственную за распознавание антигена. В переменной области три петли соединены для каждого из V-доменов тяжелой цепи и легкой цепи с образованием антигенсвязывающего центра. Каждая из петель называется «определяющей комплементарность областью» (гиперпеременной участком) (далее обозначаемая «CDR»), в которой вариация аминокислотной последовательности имеет наибольшее значение.

C-конец каждой цепи определяет константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию. Kabat et al. получили многочисленные первичные последовательности переменных областей тяжелых цепей и легких цепей. Исходя из степени консервативности указанных последовательностей, они разделили индивидуальные первичные последовательности на CDR и каркасные области и составили их список (см. SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication. No. 91-3242, E.A. Kabat et al., который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки).

В подклассе IgG иммуноглобулинов существуют несколько доменов иммуноглобулина в тяжелой цепи. В настоящем описании термин «домен иммуноглобулина (Ig)» означает область иммуноглобулина, имеющую отличающуюся третичную структуру. Согласно настоящему изобретению интерес представляют домены тяжелых цепей, включая константные тяжелые (CH) домены и шарнирные домены. В контексте антител IgG каждый изотип IgG содержит три области CH. Соответственно, домены «CH» в контексте IgG являются следующими: «CH1» относится к положениям 118-220 согласно индексу EU, как у Kabat. «CH2» относится к положениям 237-340 согласно индексу EU, как у Kabat и «CH3» относится к положениям 341-447 согласно индексу EU, как у Kabat.

Другой тип домена Ig тяжелой цепи представляет собой шарнирную область. В настоящем описании термин «шарнир» или «шарнирная область», или «шарнирная область антитела», или «шарнирная область иммуноглобулина» означает гибкий полипептид, содержащий аминокислоты между первым и вторым константным доменом антитела. Структурно, домен CH1 IgG заканчивается в положении EU 220, а домен CH2 IgG начинается в положении EU остатка 237. Таким образом, для IgG шарнир антитела в настоящем описании включает положения 221 (D221 в IgG1) - 236 (G236 в IgG1), при этом нумерация приведена согласно индексу EU, как у Kabat. В некоторых вариантах реализации, например в контексте области Fc, включен низший шарнир, при этом термин «низший шарнир» в целом относится к положениям 226 или 230.

Особый интерес согласно настоящему изобретению представляют области Fc. В настоящем описании термин «Fc» или «область Fc» означает полипептид, содержащий константную область антитела за исключением первого иммуноглобулинового домена

константной области, и в некоторых случаях часть шарнира. Таким образом, термин «Fc» относится к последним двум иммуноглобулиновым доменам IgA, IgD и IgG константной области, последним трем иммуноглобулиновым доменам IgE и IgM константной области и гибкому шарниру, N-терминальному по отношению к указанным доменам. Для IgA и IgM, Fc может содержать цепь J. Для IgG, как изображено на фиг. 1, Fc содержит домены иммуноглобулина Сгамма2 и Сгамма3 (Cg2 и Cg3) и низшую шарнирную область между Сгамма1 (Cg1) и Сгамма2 (Cg2). Несмотря на то, что границы области Fc могут варьироваться, область Fc тяжелой цепи IgG человека, как правило, включает остатки C226 или P230 относительно карбоксильного терминала, при этом нумерация приведена согласно индексу EU, как у Kabat. Термин «Fc» может относиться к данной области отдельно или в контексте полипептида Fc, как описано ниже. В настоящем описании термин «полипептид Fc» означает полипептид, содержащий всю область Fc или ее часть. Полипептиды Fc включают антитела, гибриды Fc, выделенные области Fc и фрагменты Fc.

В некоторых вариантах реализации антитела являются полноразмерными. В настоящем описании термин «полноразмерное антитело» означает структуру, которая формирует природную биологическую форму антитела, включая вариабельные и константные области, содержащие одну или несколько модификаций, как указано в настоящем описании.

В качестве альтернативы, антитела могут представлять собой множество структур, включая без ограничения фрагменты антител, моноклональные антитела, биспецифические антитела, миниантитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в настоящем описании «миметиками антител»), химерные антитела, гуманизированные антитела, гибриды антител (иногда называемые в настоящем описании «конъюгатами антител») и фрагменты каждого из указанных соответственно.

Фрагменты антител

В одном из вариантов реализации антитело представляет собой фрагмент антитела. Особый интерес представляют антитела, содержащие области Fc, гибриды Fc и константную область тяжелой цепи (CH1-шарнир-CH2-CH3), также включая гибриды константной области тяжелой цепи.

Конкретные фрагменты антитела включают без ограничения (i) фрагмент Fab, содержащий домены VL, VH, CL и CH1, (ii) фрагмент Fd, содержащий домены VH и CH1, (iii) фрагмент Fv, содержащий домены VL и VH одного антитела; (iv) фрагмент dAb (Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки), содержащий одну вариабельную область, (v) выделенные области CDR, (vi) фрагменты F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два связанных фрагмента Fab (vii) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), в которых домен VH и домен VL связаны пептидным линкером, позволяющим двум указанным доменам ассоциироваться с образованием антигенсвязывающего центра (Bird et al., 1988, Science 242: 423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883, полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки), (viii) биспецифический одноцепочечный Fv (WO 03/11161, тем самым полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки) и (ix) «диатела» или «триатела», поливалентные или полиспецифические фрагменты, полученные путем слияния генов (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326: 461-479; WO 94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-6448, все полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки). Фрагменты антитела могут быть модифицированы. Например, молекулы

могут быть стабилизированы путем введения дисульфидных мостиков, связывающих домены VH и VL (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14: 1239-1245, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки).

Химерные и гуманизированные антитела

5 В некоторых вариантах реализации каркасные компоненты могут представлять собой смесь разных видов. Поэтому, если белок представляет собой антитело, такое антитело может представлять собой химерное антитело и/или гуманизированное антитело. В целом, термин как «химерные антитела», так и «гуманизированные антитела» относится к антителам, содержащим комбинированные области более чем
10 одного вида. Например, «химерные антитела» традиционно содержат вариабельную область (области) мыши (или крысы в некоторых случаях) и константную область (области) человека. Термин «гуманизированные антитела» в целом относится к антителам нечеловеческого происхождения, содержащим каркасные области вариабельного домена, замененные на последовательности, встречающиеся в антителах
15 человека. В целом, в гуманизированном антителе антитело полностью, за исключением CDRs, кодируется полинуклеотидом человеческого происхождения или является идентичным такому антителу, за исключением CDRs. Области CDR, некоторые или все из которых кодируются нуклеиновыми кислотами, происходящими из нечеловеческого организма, трансплантируют в каркас бета-складчатого слоя вариабельной области
20 антитела человека с получением антитела, специфичность которого определяется внедренными CDRs. Получение таких антител описано, например, в WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321: 522-525, Verhoeven et al., 1988, Science 239: 1534-1536, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. «Обратная мутация» выбранных акцепторных остатков каркаса в соответствующие донорные остатки часто
25 необходима для восстановления аффинности, утраченной в исходной трансплантированной конструкции (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, все полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки). В оптимальном варианте гуманизированное антитело также будет содержать, по меньшей мере, часть константной области
30 иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека, и таким образом будет содержать область Fc человека. Гуманизированные антитела также могут быть получены с использованием мышей с иммунной системой, созданной методами генной инженерии. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20: 639-654, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки. Множество технологий и способов гуманизации и
35 реконструирования антител нечеловеческого происхождения хорошо известны в данной области техники (См. Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA) и приведенные там ссылки, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки). Способы гуманизации включают без ограничения способы, описанные в Jones et al.,
40 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332: 323-329; Verhoeven et al., 1988, Science, 239: 1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86: 10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20): 4593-9; German et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11: 321-8, все из которых полностью включены
45 в настоящее описание посредством ссылки. Гуманизация или другие способы снижения иммуногенности вариабельных областей антител нечеловеческого происхождения могут включать способы восстановления поверхности, например, как описано в Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 969-973, который полностью включен в настоящее

описание посредством ссылки. В одном из вариантов реализации исходное антитело подвергали созреванию аффинности, как известно в данной области техники. Способы, основанные на структуре, могут быть использованы для гуманизации и созревания аффинности, например, как описано в USSN 11/004590. Способы, основанные на выборе, могут быть использованы для гуманизации и/или созревания аффинности переменных областей антитела, включая без ограничения способы, описанные в Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294: 151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16): 10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10): 753-759, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Другие способы гуманизации могут включать трансплантацию только частей CDRs, включая без ограничения способы, описанные в USSN 09/810510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169: 1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169: 3076-3084, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Биспецифические антитела

В одном из вариантов реализации антитела согласно настоящему изобретению включают полиспецифическое антитело и в частности биспецифическое антитело, также иногда называемое «диателом». Указанные антитела представляют собой антитела, связывающиеся с двумя (или более) различными антигенами. Диатела могут быть получены множеством способов, известных в данной области техники (Holliger and Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4: 446-449, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки), например, получены химически или из межвидовых гибридом,

Миниантитела

В одном из вариантов реализации антитело представляет собой миниантитело. Миниантитела представляют собой минимизированные подобные антителам белки, содержащие scFv, соединенный с доменом СН3. Ни et al., 1996, Cancer Res. 56: 3055-3061, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых случаях scFv может быть связан с областью Fc и может включать некоторую часть или всю шарнирную область.

Гибриды антител

В одном из вариантов реализации антитела согласно настоящему изобретению представляют собой гибридные белки антител (иногда называемые в настоящем описании «конъюгатами антител»). Один из видов гибридов антител содержит гибриды Fc, которые соединяют область Fc с «партнером» по конъюгации. В настоящем описании термин «гибрид Fc» означает белок, в котором один или несколько полипептидов функционально связаны с областью Fc. В настоящем описании термин «гибрид Fc» является синонимом терминов «иммуноадгезин», «гибрид Ig», «химера Ig» и «рецепторный глобулин» (иногда с примесями), используемых в известном уровне техники (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14: 52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9: 195-200, оба полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки). Гибрид Fc объединяет область Fc иммуноглобулина с «партнером» по слиянию, который в целом может представлять собой любой белок или небольшую молекулу. В действительности любой белок или небольшая молекула может быть связана с Fc с получением гибрида Fc. Белковые «партнеры» по слиянию могут включать без ограничения переменную область любого антитела, область рецептора для связывания с мишенью, адгезивную молекулу, лиганд, фермент, цитокин, хемокин или некоторый другой белок или домен белка. «Партнеры» по слиянию, представляющие небольшие

молекулы, могут включать любой терапевтический агент, который направляет гибрид Fc к мишени для терапевтического воздействия. Такие мишени могут представлять собой любую молекулу, предпочтительно внеклеточный рецептор, которая вовлечена в заболевание. Таким образом, варианты IgG могут быть соединены с одним или несколькими «партнерами» по слиянию. В одном из альтернативных вариантов реализации вариант IgG конъюгируют или функционально связывают с другим терапевтическим соединением. Терапевтическое соединение может представлять собой цитотоксический агент, химиотерапевтический агент, токсин, радиоизотоп, цитокин или другой терапевтически активный агент. IgG может быть связан с одним из множества небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем, полиоксикалленами или сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля.

Помимо гибридов Fc гибриды антител включают гибрид константной области тяжелой цепи с одним или несколькими «партнерами» по слиянию (включая переменную область любого антитела), в то время как другие гибриды антител представляют собой по существу или полностью полноразмерные антитела с «партнерами» по слиянию. В одном из вариантов реализации роль «партнера» по слиянию заключается в опосредовании связывания с мишенью и таким образом он является функционально аналогичным переменным областям антитела (и фактически может быть). В действительности любой белок или небольшая молекула может быть соединена с Fc с получением гибрида Fc (или гибрида антитела). Белковые «партнеры» по слиянию могут включать без ограничения область рецептора для связывания с мишенью, адгезивную молекулу, лиганд, фермент, цитокин, хемокин или некоторый другой белок или домен белка. «Партнеры» по слиянию, представляющие небольшие молекулы, могут включать любой терапевтический агент, который направляет гибрид Fc к мишени для терапевтического воздействия. Такие мишени могут представлять собой любую молекулу, предпочтительно внеклеточный рецептор, которая вовлечена в заболевание.

«Партнер» по конъюгации может быть белковым или небелковым; последний обычно получают с использованием функциональных групп антитела и «партнера» по конъюгации. Например, линкеры известны в данной области техники; например, гомо- или гетеробифункциональные линкеры хорошо известны (см. 1994 каталог Pierce Chemical Company, раздел техники, посвященный линкерам, страницы 155-200, который включен в настоящее описание посредством ссылки).

Подходящие конъюгаты включают без ограничения метки, как описано ниже, лекарственные средства и цитотоксические агенты, включая без ограничения цитотоксические лекарственные средства (например, химиотерапевтические агенты) или токсины, или активные фрагменты указанных токсинов. Подходящие токсины и их соответствующие фрагменты включают цепь А дифтерии, цепь А экзотоксина, цепь А рицина, цепь А абрина, курцин, кротин, феномицин, эномицин и т.п. Цитотоксические агенты также включают радиохимические вещества, получаемые путем конъюгирования радиоизотопов с антителами или путем связывания радионуклида с хелатирующим агентом, который был ковалентно присоединен к антителу. В дополнительных вариантах реализации используют калихимицин, ауристин, гелданамицин, майтансин и дуокармицин и аналоги; на предмет последнего см. U.S. 2003/0050331 A1, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Ковалентные модификации антител

Ковалентные модификации антител включены в объем настоящего изобретения и обычно, но не всегда их осуществляют посттрансляционно. Например, некоторые виды

ковалентных модификаций антитела вводят в молекулу путем осуществления взаимодействия конкретных аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим агентом, который может реагировать с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками.

- 5 Цистеинильные остатки чаще всего подвергают взаимодействию с α -галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид с получением карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Цистеинильные остатки также могут быть дериватизированы посредством реакции с бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-имидозоил)пропионовой кислотой,
- 10 хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлормеркурбензоатом, 2-хлормеркур-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом и т.п.

- Гистидильные остатки дериватируют посредством реакции с диэтилпирокарбонатом при pH 5.5-7.0, т.к. данный агент обладает относительной специфичностью в отношении
- 15 боковой цепи гистидила. Также подходит пара-бромфенацилбромид; указанную реакцию предпочтительно проводят в 0.1 М какодилате натрия при pH 6.0.

- Лизинильные и аминоконцевые остатки подвергают взаимодействию с ангидридами янтарной кислоты или других карбоновых кислот. Дериватизация указанными агентами приводит к изменению заряда лизинильных остатков. Другие подходящие реагенты
- 20 для дериватизации остатков, содержащих альфа-аминогруппу, включают имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборгидрид; тринитробензолсульфоновая кислота; O-метилизомочевина; 2,4-пентандион и реакцию с глиоксидом, катализируемую трансаминазой.

- Аргинильные остатки модифицируют посредством реакции с одним или несколькими
- 25 стандартными реагентами, среди которых находится фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Для дериватизации остатков аргинина необходимо осуществлять реакцию в щелочной среде из-за высокого значения pKa гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, данные реагенты могут взаимодействовать с группами лизина, а также epsilon-аминогруппой аргинина.

- 30 Специфическая модификация тирозильных остатков может быть с особым интересом осуществлена при введении спектральных меток в тирозильные остатки по реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометаном. Чаще всего используют N-ацетилимидазол и тетранитрометан с образованием O-ацетилтирозильных соединений и 3-нитропроизводных соответственно. Тирозильные остатки иодируют с
- 35 применением 1251 или 1311 с получением меченых белков для использования в радиоиммуноанализе, при этом вышеописанный хлораминовый метод является подходящим,

- Боковые карбоксильные группы (аспартила или глутамила) селективно
- 40 модифицируют посредством реакции с карбодиимидами ($R^1-N=C=N-R'$), где R и R' возможно представляют собой разные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-(4-этил) карбодиимид или 1-этил-3-(4-азония-4,4-диметилпентил) карбодиимид. Кроме того, аспартильные и глутамильные остатки превращают в аспарагинильные и глутаминильные остатки посредством реакции с ионами аммония.

- Дериватизация с помощью бифункциональных агентов подходит для сшивания
- 45 антител с водонерастворимой вспомогательной матрицей или поверхностью для применения во множестве способов помимо способов, описанных ниже. Широко применяемые сшивающие агенты включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутар альдегид, N-гидроксисукцинимидные эфиры, например, эфиры 4-

азидосалициловой кислоты, гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидильные эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-окстан.

Дериватирующие агенты, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропиоимидат, образуют фотоактивируемые интермедиаты, которые могут образовывать поперечные связи в присутствии света. В качестве альтернативы, реакционноспособные водонерастворимые матрицы, такие как бромциан-активированные углеводы и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки, применяют для иммобилизации белков.

Глутаминильные и аспарагинильные остатки многократно дезамидируют с образованием соответствующих глутамильных и аспартильных остатков соответственно. В качестве альтернативы, данные остатки дезамидируют в умеренно кислой среде. Любая форма указанных остатков входит в объем настоящего изобретения. Другие модификации включают гидроксילирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование α-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983], полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки), ацетилирование N-терминального амина и амидирование любой C-терминальной карбоксильной группы.

Гликозилирование

Другой вид ковалентной модификации представляет собой гликозилирование. В другом варианте реализации варианты IgG, указанные в настоящем описании, могут быть модифицированы и в результате содержать одну или несколько созданных гликоформ. В настоящем описании термин «созданная гликоформа» означает углеводную композицию, ковалентно присоединенную к IgG, при этом указанная углеводная композиция химически отличается от композиции исходного IgG. Созданные гликоформы могут подходить для решения множества задач, включая без ограничения усиление или ослабление эффекторной функции. Созданные гликоформы могут быть получены множеством способов, известных в данной области техники (Umafia et al., 1999, *Nat Biotechnol* 17: 176-180; Davies et al., 2001, *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294; Shields et al., 2002, *J Biol Chem* 277: 26733-26740; Shinkawa et al., 2003, *J Biol Chem* 278: 3466-3473; US 6602684; USSN 10/277370; USSN 10/113929; PCT WO 00/61739 A1; PCT WO 01/29246 A1; PCT WO 02/31140 A1; PCT WO 02/30954 A1, все полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки; (технология Potelligent® [Biowa, Inc., Princeton, NJ];

инженерная технология гликозилирования GlycoMAb® [Glycart Biotechnology AG, Zurich, Switzerland]). Многие из данных технологий основаны на контроле уровня фукозилированных и/или делящихся олигосахаридов, ковалентно присоединенных к области Fc, например, путем экспрессии IgG в различных организмах или линиях клеток, созданных или иначе полученных (например, клетки CHO Lee-13 или клетки YB2/0 гибридомы крысы), путем регуляции ферментов, включенных в путь гликозилирования (например, FUT8 [α1,6-фукозилтрансферазы] и/или β1-4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III [GnTIII]), или путем модификации углевода (углеводов) после экспрессии IgG. Термин «созданная гликоформа», как правило, относится к другому углеводу или олигосахариду; таким образом, вариант IgG, например, антитело или гибрид Fc, может содержать созданную гликоформу. В качестве альтернативы, термин «созданная гликоформа» может относиться к варианту IgG, содержащему другой углевод или олигосахарид. Как известно в данной области техники,

паттерны гликозилирования могут зависеть как от последовательности белка (например, присутствия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков гликозилирования, указанных ниже), так и от клетки-хозяина или организма, в котором образуется белок. Конкретные системы экспрессии указаны ниже.

- 5 Гликозилирование пептидов, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, представляют собой последовательности узнавания ферментативного
- 10 присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из данных трипептидных последовательностей в полипептиде создает возможный центр гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из Сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксикаминокислоте, наиболее часто серину или треонину, хотя 5-гидроксипролин
- 15 или 5-гидроксизин также могут быть использованы.

- Добавление центров гликозилирования к антителу удобным способом осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности, таким образом чтобы она содержала одну или несколько вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных центров гликозилирования). Указанное изменение также может быть
- 20 осуществлено путем добавления или замены одного или нескольких остатков серина или треонина к исходной последовательности (для O-связанных центров гликозилирования). Для удобства аминокислотную последовательность антитела предпочтительно изменяют посредством изменений на уровне ДНК, в частности путем мутации ДНК, кодирующей целевой полипептид, в предварительно выбранных
- 25 основаниях, таким образом чтобы образовывались кодоны, которые будут транслироваться в необходимые аминокислоты.

- Другой способ увеличения числа углеводных фрагментов антитела представляет собой химическое или ферментативное соединение гликозидов с белком. Данные процедуры обладают преимуществом в том, что они не требуют образования белка в
- 30 клетке-хозяине, которая способна к гликозилированию в отношении N- и O-связанного гликозилирования. В зависимости от используемого способа соединения, сахар (сахара) может быть присоединен к (а) аргинину и гистидину, (б) свободным карбоксильным группам, (с) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или
- 35 гидроксипролина, (е) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Указанные способы описаны в WO 87/05330 и в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, оба из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

- Удаление углеводных фрагментов, присутствующих в исходном антителе, может
- 40 быть осуществлено химически или ферментативно. Для химического дегликозилирования необходимо подвергать белок воздействию соединения, трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Данное воздействие приводит к распаду большинства или всех Сахаров за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), в то время как полипептид остается
- 45 нетронутым. Химическое дегликозилирование описано Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 и Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118: 131, оба из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов в полипептидах может быть осуществлено путем

использования множества эндо- и экzogликозидаз, как описано Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138: 350, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Гликозилирование в возможных центрах гликозилирования может быть предотвращено путем использования соединения, туникамицина, как описано Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 3105, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Туникамицин блокирует образование белок-N-гликозидных связей.

Другой вид ковалентной модификации антитела включает связывание антитела с различными небелковыми полимерами, включая без ограничения различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксиалкилены; способом, описанным, например, в 2005-2006 Каталоге PEG Nektar Therapeutics (доступном на веб-сайте Nektar), патентах США 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Кроме того, как известно в данной области техники, замещения аминокислот могут быть осуществлены в различных положениях в пределах антитела для облегчения добавления полимеров, таких как PEG. См., например, Публикацию США 2005/0114037 A1, которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

Меченые антитела

В некоторых вариантах реализации ковалентная модификация антител согласно настоящему изобретению включает добавление одной или нескольких меток. В некоторых случаях они рассматриваются как гибриды антител. Термин «группа для мечения» означает любую обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах реализации группу для мечения соединяют с антителом посредством спейсерных групп различной длины с уменьшением возможного стерического несоответствия. Различные способы мечения белков известны в данной области техники и они могут быть использованы при осуществлении настоящего изобретения.

В целом, метки относятся к множеству классов в зависимости от анализа, в котором они должны быть обнаружены: а) изотопные метки, которые могут представлять собой радиоактивные или тяжелые изотопы; б) магнитные метки (например, магнитные частицы); в) редокс-активные фрагменты; г) оптические красители; ферментные группы (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза); е) биотинилированные группы; и ф) заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой «молнии», центры связывания для вторичных антител, домены связывания с металлом, эпитопные метки и т.д.). В некоторых вариантах реализации группу для мечения соединяют с антителом посредством спейсерных групп различной длины с уменьшением возможного стерического несоответствия. Различные способы мечения белков известны в данной области техники, и они могут быть использованы при осуществлении настоящего изобретения.

Специфические метки включают оптические красители, включая без ограничения хромофоры, фосфоры и флуорофоры, при этом последние являются специфическими во многих случаях. Флуорофоры могут представлять собой либо флуоресцирующие агенты, представляющие «небольшие молекулы», либо белковые флуоресцирующие агенты.

Термин «флуоресцентная метка» означает любую молекулу, которая может быть обнаружена посредством присущих ей флуоресцентных свойств. Подходящие флуоресцентные метки включают без ограничения флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зелёный, стильбен, Люцифер жёлтый, Cascade Blue, Техасский красный, IAEDANS,

EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon green, красители Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow и R-фикоэритрин (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Родамин и Техасский красный (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в Molecular Probes Handbook Richard P. Haugland, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки,

Подходящие белковые флуоресцентные метки также включают без ограничения зеленый флуоресцентный белок, включая разновидности зеленого флуоресцентного белка Renilla, Ptilosarcus или Aequorea (Chalfie et al., 1994, Science 263: 802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., номер доступа в Genbank U55762), синий флуоресцентный белок (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24: 462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6: 178-182), «усиленный» желтый флуоресцентный белок (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150: 5408-5417), β -галактозидазу (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2603-2607) и Renilla (WO 92/15673, WO 95/07463, WO 98/14605, WO 98/26277, WO 99/49019, Патенты США 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558). Все вышеуказанные источники в данном абзаце явным образом включены в настоящее описание посредством ссылки.

Варианты IgG

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложены варианты белки IgG. Варианты IgG по меньшей мере включают фрагмент антитела, содержащий область CH2-CH3 тяжелой цепи. Кроме того, подходящие варианты IgG включают домены Fc (например, включая низшую шарнирную область), а также варианты IgG, содержащие константную область тяжелой цепи (CH1-шарнир-CH2-CH3), также являющиеся подходящими согласно настоящему изобретению, все из которых могут быть слиты с «партнерами» по слиянию.

Вариант IgG содержит одну или несколько модификаций аминокислот по сравнению с исходным полипептидом IgG, в некоторых случаях по сравнению с IgG дикого типа. Вариант IgG может обладать одним или несколькими оптимизированными свойствами. Вариант IgG отличается по своей аминокислотной последовательности от исходного IgG наличием по меньшей мере одной модификации аминокислот. Таким образом, варианты IgG содержат по меньшей мере одну модификацию аминокислот по сравнению с исходным IgG. В качестве альтернативы, варианты IgG могут содержать несколько модификаций аминокислот по сравнению с исходным IgG, например, от примерно одной до пятидесяти модификаций аминокислот, предпочтительно от примерно одной до десяти модификаций аминокислот и наиболее предпочтительно от примерно одной до примерно пяти модификаций аминокислот по сравнению с исходным IgG.

Таким образом, последовательности вариантов IgG и последовательности исходного полипептида Fc по существу являются гомологичными. Например, варианты последовательности варианта Fc в настоящем описании будут обладать примерно 80% гомологии с вариантной последовательностью исходного IgG, предпочтительно по меньшей мере примерно 90% гомологии и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 95% гомологии. Модификации могут быть получены методами генной инженерии с использованием молекулярной биологии или могут быть получены ферментативно или химически.

Антигены-мишени для антител

В действительности, на любой антиген можно прицельно воздействовать вариантами IgG, включая без ограничения белки, субъединицы, домены, мотивы и/или эпитопы, относящиеся к следующему перечню антигенов-мишеней, который включает как растворимые факторы, такие как цитокины, так и мембраносвязанные факторы, включая трансмембранные рецепторы: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-кето-PGF1a, 8-изо-PGP2a, 8-оксо-dG, Аденозиновый рецептор A1, A33, ACE, ACE-2, Активин, Активин А, Активин АВ, Активин В, Активин С, Активин RIA, Активин RIA ALK-2, Активин RIB ALK-4, Активин RIIA, Активин RUB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, Addressins, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, альфа-1-антитрипсин, альфа-V/бета-1 антагонист, ANG, Ang, APAF-1, APE, API, APP, APRIL, AR, ARC, ART, Артемин, анти-Id, ASPARTIC, предсердный натрийуретический фактор, интегрин av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, стимулятор В-лимфоцитов (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, остеогенин BMP-3, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, Бомбезин, нейтрофический фактор костей, BPDE, BPDE-ДНК, BTC, комплементарный фактор 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, Кальцитонин, цАМФ, карциноэмбриональный антиген (CEA), карциномный антиген, Катепсин А, Катепсин В, Катепсин С/DPPI, Катепсин D, Катепсин Е, Катепсин Н, Катепсин L, Катепсин О, Катепсин S, Катепсин V, Катепсин X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (белки р67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, цГМФ, CINC, ботулинический токсин клостридии (*Clostridium botulinum*), токсин энтеритной клостридии (*Clostridium perfringens*), CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, STACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, опухолеассоциированный антиген цитокератина, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, фактор ускорения распада, des(1-3)-IGF-I (IGF-1 головного мозга), Dhh, дигоксин, DNAM-1, ДНКаза, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), ЕМА, ЕММРIN, ЕНА, эндотелиновый рецептор, Энкефалиназа, eNOS, Eot, эотаксин1, ЕpCAM, Эфрин B2/ EphB4, ЕРО, ERCC, Е-селектин, ET-1, Фактор Ha, Фактор VII, Фактор VIIc, Фактор IX, белок-активатор фибробластов (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, Ферритин, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, Фибрин, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, фолликулостимулирующий гормон, Фракталкин, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (Миостатин), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRA-1, GFR-альфа1, GFR-альфа2, GFR-альфа3, GTR, Глюкагон, Глют 4, гликопротеин IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, фактор, высвобождающий гормон роста, Гаптен (NP-сар или NIP-сар), HB-EGF, HCC, гликопротеин gB оболочки

HCMV, гликопротеин gH оболочки HCMV, HCMV UL, гемопоэтический фактор роста (HGF), Her В gp120, гепараназа, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), гликопротеин gB вируса простого герпеса (HSV), гликопротеин gD HSV, HGFA, высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген (HMW-MAA), HIV gp120, V3 петля gp120 HIV IIIВ, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, кардиальный миозин человека, цитомегаловирус человека (HCMV), гормон роста человека (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, рецептор IgA, IgE, IGF, связывающие белки IGF, IGF-1R, IGFBR, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, интерферон (INF)-альфа, INF-бета, INF-гамма, Ингибин, iNOS, А-цепь инсулина, В-цепь инсулина, инсулиноподобный фактор роста 1, интегрин альфа2, интегрин альфа3, интегрин альфа4, интегрин альфа4/бета, интегрин альфа4/бета7, интегрин альфа5 (альфаV), интегрин альфа5/бета1, интегрин альфа5/бета3, интегрин альфаб, интегрин бета1, интегрин бета2, интерферон гамма, IP-10, I-TAC, JE, Калликреин 2, Калликреин 5, Калликреин б, Калликреин 11, Калликреин 12, Калликреин 14, Калликреин 15, Калликреин L1, Калликреин L2, Калликреин L3, Калликреин L4, KC, KDR, кератиноцитарный фактор роста (KGF), ламинин 5, LAMP, LAP, LAP (TGF- 1), Латентный TGF-1, Латентный TGF-1 bpl, LBP, LDGF, LECT2, Lefty, антиген Льюиса-Y, родственный антиген Льюиса-Y, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, липопроотеины, LIX, LKN, Lptn, L-Селектин, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, сурфактант лёгких, лютеинизирующий гормон, рецептор лимфотоксина-бета, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Мег, металлопротеазы, рецептор MGDF, MGMT, МНС (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-альфа, МК, ММАС1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, муцин (Mud), MUC18, ингибирующее вещество Мюллера, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-Кадгерин, NCA 90, NCAM, NCAM, Неприлизин, Нейротрофин-3, -4 или -6, Нейротурин, фактор роста нервов (NGF), NGFR, NGF-бета, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, pi 50, p95, PADPr, Паратиреоидный гормон, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-Кадгерин, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN. PLA2, плацентарная щелочная фосфатаза (FLAP), P1GF, PLP, PP14, Проинсулин, Прорелаксин, Белок С, PS, PSA, PSCA, простат-специфический мембранный антиген (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, А-цепь Релаксина, В-цепь Релаксина, ренин, респираторно-синцитиальный вирус (RSV) F, RSV Fgp, Ret, Ревматоидные факторы, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, СЕРИИ, Сывороточный альбумин, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (опухоль-ассоциированный гликопротеин-72), TARC, TCA-3, рецепторы Т-клеток (например, рецептор альфа/бета Т-клеток), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, тестикулярная PLAP-подобная щелочная фосфатаза, TfR, TGF, TGF-альфа, TGF-бета, полиспецифический TGF-бета, TGF-бета RI (ALK-5), TGF-бета RII, TGF-бета RIIf, TGF-бета RIIf, TGF-бета, TGF-бета2, TGF-бета3, TCP-бета4, TGF-бета3, Тромбин, Тимусный Ck-1, Тиреостимулирующий гормон, Tie, TIMP, TIQ, Тканевый фактор, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-альфа, TNF-альфа бета, TNF-бета2, TNFc, TNF-RI, TNF-II, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUND), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14

(HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (TRAIL Apo-2 Лиганд, TL2), TNFSF11 (TRANCE/RANK Лиганд ODF. OPG Лиганд), TNFSF12 (TWEAK Apo-3 Лиганд, DR3 Лиганд), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (LIGHT HVEM Лиганд, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (GITR Лиганд AITR Лиганд, TL6), TNFSF1A (TNF-a Conectin, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (OX40 Лиганд gp34, TXGP1), TNFSF5 (CD40 Лиганд CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (Fas Лиганд Apo-1 Лиганд, APT1 Лиганд), TNFSF7 (CD27 Лиганд CD70), TNFSF8 (CD30 Лиганд CD 153), TNFSF9 (4-1BB Лиганд CD137 Лиганд), TP-1, t-PA, Тро, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, рецептор трансферрина, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, опухолеассоциированный антиген CA 125, опухолеассоциированный антиген, экспрессирующий родственный Льюс-У углевод, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, Урокиназа, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-Кадгерин, VE-кадгерин-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, Вирусные антигены, VLA, VLA-1, VLA-4, интегрин VNR, фактор фон Виллебранда, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD и рецепторы гормонов и факторов роста.

Для специалиста в данной области техники очевидно, что вышеуказанный перечень мишеней относится не только к конкретным белкам и биомолекулам, но и к биохимическому пути или путям, включающим их. Например, при ссылке на CTLA-4 как на антиген-мишень предполагают, что лиганды и рецепторы, которые составляют ко-стимулирующий путь Т-клеток, включая CTLA-4, B7-1, B7-2, CD28 и любые другие неисследованные лиганды или рецепторы, связывающиеся с данными белками, также представляют собой мишени. Таким образом, в настоящем описании термин «мишень» относится не только к конкретной биомолекуле, но и к набору белков, взаимодействующих с указанной мишенью и к участникам биохимического пути, к которому относится указанная мишень. Для специалиста в данной области техники также очевидно, что любой их вышеуказанных антигенов-мишеней, лигандов или рецепторов, которые с ними связываются, или других участников соответствующего биохимического пути может быть функционально связан с вариантами Fc согласно настоящему изобретению с образованием гибрида Fc. Таким образом, например, гибрид Fc, прицельно воздействующий на EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), может быть создан путем функционального связывания варианта Fc с EGF, TGF-b или любым другим лигандом, исследованным или неисследованным, который связывается с EGFR. Соответственно, вариант Fc согласно настоящему изобретению может быть функционально связан с EGFR с образованием гибрида Fc, связывающегося с EGF, TGF-b или любым другим лигандом, исследованным или неисследованным, который связывается с EGFR. Таким образом, в действительности любой полипептид, как лиганд, рецептор, так и некоторый другой белок или домен белка, включая без ограничения вышеуказанные мишени и белки, составляющие соответствующие биохимические пути, могут быть функционально связаны с вариантами Fc согласно настоящему изобретению

с образованием гибрида Fc.

Выбор подходящего антигена зависит от необходимого применения. Для противоракового лечения необходима мишень, экспрессия которой ограничена раковыми клетками. Некоторые мишени, которые как доказано особенно поддаются терапии антителами, представляют собой мишени, обладающие сигнальными функциями. Другие терапевтические антитела оказывают свое действие путем блокирования передачи сигнала рецептором посредством ингибирования связывания между рецептором и родственным ему лигандом. Другой механизм действия терапевтических антител заключается в том, что они вызывают понижающую (отрицательную) регуляцию рецептора. Другие антитела действуют не путем передачи сигнала посредством их антигена-мишени. В некоторых случаях используют антитела, направленные против возбудителей инфекционных заболеваний.

В одном из вариантов реализации варианты Fc согласно настоящему изобретению включены в антитело к цитокину. В качестве альтернативы, варианты Fc подвергают слиянию или конъюгируют с цитокином. В настоящем описании термин «цитокин» представляет собой общий термин для белков, высвобождаемых одной клеточной популяцией, которые действуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Например, как описано в Penichet et al., 2001, J Immunol Methods 248: 91-101, который явным образом включен в настоящее описание посредством ссылки, цитокины могут быть соединены с антителом с получением ряда необходимых свойств. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и обычные полипептидные гормоны. Цитокины включают гормон роста такой, как гормон роста человека; N-метионил гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин, инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреостимулирующий гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); печеночный фактор роста; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор-альфа и -бета некроза опухолей; ингибирующее вещество Мюллера; гонадотропин-ассоциированный пептид мыши; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбопоэтин (ТРО); факторы роста нервов, такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF) такие, как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF) и гранулоцитарный-CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1альфа, IL-2, IL-g, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; фактор некроза опухолей, такой как TNF-альфа или TNF-бета; C5a; и другие полипептидные факторы, включая LIF и kit-лиганд (KL). В настоящем описании термин «цитокин» включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты цитокинов, содержащих нативные последовательности.

Цитокины и растворимые мишени, такие как члены суперсемейства TNF, представляют собой предпочтительные мишени для использования совместно с вариантами согласно настоящему изобретению. Например, антитела анти-VEGF, анти-CTLA-4 и анти-TNF или фрагменты указанных антител представляют собой антитела, которые особенно подходят для использования вариантов Fc, увеличивающих связывание FcRn. Лекарственные средства против данных мишеней часто используют в лечении аутоиммунных заболеваний, при этом необходимы многочисленные инъекции

в течение длительных периодов времени. Следовательно, более продолжительное время полужизни в сыворотке и менее частые курсы лечения, обусловленные вариантами согласно настоящему изобретению, являются наиболее предпочтительными.

Варианты Fc согласно настоящему изобретению могут быть полезны для ряда антител и гибридов Fc, разрешенных для применения, в клинических исследованиях или в разработке. В настоящем описании указанные антитела и гибриды Fc называются «клиническими продуктами и кандидатами». Таким образом, в предпочтительном варианте реализации полипептиды Fc согласно настоящему изобретению могут найти применение в ряде клинических продуктов и кандидатов. Например, полипептиды Fc согласно настоящему изобретению могут быть полезны для ряда антител, прицельно воздействующих на CD20. Например, полипептиды Fc согласно настоящему изобретению могут найти применение в антителе, которое по существу сходно с ритуксимабом (Ритуксан®, IDEC/Genentech/Roche) (см., например US 5736137), химерном антителом анти-СВ20, разрешенным для лечения неходжкинской лимфомы; HuMax-CD20, анти-CD20, разрабатываемом в настоящее время Genmab, антителе анти-СП20, описанным в US 5500362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel) и PR070769 (PCT/US2003/040426, под названием "Immunoglobulin Variants and Uses Thereof"). Полипептиды Fc согласно настоящему изобретению могут быть полезны для ряда антител, прицельно воздействующих на членов семейства рецепторов эпидермального фактора роста, включая EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4). Например, полипептиды Fc согласно настоящему изобретению могут найти применение в антителе, которое по существу сходно с трастузумабом (trastuzumab) (Герцептин® (Herceptin®), Genentech) (см., например, US 5677171), гуманизированном антителом анти-Her2/neu, разрешенным для лечения рака груди; пертузумабе (pertuzumab) (rhuMab-2C4, Omnitarg™), разрабатываемом в настоящее время Genmab; антителе анти-Her2, описанным в US 4753894; цетуксимабе (cetuximab) (Эрбитукс® (Erbix®), Imclone) (US 4943533; PCT WO 96/40210), химерном антителе анти-EGFR в клинических исследованиях для множества раковых опухолей, ABX-EGF (US 6235883), разрабатываемом в настоящее время Abgenix-Immunex-Amgen; HuMax-EGFr (USSN 10/172317), разрабатываемом в настоящее время Genmab; 425, EMD55900, EMD62000 и EMD72000 (Merck KGaA) (US 5558864; Murthy et al. 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2): 549-60; Rodeck et al., 1987, J Cell Biochem. 35(4): 315-20; Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4(7): 773-83); ICR62 (Институт исследования рака (Institute of Cancer Research)) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi et al., 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3): 129-46; Modjtahedi et al., 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2): 247-53; Modjtahedi et al, 1996, Br J Cancer, 73(2): 228-35; Modjtahedi et al, 2003, Int J Cancer, 105(2): 273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canada and Centre de Immunologia Molecular, Cuba (US 5891996; US 6506883; Mateo et al, 1997, Immunotechnology, 3(1): 71-81); mAb-806 (Институт исследования рака Людвига, Мемориальный центр Слоуна-Кеттеринга (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering)) (Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci U S A. 100(2): 639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, Национальный институт рака (National Cancer Institute)) (PCT WO 0162931A2); и SC100 (Scancell) (PCT WO 01/88138). В другом предпочтительном варианте реализации полипептиды Fc согласно настоящему изобретению могут найти применение в алемтузумабе (Кэмпас® (Campath®), Millenium), гуманизированном моноклональном антителе, в настоящее время разрешенном для лечения В-клеточного хронического лимфолейкоза. Полипептиды Fc согласно настоящему изобретению могут найти применение во множестве антител или гибридов Fc, которые по существу сходны с другими клиническими продуктами и кандидатами, включая без ограничения

муромонаб-CD3 (muromonab-CD3) (Orthoclone OKT3®), антитело анти-CD3, разработанное Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ибритумомаб тиуксетан (Зевалин®) (ibritumomab tiuxetan, Zevalin®), антитело анти-CD20, разработанное IDEC/Schering AG, гемтузумаб озогамидин (Милотарг®) (gemtuzumab ozogamicin, Mylotarg®), антитело
 5 анти-CD33 (белок p67), разработанное Celltech/Wyeth, алефацепт (Амевив®) (alefacept, Amevive®), гибрид Fc анти-LFA-3, разработанный Biogen, абциксимаб (РеоПро®) (abciximab, ReoPro®), разработанный Centocor/Lilly, базиликсимаб (Симулект®) (basiliximab, Simulect®), разработанный Novartis, паливизумаб (Синагис®) (palivizumab, Synagis®), разработанный Medbmmune, инфликсимаб (Ремикейд®) (infliximab, Remicade®),
 10 антитело анти-ТМРальфа, разработанное Centocor, адалимумаб (Хумира®) (adalimumab, Humira®), антитело анти-ТМРальфа, разработанное Abbott, Humicade™, антитело анти-ТМРальфа, разработанное Celltech, этанерцепт (Энбрел®) (etanercept, Enbrel®), гибрид Fc анти-ТМРальфа, разработанный Immunex/Amgen, АВХ-CBL, антитело анти-CD147, разрабатываемое Abgenix, АВХ-IL8, антитело анти-IL8, разрабатываемое Abgenix, АВХ-
 15 МА1, антитело анти-МиС18, разрабатываемое Abgenix, Пемтумомаб (Pemtumomab) (R1549, 90Y-muHMFGI), анти-MUC1, разрабатываемое Antisoma, Therex (R1550), антитело анти-MUC1, разрабатываемое Antisoma, AngioMab (AS 1405), разрабатываемый Antisoma, HuBC-1, разрабатываемый Antisoma, Тиоплатин (Thioplatin) (AS 1407), разрабатываемый Antisoma, Antegren® (натализумаб) (Антегрэн®, natalizumab), антитело анти-альфа-4-
 20 бета-1 (VLA-4) и альфа-4-бета-7, разрабатываемое Biogen, VLA-1 mAb, антитело анти-VLA-1 интегрин, разрабатываемое Biogen, LTBR mAb, антитело анти-лимфотоксин бета рецептор (LTBR), разрабатываемое Biogen, CAT-152, антитело анти-TCP-p2, разрабатываемое Cambridge Antibody Technology, J695, антитело анти-IL-12, разрабатываемое Cambridge Antibody Technology и Abbott, CAT-192, антитело анти-TGFp1,
 25 разрабатываемое Cambridge Antibody Technology и Genzyme, CAT-213, антитело анти-Eotaxin1, разрабатываемое Cambridge Antibody Technology, антитело анти-Blys LymphoStat-B™, разрабатываемое Cambridge Antibody Technology и Human Genome Sciences Inc., TRAIL-R1mAb, антитело анти-TRAIL-R1, разрабатываемое Cambridge Antibody Technology и Human Genome Sciences, Inc., Авастин™ (бевацизумаб) (Avastin™, bevacizumab, rhuMAB-
 30 VEGF), антитело анти-VEGF, разрабатываемое Genentech, антитело семейства анти-HER рецептора, разрабатываемое Genentech, Анти-тканевый фактор (ATF), антитело анти-тканевый фактор, разрабатываемое Genentech, Ксолар™ (Омализумаб) (Xolair™, Omalizumab), антитело анти-IgE, разрабатываемое Genentech, Раптив™ (Эфализумаб) (Raptiva™, Efalizumab), антитело анти-CD11a, разрабатываемое Genentech и Хота, антитело
 35 MLN-02 (ранее LDP-02), разрабатываемое Genentech and Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, антитело анти-CD4, разрабатываемое Genmab, HuMax-IL15, антитело анти-IL15, разрабатываемое Genmab и Amgen, HuMax-Inflam, разрабатываемый Genmab и Medarex, HuMax-Cancer, антитело анти-гепараназа I, разрабатываемое Genmab и Medarex и Oxford GcoSciences, HuMax-Lymphoma, разрабатываемый Genmab и Amgen, HuMax-TAC, разрабатываемый Genmab, IDEC-131 и антитело анти-CD40L, разрабатываемое IDEC
 40 Pharmaceuticals, IDEC-151 (Кленоликсимаб (Clenoliximab)), антитело анти-CD4, разрабатываемое IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, антитело анти-CD80, разрабатываемое IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, анти-CD23, разрабатываемое IDEC Pharmaceuticals, антитела к фактору миграции макрофагов (MIF), разрабатываемые IDEC Pharmaceuticals, BEC2, антиидиотипическое антитело, разрабатываемое Imclone, IMC-1C11, антитело
 45 анти-KDR разрабатываемое Imclone, DC 101, антитело анти-flk-1, разрабатываемое Imclone, антитела анти-VE кадгерин, разрабатываемые Imclone, CEA-Cide™ (лабетузумаб (labetuzumab)), антитело к карциноэмбриональному антигену (CEA), разрабатываемое

Immunomedics, LymphoCide™ (Эпратузумаб (Epratuzumab)), антитело анти-CD22, разрабатываемое Immunomedics, AFP-Cide, разрабатываемый Immunomedics, MyelomaCide, разрабатываемый Immunomedics, LkoCide, разрабатываемый Immunomedics, ProstaCide, разрабатываемый Immunomedics, MDX-010, антитело анти-CTLA4, разрабатываемое Medarex, MDX-060, антитело анти-CD30, разрабатываемое Medarex, MDX-070, разрабатываемый Medarex, MDX-018, разрабатываемый Medarex, Osidem™ (IDM-1) и антитело анти-Her2, разрабатываемое Medarex и Immune-Designed Molecules, HuMax™-CD4, антитело анти-CD4, разрабатываемое Medarex и Genmab, HuMax-IL15, антитело анти-IL15, разрабатываемое Medarex и Genmab, CNTO 148, антитело анти-TNF α , разрабатываемое Medarex и Centocor/J&J, CNTO 1275, антитело анти-цитокин, разрабатываемое Centocor/J&J, MOR101 и MOR102, антитела (CD54) к молекулам межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), разрабатываемые MorphoSys, MOR201, антитело к рецептору фактора роста фибробластов 3 (FGFR-3), разрабатываемое MorphoSys, Нувиион® (визилизумаб) (Nuvion®, visilizumab), антитело анти-CD3, разрабатываемое Protein Design Labs, HuZAF™, антитело анти-гамма интерферон, разрабатываемое Protein Design Labs, Анти- $\alpha 5\beta 1$ Интегрин, разрабатываемый Protein Design Labs, анти-IL-12, разрабатываемое Protein Design Labs, ING-1, антитело анти-Ep-CAM, разрабатываемое Хота, и MLN01, антитело анти-Бета2 интегрин, разрабатываемое Хота; все вышеуказанные источники в данном абзаце явным образом включены в настоящее описание посредством ссылки.

Полипептиды Fc согласно настоящему изобретению могут быть включены в вышеуказанные клинические кандидаты и продукты или антитела и гибриды Fc, по существу сходные с ними. Полипептиды Fc согласно настоящему изобретению могут быть включены в варианты вышеуказанных клинических кандидатов и продуктов, гуманизированные, подвергнутые созреванию аффинности, созданные или модифицированные каким-либо другим способом.

В одном из вариантов реализации Полипептиды Fc согласно настоящему изобретению используют для лечения аутоиммунных симптомов, симптомов воспаления или при трансплантации. Антигены-мишени и клинические продукты, и кандидаты, подходящие для лечения указанных заболеваний, включают без ограничения антитела анти- $\alpha 4\beta 7$ интегрин, такие как LDP-02, антитела анти-бета2 интегрин, такие как LDP-01, антитела анти-комплемент (C5), такие как 5G1.1, антитела анти-CD2, такие как BTI-322, MEDI-507, антитела анти-CD3, такие как OKT3, SMART анти-CD3, антитела анти-CD4, такие как IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A, антитела анти-CD11a, антитела анти-CD11, такие как IC14, антитела анти-CD18, антитела анти-CD23, такие как IDEC 152, антитела анти-CD25, такие как Zenарax, антитела анти-CD40L, такие как 5c8, Antova, IDEC-131, антитела анти-CD64, такие как MDX-33, антитела анти-CD80, такие как IDEC-114, антитела анти-CD147, такие как ABX-CBL, антитела анти-E-селектин, такие как CDP850, антитела анти-gpIIb/IIIa, такие как РеоПро/Абциксимаб, антитела анти-ICAM-3, такие как ICM3, антитела анти-ICE, такие как VX-740, антитела анти-FcR1, такие как MDX-33, антитела анти-IgE, такие как rhuMab-E25, антитела анти-IL-4, такие как SB-240683, антитела анти-IL-5, такие как SB-240563, SCH55700, антитела анти-IL-8, такие как ABX-IL8, антитела анти-интерферон гамма, антитела анти-TNF (TNF, TNF α , TNF β , TNF-альфа), такие как CDP571, CDP870, D2E7, Инфликсимаб, MAK-195F и антитела анти-VLA-4, такие как Антегрин (Antegren).

Варианты Fc согласно настоящему изобретению, такие как варианты, обладающие увеличенным связыванием с FcRn, могут быть использованы в молекулах ингибиторов TNF с получением улучшенных свойств. Подходящие молекулы ингибиторов TNF

включают любую молекулу, ингибирующую действие TNF-альфа у млекопитающего. Подходящие варианты включают гибрид Fc Энбрел® (этанерцепт) и антитела Хумира® (адалимумаб) и Ремикейд® (инфликсимаб). Моноклональные антитела (такие как Ремикейд и Хумира), созданные с использованием вариантов Fc согласно настоящему изобретению с увеличением связывания FcFn, могут приводить к большей эффективности посредством увеличенного времени полужизни.

В некоторых вариантах реализации используют антитела к инфекционным заболеваниям. Антитела к эукариотическим клеткам включают антитела, прицельно воздействующие на дрожжевые клетки, включая без ограничения *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis* и *K. lactis*, *Pichia guilliermondii* и *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Plasmodium falciparum* и *Yarrowia lipolytica*.

Также подходят антитела к клеткам грибов, включая антигены-мишени, связанные со штаммами *Candida*, включая среди прочих *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* и *C. maltosa*, а также разновидности *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces* и *Penicillium*.

Антитела, направленные против антигенов-мишеней, связанных с простейшими, включают без ограничения антитела, связанные с *Trypanosoma*, разновидностями *Leishmania*, включая *Leishmania donovani*, *Plasmodium* spp., *Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* и *Cyclospora cayentanensis*.

Также подходят антитела к прокариотическим антигенам, включая антитела к подходящим бактериям, таким как патогенные и непатогенные прокариоты, включая без ограничения Бациллу, включая *Bacillus anthracis*; Вибрион, например, *V. cholerae*; Эшерихию, например, Энтеротоксигенная *E. coli*, Шигеллы, например, *S. dysenteriae*; Сальмонеллу, например, *S. typhi*; Микробактерии, например, *M. tuberculosis*, *M. leprae*; Клостридий, например, *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. difficile*, *C. perfringens*; Коринебактерии, например, *C. diphtheriae*; Стрептококк, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*; Стафилококк, например, *S. aureus*; Гемофильные бактерии, например, *H. influenzae*; Нейссерии, например, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*; Иерсинии, например, *Y. lamblia*, *Y. pestis*, палочки *Pseudomonas*, например, *P. aeruginosa*, *P. putida*; Хламидию, например, *C. trachomatis*; Бордетеллы, например, *B. pertussis*; Трепонему, например, *T. palladium*; *B. anthracis*, *Y. pestis*, *Brucella* spp., *F. tularensis*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *C. botulinum*, *Salmonella* spp., SEB *V. cholerae* toxin B, *E. coli* O157:H7, *Listeria* spp., *Trichosporon beigelii*, *Rhodotorula* species, *Hansenula anomala*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Listeria* sp., *Mycoplasma* sp. и т.п.

Согласно некоторым аспектам, антитела направлены против вирусных инфекций; данные вирусы включают без ограничения ортомиксовирусы (например, вирус гриппа), парамиксовирусы (например, респираторно-синцитиальный вирус, вирус свинки, вирус кори), аденовирусы, риновирусы, коронавирусы, реовирусы, тогавирусы (например, вирус краснухи), парвовирусы, поксвирусы (например, вирус натуральной оспы, вирус осповакцины), энтеровирусы (например, полиовирус, вирус Коксаки), вирусы гепатита (включая А, В и С), герпесвирусы (например, вирус простого герпеса, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр), ротавирусы, норовирусы, хантавирусы, аренавирусы, рабдовирусы (например, вирус бешенства), ретровирусы (включая ВИЧ, HTLV-I и -II), паповавирусы (например, папилломавирусы), полиомавирусы и пикорнавирусы и т.п.

Оптимизированные свойства вариантов IgG

Согласно настоящей заявке также предложены варианты IgG, оптимизированные для множества терапевтически важных свойств. В настоящем описании вариант IgG,

который создают или предполагают для демонстрации одного или нескольких оптимизированных свойств, называется «оптимизированным вариантом IgG». Наиболее предпочтительные свойства, которые могут быть оптимизированы, включают без ограничения повышенную или пониженную аффинность к FcRn и увеличенное или уменьшенное время полужизни *in vivo*. Подходящие варианты реализации включают антитела, демонстрирующие повышенную аффинность к связыванию с FcRn при пониженном pH, таком как pH, связанный с эндосомами, например, pH 6.0, в то же время поддерживающие пониженную аффинность при более высоком значении pH, таком как 7.4, чтобы допустить увеличенное поглощение эндосомами, но обычные скорости высвобождения. Аналогичным образом данные антитела с модулированным связыванием FcRn могут обладать другими необходимыми свойствами, такими как модулированное связывание FcγR, как например указано в U.S.S.N.s U.S.S.N.s 11/174287, 11/124640, 10/822231, 10/672280, 10/379392 и заявке на патент 11/256060 под названием «Варианты иммуноглобулина IgG, обладающие оптимизированной эффекторной функцией», поданной 21 октября 2005. Т.е. оптимизированные свойства также включают без ограничения повышенную или пониженную аффинность к FcγR. В одном из возможных вариантов реализации варианты IgG оптимизируют, в результате чего они обладают повышенной аффинностью к активирующему FcγR человека, предпочтительно FcγRIIIa, помимо характеристики связывания FcRn. В еще одном возможном альтернативном варианте реализации варианты IgG оптимизируют, в результате чего они обладают пониженной аффинностью к ингибирующему рецептору FcγRIIb человека. Т.е. конкретные варианты реализации включают использование антител, демонстрирующих увеличенное связывание с FcRn и увеличенное связывание с FcγRIIIa. В других вариантах реализации используют антитела, демонстрирующие увеличенное связывание с FcRn и увеличенное связывание с FcγRIIIa. Предполагают, что согласно указанным вариантам реализации предложены полипептиды IgG, обладающие улучшенными терапевтическими свойствами у людей, например, усиленной эффекторной функцией и более высокой противораковой активностью. В альтернативном варианте реализации варианты IgG оптимизируют, в результате чего они обладают повышенной или пониженной аффинностью к FcRn и повышенной или пониженной аффинностью к FcγR человека, включая без ограничения FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa и FcγRIIIb, включая их аллельные варианты. Предполагают, что согласно данным вариантам реализации предложены полипептиды IgG, обладающие улучшенными терапевтическими свойствами у людей, например, увеличенным временем полужизни и пониженной эффекторной функцией. В других вариантах реализации варианты IgG обеспечивают повышенную аффинность к FcRn и повышенную аффинность к одному или нескольким FcγR, но пониженную аффинность к одному или нескольким другим FcγR. Например, вариант IgG может обладать увеличенным связыванием с FcRn и FcγRIIIa, но уменьшенным связыванием с FcγRIIb. В качестве альтернативы, вариант IgG может обладать уменьшенным связыванием с FcRn и FcγR's. В другом варианте реализации вариант IgG может обладать пониженной аффинностью к FcRn и повышенной аффинностью к FcγRIIb, но пониженной аффинностью к одному или нескольким FcγR. В еще одном варианте реализации вариант IgG может обладать увеличенным временем полужизни и пониженными эффекторными функциями.

Предпочтительные варианты реализации включают оптимизацию связывания с FcRn и FcγR человека, однако в альтернативных вариантах реализации варианты IgG обладают повышенной или пониженной аффинностью к FcRn и FcγR не относящихся к человеку организмов, включая без ограничения грызунов и низших приматов.

Варианты IgG, которые оптимизируют для связывания с FcRn не человеческого происхождения, могут найти применение в проведении исследований. Например, доступны модели мышей для множества заболеваний, позволяющие тестировать свойства, такие как эффективность, токсичность и фармакокинетические характеристики для указанного потенциального лекарственного средства. Как известно в данной области техники, раковые клетки могут быть трансплантированы или введены путем инъекции мышам для имитации рака человека, способ под названием «ксенотрансплантация». В результате тестирования вариантов IgG, включающих варианты IgG, оптимизированные в отношении FcRn, моно получить полезную информацию относительно характеристик клиренса белка, его механизма клиренса и т.п. Варианты IgG также могут быть оптимизированы в отношении увеличенной функциональности и/или свойств раствора в дегликозилированной форме. Лиганды Fc включают без ограничения FcRn, FcγRs, C1q и белки A и G, и могут происходить из любого источника, включая без ограничения человека, мышь, крысу, кролика или обезьяну, предпочтительно человека. В альтернативном предпочтительном варианте реализации варианты IgG оптимизируют, в результате чего они становятся более стабильными и/или более растворимыми по сравнению с дегликозилированной формой исходного варианта IgG

Варианты IgG могут содержать модификации, модулирующие взаимодействие с лигандами Fc, кроме FcRn и FcγRs, включая без ограничения белки комплемента и гомологи рецептора Fc (FcRHs). FcRHs включают без ограничения FcRH1, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5 и FcRH6 (Davis et al., 2002, Immunol. Reviews 190: 123-136, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки).

Предпочтительно специфичность варианта IgG к лиганду Fc будет определять его терапевтическую полезность. Полезность указанного варианта IgG для терапевтических целей будет зависеть от эпитопа и формы антигена-мишени, и заболевания или симптома, подвергаемого лечению. Для большинства мишеней и симптомов увеличенное связывание FcRn может являться предпочтительным, т.к. увеличенное связывание FcRn может приводить к увеличенному времени полужизни в сыворотке. Более продолжительное время полужизни в сыворотке позволяет менее часто или в более низкой дозе вводить лекарственное средство. Это является наиболее предпочтительным, когда лечебное средство вводят в ответ на симптом, требующий повторного введения. Для некоторых мишеней и симптомов уменьшенное связывание FcRn может являться предпочтительным. Это может являться наиболее предпочтительным, когда необходим вариант Fc с увеличенным клиренсом и уменьшенным временем полужизни в сыворотке, например, в полипептидах Fc, используемых в качестве радиофармацевтических средств или радиотерапевтических средств.

Могут быть использованы варианты IgG, включающие варианты IgG, обеспечивающие повышенную аффинность к FcRn с повышенными активирующими FcγRs, и/или пониженную аффинность к ингибиторным FcγRs. Для некоторых мишеней и симптомов также может являться полезным использование вариантов IgG, обеспечивающих дифференцированную селективность в отношении различных активирующих FcγRs; например, в некоторых случаях может быть необходимо увеличенное связывание с FcγRIIa и FcγRIIIa, но не с FcγRI, тогда как в других случаях увеличенное связывание только с FcγRIIa может являться предпочтительным. Для некоторых мишеней и симптомов может быть предпочтительным использование вариантов IgG, изменяющих связывание FcRn и усиливающих как FcγR-опосредуемые, так и комплемент-опосредуемые эффекторные функции, тогда как в других случаях

может являться полезным использование вариантов IgG, увеличивающих связывание FcRn или время полужизни в сыворотке и либо FcγR-опосредуемые, либо комплемент-опосредуемые эффекторные функции. Для некоторых мишеней или симптомов рака может являться полезным ослабление или удаление одной или нескольких эффекторных функций, например путем 'выключения' связывания с C1q, одним или несколькими FcγR, FcRn или одними или несколькими другими лигандами Fc. Для других мишеней и симптомов может быть предпочтительным использование вариантов IgG, обеспечивающих увеличенное связывание с ингибирующим FcγRIIb, но уровня дикого типа, уменьшенное или удаленное связывание с активирующим FcγRs. В частности, это может являться подходящим, например, в случае, когда задача варианта IgG заключается в ингибировании воспаления или аутоиммунного заболевания или модулировании иммунной системы некоторым образом. Т.к. аутоиммунные заболевания в целом являются продолжительными и лечение осуществляют с повторными введениями доз, их лечение вариантами Fc, обладающими увеличенным временем полужизни, благодаря увеличенному FcRn, является наиболее предпочтительным.

Может быть осуществлена модификация для улучшения стабильности, растворимости, функции или клинического применения IgG. В предпочтительном варианте реализации варианты IgG могут содержать модификации для снижения иммуногенности у людей. В наиболее предпочтительном варианте реализации иммуногенность варианта IgG снижают с применением способа, описанного в USSN 11/004590, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. В альтернативных вариантах реализации варианты IgG гуманизируют (dark, 2000, Immunol Today 21: 397-402, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки).

Варианты IgG могут содержать модификации, снижающие иммуногенность. Модификации для снижения иммуногенности могут включать модификации, уменьшающие связывание обработанных полипептидов, полученных из исходной последовательности, с белками МНС. Например, модификации аминокислот могут быть осуществлены таким образом, чтобы не было или было минимальное количество иммунных эпитопов, которые как предполагают, связываются с высокой аффинностью с любыми преобладающими аллелями МНС. Некоторые способы идентификации связывающихся с МНС эпитопов в последовательностях белков известны в данной области техники и могут быть использованы для подсчета эпитопов в варианте IgG. См., например, WO 98/52976; WO 02/079232; WO 00/3317; USSN 09/903,378; USSN 10/039,170; USSN 60/222,697; USSN 10/754,296; PCT WO 01/21823; и PCT WO 02/00165; Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432-439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: 942-948; Sturniolo et al., 1999, Nature Biotech. 17: 555-561; WO 98/59244; WO 02/069232; WO 02/77187; Marshall et al., 1995, J. Immunol. 154: 5927-5933; и Hammer et al., 1994, J. Exp. Med. 180: 2353-2358, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Основанная на последовательностях информация может быть использована для определения результата связывания для взаимодействия указанный пептид-МНС (см., например, Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432-439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: p942-948; Sturniolo et. al., 1999, Nature Biotech. 17: 555-561, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки).

Создание вариантов IgG

Варианты согласно настоящему изобретению могут быть получены различными способами. Варианты, указанные в настоящем описании, могут представлять собой встраивания, делеции, замещения, другие модификации или комбинации этих и других изменений. В частности, новым вариантом реализации настоящего изобретения является

создание встраиваний и делеций, которые либо увеличивают, либо уменьшают связывание полипептида Fc с лигандом Fc. Как указано в настоящем описании, могут быть осуществлены встраивания или делеции, которые повышают или понижают аффинность полипептида Fc к FcRn. Встраивания и делеции могут быть получены с помощью рациональных подходов или подходов, включающих использование случайных компонентов, например произвольное и полупроизвольное создание библиотек или скрининг. В альтернативном варианте реализации описаны замещения, повышающие или понижающие аффинность полипептида Fc к FcRn.

Модификации остова: встраивания и делеции

Вариантные полипептиды Fc могут быть получены путем замещения вариантной аминокислоты в месте исходной аминокислоты в положении в полипептиде Fc. Путем замещения одной или нескольких аминокислот на варианты аминокислоты в полипептиде Fc изменяют боковые цепи в этих положениях. Наиболее подходящие замещения модифицируют свойства Fc путем изменения боковых цепей Fc. Замещенные боковые цепи могут взаимодействовать напрямую или опосредованно с партнером по связыванию Fc, который связан с функцией или свойством Fc. По меньшей мере одно замещение изменяет ковалентную структуру одной или нескольких боковых цепей исходного полипептида Fc.

В качестве альтернативы, могут быть получены варианты полипептиды Fc, меняющие ковалентную структуру остова исходного полипептида Fc. В белках атомы остова представляют собой пептидный азот, альфа-углерод, карбонильный или пептидный углерод и карбонильный кислород. Изменение ковалентной структуры остова предоставляет дополнительные способы изменения свойств полипептидов Fc. Ковалентная структура остова Fc может быть изменена путем добавления атомов в остова, например, путем встраивания одной или нескольких аминокислот, или путем удаления атомов из остова, например путем делеции одной или нескольких аминокислот. Ковалентная структура остова также может быть изменена путем замены индивидуальных атомов остова на другие атомы (Deechongkit et al., J Am Chem Soc. 2004. 126(51): 16762-71, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Как известно в данной области техники и проиллюстрировано в настоящем описании, встраивания или делеции аминокислот в полипептидах Fc могут быть осуществлены путем встраивания или делеции соответствующих нуклеотидов в ДНК, кодирующей указанный полипептид Fc. В качестве альтернативы, как известно в данной области техники, встраивания или делеции аминокислот могут быть осуществлены в ходе синтеза полипептидов Fc.

Создание встраиваний или делеций аминокислот, которые изменяют взаимодействие полипептида Fc с одним или несколькими партнерами по связыванию (например, FcγR1a, FcγR2a, FcγR2b, FcγR3, FcγR4, FcγR5, FcγR6, FcγR7, FcγR8, FcγR9, FcγR10, FcγR11, FcγR12, FcγR13, FcγR14, FcγR15, FcγR16, FcγR17, FcγR18, FcγR19, FcγR20, FcγR21, FcγR22, FcγR23, FcγR24, FcγR25, FcγR26, FcγR27, FcγR28, FcγR29, FcγR30, FcγR31, FcγR32, FcγR33, FcγR34, FcγR35, FcγR36, FcγR37, FcγR38, FcγR39, FcγR40, FcγR41, FcγR42, FcγR43, FcγR44, FcγR45, FcγR46, FcγR47, FcγR48, FcγR49, FcγR50, FcγR51, FcγR52, FcγR53, FcγR54, FcγR55, FcγR56, FcγR57, FcγR58, FcγR59, FcγR60, FcγR61, FcγR62, FcγR63, FcγR64, FcγR65, FcγR66, FcγR67, FcγR68, FcγR69, FcγR70, FcγR71, FcγR72, FcγR73, FcγR74, FcγR75, FcγR76, FcγR77, FcγR78, FcγR79, FcγR80, FcγR81, FcγR82, FcγR83, FcγR84, FcγR85, FcγR86, FcγR87, FcγR88, FcγR89, FcγR90, FcγR91, FcγR92, FcγR93, FcγR94, FcγR95, FcγR96, FcγR97, FcγR98, FcγR99, FcγR100, FcγR101, FcγR102, FcγR103, FcγR104, FcγR105, FcγR106, FcγR107, FcγR108, FcγR109, FcγR110, FcγR111, FcγR112, FcγR113, FcγR114, FcγR115, FcγR116, FcγR117, FcγR118, FcγR119, FcγR120, FcγR121, FcγR122, FcγR123, FcγR124, FcγR125, FcγR126, FcγR127, FcγR128, FcγR129, FcγR130, FcγR131, FcγR132, FcγR133, FcγR134, FcγR135, FcγR136, FcγR137, FcγR138, FcγR139, FcγR140, FcγR141, FcγR142, FcγR143, FcγR144, FcγR145, FcγR146, FcγR147, FcγR148, FcγR149, FcγR150, FcγR151, FcγR152, FcγR153, FcγR154, FcγR155, FcγR156, FcγR157, FcγR158, FcγR159, FcγR160, FcγR161, FcγR162, FcγR163, FcγR164, FcγR165, FcγR166, FcγR167, FcγR168, FcγR169, FcγR170, FcγR171, FcγR172, FcγR173, FcγR174, FcγR175, FcγR176, FcγR177, FcγR178, FcγR179, FcγR180, FcγR181, FcγR182, FcγR183, FcγR184, FcγR185, FcγR186, FcγR187, FcγR188, FcγR189, FcγR190, FcγR191, FcγR192, FcγR193, FcγR194, FcγR195, FcγR196, FcγR197, FcγR198, FcγR199, FcγR200, FcγR201, FcγR202, FcγR203, FcγR204, FcγR205, FcγR206, FcγR207, FcγR208, FcγR209, FcγR210, FcγR211, FcγR212, FcγR213, FcγR214, FcγR215, FcγR216, FcγR217, FcγR218, FcγR219, FcγR220, FcγR221, FcγR222, FcγR223, FcγR224, FcγR225, FcγR226, FcγR227, FcγR228, FcγR229, FcγR230, FcγR231, FcγR232, FcγR233, FcγR234, FcγR235, FcγR236, FcγR237, FcγR238, FcγR239, FcγR240, FcγR241, FcγR242, FcγR243, FcγR244, FcγR245, FcγR246, FcγR247, FcγR248, FcγR249, FcγR250, FcγR251, FcγR252, FcγR253, FcγR254, FcγR255, FcγR256, FcγR257, FcγR258, FcγR259, FcγR260, FcγR261, FcγR262, FcγR263, FcγR264, FcγR265, FcγR266, FcγR267, FcγR268, FcγR269, FcγR270, FcγR271, FcγR272, FcγR273, FcγR274, FcγR275, FcγR276, FcγR277, FcγR278, FcγR279, FcγR280, FcγR281, FcγR282, FcγR283, FcγR284, FcγR285, FcγR286, FcγR287, FcγR288, FcγR289, FcγR290, FcγR291, FcγR292, FcγR293, FcγR294, FcγR295, FcγR296, FcγR297, FcγR298, FcγR299, FcγR300, FcγR301, FcγR302, FcγR303, FcγR304, FcγR305, FcγR306, FcγR307, FcγR308, FcγR309, FcγR310, FcγR311, FcγR312, FcγR313, FcγR314, FcγR315, FcγR316, FcγR317, FcγR318, FcγR319, FcγR320, FcγR321, FcγR322, FcγR323, FcγR324, FcγR325, FcγR326, FcγR327, FcγR328, FcγR329, FcγR330, FcγR331, FcγR332, FcγR333, FcγR334, FcγR335, FcγR336, FcγR337, FcγR338, FcγR339, FcγR340, FcγR341, FcγR342, FcγR343, FcγR344, FcγR345, FcγR346, FcγR347, FcγR348, FcγR349, FcγR350, FcγR351, FcγR352, FcγR353, FcγR354, FcγR355, FcγR356, FcγR357, FcγR358, FcγR359, FcγR360, FcγR361, FcγR362, FcγR363, FcγR364, FcγR365, FcγR366, FcγR367, FcγR368, FcγR369, FcγR370, FcγR371, FcγR372, FcγR373, FcγR374, FcγR375, FcγR376, FcγR377, FcγR378, FcγR379, FcγR380, FcγR381, FcγR382, FcγR383, FcγR384, FcγR385, FcγR386, FcγR387, FcγR388, FcγR389, FcγR390, FcγR391, FcγR392, FcγR393, FcγR394, FcγR395, FcγR396, FcγR397, FcγR398, FcγR399, FcγR400, FcγR401, FcγR402, FcγR403, FcγR404, FcγR405, FcγR406, FcγR407, FcγR408, FcγR409, FcγR410, FcγR411, FcγR412, FcγR413, FcγR414, FcγR415, FcγR416, FcγR417, FcγR418, FcγR419, FcγR420, FcγR421, FcγR422, FcγR423, FcγR424, FcγR425, FcγR426, FcγR427, FcγR428, FcγR429, FcγR430, FcγR431, FcγR432, FcγR433, FcγR434, FcγR435, FcγR436, FcγR437, FcγR438, FcγR439, FcγR440, FcγR441, FcγR442, FcγR443, FcγR444, FcγR445, FcγR446, FcγR447, FcγR448, FcγR449, FcγR450, FcγR451, FcγR452, FcγR453, FcγR454, FcγR455, FcγR456, FcγR457, FcγR458, FcγR459, FcγR460, FcγR461, FcγR462, FcγR463, FcγR464, FcγR465, FcγR466, FcγR467, FcγR468, FcγR469, FcγR470, FcγR471, FcγR472, FcγR473, FcγR474, FcγR475, FcγR476, FcγR477, FcγR478, FcγR479, FcγR480, FcγR481, FcγR482, FcγR483, FcγR484, FcγR485, FcγR486, FcγR487, FcγR488, FcγR489, FcγR490, FcγR491, FcγR492, FcγR493, FcγR494, FcγR495, FcγR496, FcγR497, FcγR498, FcγR499, FcγR500, FcγR501, FcγR502, FcγR503, FcγR504, FcγR505, FcγR506, FcγR507, FcγR508, FcγR509, FcγR510, FcγR511, FcγR512, FcγR513, FcγR514, FcγR515, FcγR516, FcγR517, FcγR518, FcγR519, FcγR520, FcγR521, FcγR522, FcγR523, FcγR524, FcγR525, FcγR526, FcγR527, FcγR528, FcγR529, FcγR530, FcγR531, FcγR532, FcγR533, FcγR534, FcγR535, FcγR536, FcγR537, FcγR538, FcγR539, FcγR540, FcγR541, FcγR542, FcγR543, FcγR544, FcγR545, FcγR546, FcγR547, FcγR548, FcγR549, FcγR550, FcγR551, FcγR552, FcγR553, FcγR554, FcγR555, FcγR556, FcγR557, FcγR558, FcγR559, FcγR560, FcγR561, FcγR562, FcγR563, FcγR564, FcγR565, FcγR566, FcγR567, FcγR568, FcγR569, FcγR570, FcγR571, FcγR572, FcγR573, FcγR574, FcγR575, FcγR576, FcγR577, FcγR578, FcγR579, FcγR580, FcγR581, FcγR582, FcγR583, FcγR584, FcγR585, FcγR586, FcγR587, FcγR588, FcγR589, FcγR590, FcγR591, FcγR592, FcγR593, FcγR594, FcγR595, FcγR596, FcγR597, FcγR598, FcγR599, FcγR600, FcγR601, FcγR602, FcγR603, FcγR604, FcγR605, FcγR606, FcγR607, FcγR608, FcγR609, FcγR610, FcγR611, FcγR612, FcγR613, FcγR614, FcγR615, FcγR616, FcγR617, FcγR618, FcγR619, FcγR620, FcγR621, FcγR622, FcγR623, FcγR624, FcγR625, FcγR626, FcγR627, FcγR628, FcγR629, FcγR630, FcγR631, FcγR632, FcγR633, FcγR634, FcγR635, FcγR636, FcγR637, FcγR638, FcγR639, FcγR640, FcγR641, FcγR642, FcγR643, FcγR644, FcγR645, FcγR646, FcγR647, FcγR648, FcγR649, FcγR650, FcγR651, FcγR652, FcγR653, FcγR654, FcγR655, FcγR656, FcγR657, FcγR658, FcγR659, FcγR660, FcγR661, FcγR662, FcγR663, FcγR664, FcγR665, FcγR666, FcγR667, FcγR668, FcγR669, FcγR670, FcγR671, FcγR672, FcγR673, FcγR674, FcγR675, FcγR676, FcγR677, FcγR678, FcγR679, FcγR680, FcγR681, FcγR682, FcγR683, FcγR684, FcγR685, FcγR686, FcγR687, FcγR688, FcγR689, FcγR690, FcγR691, FcγR692, FcγR693, FcγR694, FcγR695, FcγR696, FcγR697, FcγR698, FcγR699, FcγR700, FcγR701, FcγR702, FcγR703, FcγR704, FcγR705, FcγR706, FcγR707, FcγR708, FcγR709, FcγR710, FcγR711, FcγR712, FcγR713, FcγR714, FcγR715, FcγR716, FcγR717, FcγR718, FcγR719, FcγR720, FcγR721, FcγR722, FcγR723, FcγR724, FcγR725, FcγR726, FcγR727, FcγR728, FcγR729, FcγR730, FcγR731, FcγR732, FcγR733, FcγR734, FcγR735, FcγR736, FcγR737, FcγR738, FcγR739, FcγR740, FcγR741, FcγR742, FcγR743, FcγR744, FcγR745, FcγR746, FcγR747, FcγR748, FcγR749, FcγR750, FcγR751, FcγR752, FcγR753, FcγR754, FcγR755, FcγR756, FcγR757, FcγR758, FcγR759, FcγR760, FcγR761, FcγR762, FcγR763, FcγR764, FcγR765, FcγR766, FcγR767, FcγR768, FcγR769, FcγR770, FcγR771, FcγR772, FcγR773, FcγR774, FcγR775, FcγR776, FcγR777, FcγR778, FcγR779, FcγR780, FcγR781, FcγR782, FcγR783, FcγR784, FcγR785, FcγR786, FcγR787, FcγR788, FcγR789, FcγR790, FcγR791, FcγR792, FcγR793, FcγR794, FcγR795, FcγR796, FcγR797, FcγR798, FcγR799, FcγR800, FcγR801, FcγR802, FcγR803, FcγR804, FcγR805, FcγR806, FcγR807, FcγR808, FcγR809, FcγR810, FcγR811, FcγR812, FcγR813, FcγR814, FcγR815, FcγR816, FcγR817, FcγR818, FcγR819, FcγR820, FcγR821, FcγR822, FcγR823, FcγR824, FcγR825, FcγR826, FcγR827, FcγR828, FcγR829, FcγR830, FcγR831, FcγR832, FcγR833, FcγR834, FcγR835, FcγR836, FcγR837, FcγR838, FcγR839, FcγR840, FcγR841, FcγR842, FcγR843, FcγR844, FcγR845, FcγR846, FcγR847, FcγR848, FcγR849, FcγR850, FcγR851, FcγR852, FcγR853, FcγR854, FcγR855, FcγR856, FcγR857, FcγR858, FcγR859, FcγR860, FcγR861, FcγR862, FcγR863, FcγR864, FcγR865, FcγR866, FcγR867, FcγR868, FcγR869, FcγR870, FcγR871, FcγR872, FcγR873, FcγR874, FcγR875, FcγR876, FcγR877, FcγR878, FcγR879, FcγR880, FcγR881, FcγR882, FcγR883, FcγR884, FcγR885, FcγR886, FcγR887, FcγR888, FcγR889, FcγR890, FcγR891, FcγR892, FcγR893, FcγR894, FcγR895, FcγR896, FcγR897, FcγR898, FcγR899, FcγR900, FcγR901, FcγR902, FcγR903, FcγR904, FcγR905, FcγR906, FcγR907, FcγR908, FcγR909, FcγR910, FcγR911, FcγR912, FcγR913, FcγR914, FcγR915, FcγR916, FcγR917, FcγR918, FcγR919, FcγR920, FcγR921, FcγR922, FcγR923, FcγR924, FcγR925, FcγR926, FcγR927, FcγR928, FcγR929, FcγR930, FcγR931, FcγR932, FcγR933, FcγR934, FcγR935, FcγR936, FcγR937, FcγR938, FcγR939, FcγR940, FcγR941, FcγR942, FcγR943, FcγR944, FcγR945, FcγR946, FcγR947, FcγR948, FcγR949, FcγR950, FcγR951, FcγR952, FcγR953, FcγR954, FcγR955, FcγR956, FcγR957, FcγR958, FcγR959, FcγR960, FcγR961, FcγR962, FcγR963, FcγR964, FcγR965, FcγR966, FcγR967, FcγR968, FcγR969, FcγR970, FcγR971, FcγR972, FcγR973, FcγR974, FcγR975, FcγR976, FcγR977, FcγR978, FcγR979, FcγR980, FcγR981, FcγR982, FcγR983, FcγR984, FcγR985, FcγR986, FcγR987, FcγR988, FcγR989, FcγR990, FcγR991, FcγR992, FcγR993, FcγR994, FcγR995, FcγR996, FcγR997, FcγR998, FcγR999, FcγR1000, FcγR1001, FcγR1002, FcγR1003, FcγR1004, FcγR1005, FcγR1006, FcγR1007, FcγR1008, FcγR1009, FcγR1010, FcγR1011, FcγR1012, FcγR1013, FcγR1014, FcγR1015, FcγR1016, FcγR1017, FcγR1018, FcγR1019, FcγR1020, FcγR1021, FcγR1022, FcγR1023, FcγR1024, FcγR1025, FcγR1026, FcγR1027, FcγR1028, FcγR1029, FcγR1030, FcγR1031, FcγR1032, FcγR1033, FcγR1034, FcγR1035, FcγR1036, FcγR1037, FcγR1038, FcγR1039, FcγR1040, FcγR1041, FcγR1042, FcγR1043, FcγR1044, FcγR1045, FcγR1046, FcγR1047, FcγR1048, FcγR1049, FcγR1050, FcγR1051, FcγR1052, FcγR1053, FcγR1054, FcγR1055, FcγR1056, FcγR1057, FcγR1058, FcγR1059, FcγR1060, FcγR1061, FcγR1062, FcγR1063, FcγR1064, FcγR1065, FcγR1066, FcγR1067, FcγR1068, FcγR1069, FcγR1070, FcγR1071, FcγR1072, FcγR1073, FcγR1074, FcγR1075, FcγR1076, FcγR1077, FcγR1078, FcγR1079, FcγR1080, FcγR1081, FcγR1082, FcγR1083, FcγR1084, FcγR1085, FcγR1086, FcγR1087, FcγR1088, FcγR1089, FcγR1090, FcγR1091, FcγR1092, FcγR1093, FcγR1094, FcγR1095, FcγR1096, FcγR1097, FcγR1098, FcγR1099, FcγR1100, FcγR1101, FcγR1102, FcγR1103, FcγR1104, FcγR1105, FcγR1106, FcγR1107, FcγR1108, FcγR1109, FcγR1110, FcγR1111, FcγR1112, FcγR1113, FcγR1114, FcγR1115, FcγR1116, FcγR1117, FcγR1118, FcγR1119, FcγR1120, FcγR1121, FcγR1122, FcγR1123, FcγR1124, FcγR1125, FcγR1126, FcγR1127, FcγR1128, FcγR1129, FcγR1130, FcγR1131, FcγR1132, FcγR1133, FcγR1134, FcγR1135, FcγR1136, FcγR1137, FcγR1138, FcγR1139, FcγR1140, FcγR1141, FcγR1142, FcγR1143, FcγR1144, FcγR1145, FcγR1146, FcγR1147, FcγR1148, FcγR1149, FcγR1150, FcγR1151, FcγR1152, FcγR1153, FcγR1154, FcγR1155, FcγR1156, FcγR1157, FcγR1158, FcγR1159, FcγR1160, FcγR1161, FcγR1162, FcγR1163, FcγR1164, FcγR1165, FcγR1166, FcγR1167, FcγR1168, FcγR1169, FcγR1170, FcγR1171, FcγR1172, FcγR1173, FcγR1174, FcγR1175, FcγR1176, FcγR1177, FcγR1178, FcγR1179, FcγR1180, FcγR1181, FcγR1182, FcγR1183, FcγR1184, FcγR1185, FcγR1186, FcγR1187, FcγR1188, FcγR1189, FcγR1190, FcγR1191, FcγR1192, FcγR1193, FcγR1194, FcγR1195, FcγR1196, FcγR1197, FcγR1198, FcγR1199, FcγR1200, FcγR1201, FcγR1202, FcγR1203, FcγR1204, FcγR1205, FcγR1206, FcγR1207, FcγR1208, FcγR1209, FcγR1210, FcγR1211, FcγR1212, FcγR1213, FcγR1214, FcγR1215, FcγR1216, FcγR1217, FcγR1218, FcγR1219, FcγR1220, FcγR1221, FcγR1222, FcγR1223, FcγR1224, FcγR1225, FcγR1226, FcγR1227, FcγR1228, FcγR1229, FcγR1230, FcγR1231, FcγR1232, FcγR1233, FcγR1234, FcγR1235, FcγR1236, FcγR1237, FcγR1238, FcγR1239, FcγR1240, FcγR1241, FcγR1242, FcγR1243, FcγR1244, FcγR1245, FcγR1246, FcγR1247, FcγR1248, FcγR1249, FcγR1250, FcγR1251, FcγR1252, FcγR1253, FcγR1254, FcγR1255, FcγR1256, FcγR1257, FcγR1258, FcγR1259, FcγR1260, FcγR1261, FcγR1262, FcγR1263, FcγR1264, FcγR1265, FcγR1266, FcγR1267, FcγR1268, FcγR1269, FcγR1270, FcγR1271, FcγR1272, FcγR1273, FcγR1274, FcγR1275, FcγR1276, FcγR1277, FcγR1278, FcγR1279, FcγR1280, FcγR1281, FcγR1282, FcγR1283, FcγR1284, FcγR1285, FcγR1286, FcγR1287, FcγR1288, FcγR1289, FcγR1290, FcγR1291, FcγR1292, FcγR1293, FcγR1294, FcγR1295, FcγR1296, FcγR1297, FcγR1298, FcγR1299, FcγR1300, FcγR1301, FcγR1302, FcγR1303, FcγR1304, FcγR1305, FcγR1306, FcγR1307, FcγR1308, FcγR1309, FcγR1310, FcγR1311, FcγR1312, FcγR1313, FcγR1314, FcγR1315, FcγR1316, FcγR1317, FcγR1318, FcγR1319, FcγR1320, FcγR1321, FcγR1322, FcγR1323, FcγR1324, FcγR1325, FcγR1326, FcγR1327, FcγR1328, FcγR1329, FcγR1330, FcγR1331, FcγR1332, FcγR1333, FcγR1334, FcγR1335, FcγR1336, FcγR1337, FcγR1338, FcγR1339, FcγR1340, FcγR1341, FcγR1342, FcγR1343, FcγR1344, FcγR1345, FcγR1346, FcγR1347, FcγR1348, FcγR1349, FcγR1350, FcγR1351, FcγR1352, FcγR1353, FcγR1354, FcγR1355, FcγR1356, FcγR1357, FcγR1358, FcγR1359, FcγR1360, FcγR1361, FcγR1362, FcγR1363, FcγR1364, FcγR1365, FcγR1366, FcγR1367, FcγR1368, FcγR1369, FcγR1370, FcγR1371, FcγR1372, FcγR1373, FcγR1374, FcγR1375, FcγR1376, FcγR1377, FcγR1378, FcγR1379, FcγR1380, FcγR1381, FcγR1382, FcγR1383, FcγR1384, FcγR1385, FcγR1386, FcγR1387, FcγR1388, FcγR1389, FcγR1390,

изменения связывания FcRn с полипептидом Fc положения 244-257, 279-284, 307-317, 383-390 и 428-435 представляют собой предпочтительные расположения петель для встраиваний или делеций (нумерация согласно индексу EU Kabat et al., Burmeister et al., 1994, Nature, 372: 379-383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7: 867-877, все полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки). Для изменения связывания Fc-гамма рецептора с полипептидом Fc положения 229-239, 266-273, 294-299 и 324-331 представляют собой предпочтительные расположения петель для встраиваний или делеций (нумерация согласно индексу EU Kabat et al., код в PDB 1E4K.pdb Sondermann et al. Nature. 2000 406: 267, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки). Петли представляют собой области полипептида, не включенные в альфа-спиральную структуру или структуру бета-складчатого слоя. Положения петель представляют собой положения, не включенные ни в альфа-спиральную структуру, ни в структуру бета-складчатого слоя (van Holde, Johnson and Ho. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall, New Jersey 1998, Chapter 1 pp2-67, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Положения петель являются предпочтительными, т.к. атомы остова, как правило, являются более гибкими и с меньшей вероятностью вовлечены в образование водородных связей по сравнению с атомами остова альфа-спиралей и бета-складчатых слоев. Следовательно, удлинение или укорочение петли за счет встраивания или делеций одной или нескольких аминокислот с меньшей вероятностью приводит к значительным, разрушительным изменениям полипептида Fc, включая стабильность, экспрессию или другие трудности.

Встраивания и делеции могут быть использованы для изменения длины полипептида. Например, в областях петли изменение длины петли приводит к измененной гибкости и конформационной энтропии указанной петли. Встраивания в петле в целом увеличат конформационную энтропию петли, которая может быть определена как константа Больцмана, умноженная на натуральный логарифм числа возможных конформаций (van Holde, Johnson and Ho. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall, New Jersey 1998, pp78, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Путем встраивания по меньшей мере одной аминокислоты в полипептид увеличивается общее число конформаций полипептида. Указанные дополнительные конформации могут быть полезны для образования подходящих взаимодействий Fc/партнер по связыванию Fc, т.к. в связывании Fc-связывающего белка может быть использована одна из дополнительных конформаций полипептида Fc. В данном случае встраивание может привести к более сильным взаимодействиям Fc/партнер по связыванию Fc. В случае, если дополнительные конформации не используются в области связывания, указанное встраивание может привести к более слабым взаимодействиям Fc/партнер по связыванию Fc, т.к. дополнительные конформации будут конкурировать с конформацией, способной к связыванию. Аналогичным образом делеция полипептидного сегмента может также привести либо к более сильным, либо к более слабым взаимодействиям Fc/партнер по связыванию Fc. В случае, если делеция сегмента, уменьшающая возможное число конформаций остова, исключает конформацию, способную к связыванию, указанная делеция может привести к более слабым взаимодействиям Fc/партнер по связыванию Fc. В случае, если делеция не исключает конформацию, способную к связыванию, делеция может привести к более сильным взаимодействиям Fc/партнер по связыванию Fc, т.к. указанная делеция может исключить конформации, конкурирующие с конформацией, способной к связыванию.

Встраивания и делеции могут быть использованы для изменения положений и ориентации аминокислот в полипептиде Fc. Т.к. встраивания и делеции вызывают

изменение ковалентной структуры остова, они неизбежно вызывают изменение положений атомов остова. На фиг. 7 сравнены положения остова в некоторых сегментах петли, обозначенных L1-L4, в трех различных остовах. Эталонная структура остова содержит четыре сегмента петли, тогда как остов с делецией не содержит сегмент L1, а сегмент встраивания содержит дополнительный сегмент перед (т.е. N-терминальный), сегментом L1. Делеции и встраивания вызывают наибольшее изменение в структуре остова рядом с участком встраивания или делеции. Путем делеции сегмента, расположенного рядом с N-терминальной областью петли, например сегмента L1, петля укорачивается, и оставшиеся сегменты перемещают свое положение ближе к N-терминалу петли. Это вызывает смещение сегмента L2 к прежнему расположению сегмента L1 и к N-терминалу петли. Данное изменение в положении сегмента L2 по направлению к сегменту L1 может усилить связывание комплекса Fc/партнер по связыванию Fc и является предпочтительным в случае, когда есть предварительная информация о том, что аминокислота или аминокислоты, расположенные в L2, осуществляют подходящие взаимодействия с партнером по связыванию Fc, при расположении в L1. Например, если L2 содержит аланин и тирозин, и замещение двух аминокислот сегмента L1 на аланин и тирозин уже приводит к варианту Fc, обладающему увеличенным связыванием, то в результате делеции L1 можно получить вариант Fc, обладающий повышенной аффинностью к партнеру по связыванию Fc.

Аналогичным образом встраивание полипептидного сегмента в полипептид Fc в N-терминальной области петли вызывает смещение положений сегментов петли к C-терминальному участку петли. На фиг. 7 встраивание одной или нескольких аминокислот перед (т.е. N-терминально) сегментом L1 изменяет конформацию остова, включая смещение сегмента L1 к C-терминальной области петли. Данный вид встраивания является предпочтительным, когда известно, что расположенные в сегменте L1 аминокислоты осуществляют подходящие взаимодействия при расположении в положениях L2, т.к. указанное встраивание может привести к более сильным взаимодействиям Fc/партнер по связыванию Fc. В случае, если необходимы более слабые взаимодействия Fc/партнер по связыванию Fc, может быть использовано встраивание для смещения неподходящей аминокислоты в другое положение. Встроенные, удаленные и эталонные сегменты (L1-L4 на фиг. 7) могут представлять собой одну или несколько аминокислот в полипептиде Fc.

В качестве альтернативы встраивания или делеции могут быть использованы в C-терминальной области петель способом, аналогичным встраиваниям или делениям в N-терминальной области петель. Встраивания в C-терминале петли могут приводить к смещению положений, N-терминальных по отношению к встраиванию, к N-терминалу петли. Делеции в C-терминале петли могут приводить к смещению положений, N-терминальных по отношению к делеции, к C-терминалу петли. Выбор использования встраивания или делеции в N-терминальной или C-терминальной области петли осуществляют исходя из аминокислот, расположенных в петле, необходимости повышенной или пониженной аффинности Fc/партнер по связыванию Fc и необходимого смещения положений.

Встраивания или делеции могут быть использованы в любой области полипептида Fc, включая петли, альфа-спиральные области и области бета-складчатых слоев. Предпочтительные участки для встраиваний и делений включают области петель, которые представляют собой области, которые не являются альфа-спиральными или областями бета-складчатых слоев. Петли являются предпочтительными, т.к. они в целом принимают изменения остова лучше, чем альфа-спирали или бета-складчатые

слои. Наиболее предпочтительные участки для встраиваний или делеций, приводящих к более сильным взаимодействиям белок/белок, расположены на N-терминальных или C-терминальных участках петли. Если боковые цепи петли вовлечены во взаимодействия Fc/партнер по связыванию Fc, встраивания или делеций на указанных участках с меньшей вероятностью приведут к сильно разрушительным изменениям в связывающих взаимодействиях. В результате делеций в пределах точного центра петли более вероятно удаление важных остатков на границе Fc/партнер по связыванию Fc, а в результате встраиваний в пределах точного центра петли более вероятно появление неподходящих взаимодействий на границе Fc/партнер по связыванию Fc. Количество удаляемых или встраиваемых остатков может быть определено объемом необходимого изменения остова, при этом предпочтительными являются встраивания или делеций 15 или менее остатков, более предпочтительными являются встраивания или делеций 10 или менее остатков и наиболее предпочтительными являются встраивания или делеций 5 или менее остатков.

После получения положения и размера варианта делеций Fc полностью определяют всю полипептидную последовательность, и полипептид может быть получен способами, известными в данной области техники.

Однако варианты встраивания Fc включают дополнительный этап создания последовательности, содержащей поменьше мере одну встроенную аминокислоту.

Встраивания полярных остатков, включая Ser, Thr, Asn, Gln, Ala, Gly, His являются предпочтительными в положениях, которые, как предполагается, будут подвержены воздействию в полипептиде Fc. Меньшие аминокислоты, включая Ser, Thr и Ala, являются наиболее предпочтительными, т.к. небольшой размер с меньшей вероятностью стерически препятствует взаимодействиям Fc/партнер по связыванию Fc. Ser и Thr также могут образовывать водородные связи с атомами партнера по связыванию Fc.

Встраивания также обладают дополнительной гибкостью, в результате чего встроенный полипептид может быть получен таким образом, чтобы образовывать подходящие взаимодействия с партнером по связыванию Fc, что необходимо в случае, когда требуется более сильное связывание Fc/партнер по связыванию Fc. Длина встраивания в остова может быть определена путем моделирования вариантного остова со встроенной простой типичной последовательностью. Например, встраивания полисерина, полиглицина или полиаланина различной длины могут быть «сконструированы» и смоделированы. Моделирование может быть осуществлено множеством способов, включая гомологичное моделирование на основе известных трехмерных структур гомологов, содержащих указанное встраивание, и путем компьютерного моделирования, включая MODELLER (M.A. Marti-Renom et al. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 291-325, 2000) и ROSETTA (Kuhlman et al. (2003). Science 302, 1364-8), оба полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки. Как правило, сначала получают различные конформации остова, и конечная структура остова может быть определена после установления идентичности боковой цепи. Боковые цепи могут быть созданы с помощью алгоритмов PDA® (US 6188965; 6269312; 6403312; 6801861; 6804611; 6792356, 6950754 и USSN 09/782004; 09/927790; 10/101499; 10/666307; 10/666311; 10/218102. все полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки).

Могут быть произведены встраивания или делеции для изменения связывания полипептидов Fc с FcгаммаR аналогично описанному способу изменения свойств связывания FcRn. Домены Fc связываются с FcгаммаR в положении, указанном на фиг. 1. Структуры комплекса Fc/ FcгаммаR, включая коды в PDB 1T89 и HIS (Radaev S et al.

J. Biol. Chem. v276, p. 16469-16477, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки), демонстрируют взаимодействующие остатки и петли между двумя структурами. Все результаты мутагенеза, такие как приведены в US 11/124620 и US 6737056 (оба из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки) полезны в определенных подходящих смещениях положений остова.

Встраивания или делеции могут быть произведены в любом полипептиде, помимо полипептидов Fc, способами, указанными в настоящем описании. Например, встраивания или делеции в члене суперсемейства TNF, APRIL, могут быть произведены с помощью трехмерной структуры (код в PDB IXU1.pdb, Hymowitz, et al. (2005) J. Biol. Chem. 280:7218, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Встраивания или делеции могут быть произведены для увеличения связывания APRIL со своим рецептором TACI. Остатки петель, предпочтительные в качестве центров встраивания или делеции, представляют собой остатки Ser118-Val124, Asp164-Phe167, Pro192-Ala198, Pro221-Lys226. Данные петли взаимодействуют с TACI в комплексе APRIL/TACI и опосредуют связывание.

Полпептиды, включающие варианты.

Варианты IgG могут быть основаны на последовательностях IgG человека и таким образом последовательности IgG человека используют в качестве «базовых» последовательностей, с которыми сравнивают другие последовательности, включая без ограничения последовательности других организмов, например, последовательности грызунов и приматов. Варианты также IgG могут содержать последовательности других классов иммуноглобулина, таких как IgA, IgE, IgD, IgM и т.п. Предполагается, что несмотря на то что варианты IgG создают в контексте одного исходного IgG, варианты могут быть созданы в контексте другого, второго исходного IgG или «перенесены» к нему. Это осуществляют путем определения «эквивалентных» или «соответствующих» остатков и замещений между первым и вторым IgG, как правило, исходя из гомологии последовательности или структурной гомологии между последовательностями IgG. Для установления гомологии аминокислотную последовательность первого указанного IgG напрямую сравнивают с последовательностью второго IgG. После выравнивания последовательностей с использованием одной или нескольких программ выравнивания гомологии, известных в данной области техники (например, с использованием консервативных остатков в качестве промежуточных видов), предусматривая необходимые встраивания и деления для поддержания выравнивания (т.е. избегая удаления консервативных остатков путем произвольной деления и встраивания), определяют остатки, эквивалентные конкретным аминокислотам в первичной последовательности первого варианта IgG. Выравнивание консервативных остатков предпочтительно должно сохранять 100% таких остатков. Однако выравнивание более 75% или до 50% консервативных остатков также подходит для определения эквивалентных остатков. Эквивалентные остатки также могут быть определены путем установления структурной гомологии между первым и вторым IgG, т.е. на уровне третичной структуры для IgGs, структуры которых были определены. В данном случае эквивалентные остатки определяют как остатки, для которых атомные координаты двух или более атомов основной цепи конкретного аминокислотного остатка родоначальника или предшественника (N на N, CA на CA, C на C и O на O) находятся в пределах 0.13 нм и предпочтительно 0.1 нм после выравнивания. Выравнивание осуществляют после ориентации и расположения лучшей модели с получением максимального совпадения атомных координат неводородных белковых атомов белков. Независимо от того, как определяют эквивалентные или соответствующие остатки и

независимо от идентичности исходного IgG, в котором создают IgGs, неизменным остается то, что исследованные варианты IgG могут быть созданы во втором исходном IgG, обладающим значительной гомологией последовательностей или структурной гомологией с вариантом IgG. Таким образом, например, если получают вариантное антитело, в котором исходное антитело представляет собой IgG1 человека, путем использования вышеописанных способов или других способов определения эквивалентных остатков вариантное антитело может быть создано в другом исходном антителе IgG1, которое связывается с другим антигеном, исходном антителе IgG2 человека, исходном антителе IgA человека, исходном антителе IgG2a или IgG2b мыши и т.п. Снова, как описано выше, контекст исходного варианта IgG не влияет на способность переносить варианты IgG в другие исходные IgGs.

Предложены способы создания, получения и скрининга вариантов IgG. Описанные способы не ограничивают любое конкретное применение или методику применения. Предпочтительно предложенные способы в целом иллюстрируют, что один или несколько вариантов IgG могут быть созданы, получены и экспериментально подвергнуты скринингу для получения вариантов IgG, обладающих оптимизированной эффекторной функцией. Описано множество способов создания, получения и тестирования вариантов антитела и белка в USSN 10/754296 и USSN 10/672280, оба из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Множество способов создания белка может быть использовано для создания вариантов IgG, обладающих оптимизированной эффекторной функцией. В одном из вариантов реализации может быть использован основанный на структуре способ создания, в котором имеющуюся структурную информацию используют для управления замещениями, встраиваниями или делениями. В предпочтительном варианте реализации может быть использован компьютерный способ скрининга, в котором замещения производят на основе их энергетического соответствия в компьютерных расчетах. См., например, USSN 10/754296 и USSN 10/672280 и указанные в них источники, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Выравнивание последовательностей может быть использовано для управления замещениями в идентифицированных положениях. Для специалиста в данной области техники очевидно, что использование информации о последовательностях может ограничивать введение замещений, которые являются потенциально разрушительными для структуры белка. Источник последовательностей может широко варьироваться и включать одну или несколько известных баз данных, включая без ограничения базу данных Kabat (Северо-Западный Университет (Northwestern University)); Johnson & Wu, 2001, Nucleic Acids Res. 29: 205-206; Johnson & Wu, 2000, Nucleic Acids Res. 28:214-218), базу данных IMGT (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®; Lefranc et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212; Ruiz et al., 2000 Nucleic Acids Res. 28: 219-221; Lefranc et al., 2001, Nucleic Acids Res. 29: 207-209; Lefranc et al., 2003, Nucleic Acids Res. 31: 307-310) и VBASE, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Информация о последовательностях антитела может быть приобретена, скомпилирована и/или получена в результате выравниваний гаметических последовательностей или последовательностей встречающихся в природе антител любого организма, включая без ограничения млекопитающих. Для специалиста в данной области техники очевидно, что использование последовательностей человеческого или по существу человеческого происхождения также может обладать преимуществом, которое заключается в том, что они менее иммуногенны при введении человеку. Другие базы данных, которые представляют собой более общие базы данных

нуклеиновых кислот или белков, т.е. не конкретно антител, включают без ограничения SwissProt, GenBank Entrez и базу данных нуклеотидных последовательностей EMBL. Выровненные последовательности могут включать последовательности VH, VL, CH и/или CL. Существуют многочисленные основанные на последовательности программы
 5 выравнивания и способы, известные в данной области техники, и все они находят применение в формировании выравниваний последовательностей.

В качестве альтернативы способы случайного или полуслучайного мутагенеза могут быть использованы для создания аминокислотных модификаций в необходимых
 10 положениях. В данных случаях положения выбирают произвольно или аминокислотные изменения осуществляют по упрощенным правилам. Например, все остатки могут быть подвергнуты мутации с получением аланина, мутагенез под названием «сканирующий аланином». Указанные способы могут быть комбинированы с более сложными инженерными подходами, в которых применяют способы отбора для скрининга более
 15 высоких уровней отличия последовательностей. Как хорошо известно в данной области техники, существует множество технологий отбора, которые могут быть использованы для указанных подходов, включая, например, технологии отображения, такие как фаговое отображение (дисплей), рибосомный дисплей, отображение клеточной поверхности и т.п., как описано ниже.

Способы получения и скрининга вариантов IgG хорошо известны в данной области
 20 техники. Общие способы молекулярной биологии антитела, экспрессии, очистки и скрининга описаны в Antibody Engineering, под редакцией Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; и Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5: 683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2: 339-76. Также см. способы, описанные в USSN 10/754296; USSN 10/672280; и USSN 10/822231; и 11/124620, все из которых
 25 полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Предпочтительные варианты согласно настоящему изобретению включают варианты, приведенные на фиг. 8. В качестве альтернативы, предпочтительные варианты согласно
 30 настоящему изобретению включают варианты, приведенные на фиг. 9. Дополнительно в качестве альтернативы, предпочтительные варианты согласно настоящему изобретению включают варианты, приведенные на фиг. 10. Данные варианты продемонстрировали увеличенное связывание с рецептором Fc, FcRn, как проиллюстрировано в примерах.

Создание вариантов IgG

Варианты IgG могут быть созданы любым способом, известным в данной области
 35 техники. В одном из вариантов реализации последовательности вариантов IgG используют для получения нуклеиновых кислот, которые кодируют последовательности членов и которые затем могут быть клонированы в клетках-хозяевах, экспрессированы и анализированы при необходимости. Данные технологии осуществляют с использованием хорошо известных процедур и множество способов, которые могут
 40 найти в них применение, описаны в Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001) и Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons), оба из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты IgG, могут быть включены в вектор экспрессии для экспрессии белка. Векторы экспрессии, как правило,
 45 содержат белок, функционально связанный, т.е. находящийся в функциональной зависимости, с контрольными или регуляторными последовательностями, селективируемыми маркерами, любыми партнерами по слиянию и/или дополнительными элементами. Варианты IgG могут быть получены путем выращивания клетки-хозяина,

трансформированной нуклеиновой кислотой, предпочтительно вектором экспрессии, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую варианты IgG, в подходящих условиях для индуцирования или вызова экспрессии белка. Может быть использован широкий спектр подходящих клеток-хозяев, включая без ограничения клетки млекопитающих, бактерии, клетки насекомых и дрожжи. Например, множество линий клеток, которые могут найти применение, описаны в каталоге линий клеток ATCC, доступном из американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection), полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки. Способы введения экзогенной нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева хорошо известны в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от используемой клетки-хозяина.

В предпочтительном Варианте реализации варианты IgG очищают или выделяют после экспрессии. Антитела могут быть выделены или очищены множеством способов, известных специалистам в данной области техники. Стандартные способы очистки включают методы хроматографии, методы электрофореза, иммунологические методы, методы осаждения, диализа, фильтрации, концентрирования и методы хроматофокусирования. Как хорошо известно в данной области техники, множество природных белков связывают антитела, например бактериальные белки A, G и L, и данные белки могут найти применение в очистке. Часто очистке может способствовать конкретный партнер по слиянию. Например, белки могут быть очищены с использованием глутатионовой смолы в случае, если используют гибрид GST, Ni²⁺-аффинной хроматографии в случае, если используют His-метку, или иммобилизованного антитела анти-flag в случае, если используют flag-метку. Для общего руководства относительно подходящих способов очистки см. *Antibody Purification: Principles and Practice*, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Скрининг вариантов IgG

Варианты Fc могут быть подвергнуты скринингу с использованием множества способов, включая без ограничения способы, в которых используют анализы *in vitro*, анализы *in vivo* и анализы на основе клеток и способы отбора. Технологии автоматического скрининга и скрининга высокой производительности могут быть использованы в процедурах скрининга. В скрининге могут использовать партнера по слиянию или метку, например, иммунную метку, изотопную метку или метку, представляющую небольшую молекулу, такую как флуоресцентный или колориметрический краситель.

В предпочтительном варианте реализации функциональные и/или биофизические свойства вариантов Fc подвергают скринингу в анализе *in vitro*. В предпочтительном варианте реализации белок подвергают скринингу на предмет функциональности, например, его способности катализировать реакцию или его аффинности к связыванию в отношении мишени.

Как известно в данной области техники, подгруппами способов скрининга являются те, которые отбирают подходящих членов библиотеки. В настоящем описании указанные способы называются «способами отбора», и данные способы находят применение в настоящем изобретении в скрининге вариантов Fc. Когда белковые библиотеки подвергают скринингу с использованием способа отбора, только те члены библиотеки, которые подходят, т.е. которые отвечают критериям отбора, пропускают, выделяют и/или наблюдают. Множество способов отбора известны в данной области техники, и они могут найти применение в настоящем изобретении для скрининга белковых библиотек. Другие способы отбора, которые могут найти применение в настоящем

изобретении, включают способы, которые не основываются на отображении, такие как способы *in vivo*. Подгруппа способов отбора, называемых способами «направленного развития», представляет собой способы, включающие соединение или «панировку» подходящих последовательностей в ходе отбора, иногда с включением

новых мутаций.

В предпочтительном варианте реализации варианты Fc подвергают скринингу с использованием одного или нескольких основанных на клетках анализов или анализов *in vivo*. Для указанных анализов очищенные и неочищенные белки, как правило, добавляют извне таким образом, что клетки подвергают воздействию индивидуальных вариантов или пулов вариантов, относящихся к библиотеке. Данные анализы, как правило, но не всегда основаны на функции полипептида Fc; т.е. способности полипептида Fc связываться с мишенью и опосредовать некоторую биохимическую реакцию, например, эффекторную функцию, ингибирование связывания лиганд/рецептор, апоптоз и т.п. Указанные анализы часто включают мониторинг реакции клеток на IgG, например, выживания клеток, гибели клеток, изменения клеточной морфологии или транскрипционной активации, такой как клеточная экспрессия природного гена или гена-репортера. Например, указанные анализы могут измерять способность вариантов Fc вызывать ADCC, ADCP или CDC. Для некоторых анализов может быть необходимо добавление дополнительных клеток или компонентов, т.е. в дополнение к клеткам-мишеням, например, сывороточного комплемента или эффекторных клеток, таких как моноциты периферической крови (PBMCs), макрофаги, естественные киллерные клетки и т.п. Указанные дополнительные клетки могут происходить из любого организма, предпочтительно людей, мышей, крысы, кролика и обезьяны. Антитела могут вызывать апоптоз некоторых линий клеток, экспрессирующих мишень, или могут опосредовать атаку клеток-мишеней иммунными клетками, добавленными к анализу. Способы мониторинга гибели или жизнеспособности клеток известны в данной области техники и включают применение красителей, иммунохимических, цитохимических и радиоактивных реагентов.. Транскрипционная активация может служить в качестве способа анализа функции в анализах на основе клеток. В качестве альтернативы, скрининги на основе клеток осуществляют с использованием клеток, трансформированных или трансфицированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими варианты. Т.е. варианты Fc не добавляют извне к клеткам.;

Биологические свойства вариантов IgG могут быть охарактеризованы исходя из данных экспериментов с участием клеток, тканей и всего организма. Как известно в данной области техники, лекарственные средства часто тестируют на животных, включая без ограничения, мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, свиней и обезьян, для того, чтобы измерить эффективность лекарственного средства в отношении лечения заболевания или модели заболевания или для измерения фармакокинетических характеристик, токсичности и других свойств лекарственного средства. Указанные животные могут рассматриваться как модели заболеваний. Лекарственные средства часто тестируют на мышах, включая без ограничения мышей линии nude, мышей SCID, мышей с ксенотрансплантатами и трансгенных мышей (включая knockins (с «включенным» геном) и knockouts (с «выключенным» геном)). В результате проведения указанных исследований можно получить важные данные для определения потенциала белка, который будет использоваться в качестве лекарственного средства. Для тестирования может быть использован любой организм, предпочтительно млекопитающие. Например, обезьяны из-за их генетического сходства с людьми могут представлять собой подходящие модели для лечения и, таким образом, могут быть

использованы для тестирования эффективности, токсичности, фармакокинетических характеристик или другого свойства IgGs. В конечном счете, необходимо проведение тестов на людях для разрешения использования в качестве лекарственных средств и, следовательно, данные эксперименты обязательно предполагаются. Таким образом, IgGs могут быть протестированы на людях для определения их терапевтической эффективности, токсичности, иммуногенности, фармакокинетических характеристик и/или других клинических свойств.

Способы использования вариантов IgG

Варианты IgG могут найти применение в широком диапазоне продуктов. В одном из вариантов реализации вариант IgG представляет собой терапевтический, диагностический или экспериментальный реагент, предпочтительно терапевтический. Вариант IgG может найти применение в композиции антител, являющейся моноклональной или поликлональной. В предпочтительном варианте реализации варианты IgG используют для разрушения клеток-мишеней, которые порождают антиген-мишень, например, раковых клеток. В альтернативном варианте реализации варианты IgG используют для блокирования, вызова антагонизма или агонизма к антигену-мишени, например для вызова антагонизма к цитокину или рецептору цитокина. В альтернативном предпочтительном варианте реализации варианты IgG используют для блокирования, вызова антагонизма или агонизма к антигену-мишени и разрушения клеток-мишеней, порождающих антиген-мишень.

Варианты IgG могут быть использованы для различных терапевтических целей. В предпочтительном варианте реализации антитело, содержащее вариант IgG, вводят пациенту для лечения расстройства, связанного с антителом. Для данных целей термин «пациент» включает людей и других животных, предпочтительно млекопитающих и наиболее предпочтительно людей. В настоящем описании термин «расстройство, связанное с антителом» или «расстройство, восприимчивое к антителу», или «состояние», или «заболевание» означает расстройство, которое можно облегчить путем введения фармацевтической композиции, содержащей вариант IgG. Расстройства, связанные с антителом, включают без ограничения аутоиммунные заболевания, иммунологические заболевания, инфекционные заболевания, воспалительные заболевания, неврологические заболевания и онкологические, и неопластические заболевания, включая рак. В настоящем описании термины «рак» и «раковый» описывают или относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают без ограничения карциному, лимфому, бластому, саркому (включая липосаркому), нейроэндокринные опухоли, мезотелиому, шванному, менингиому, аденокарциному, меланому, лейкоз и лимфолейкозы.

В одном из вариантов реализации вариант IgG представляет собой единственный терапевтически активный агент, вводимый пациенту. В качестве альтернативы, вариант IgG вводят в комбинации с одним или несколькими терапевтическими агентами, включая без ограничения цитотоксические агенты, химиотерапевтические агенты, цитокины, ингибиторы роста, антигормональные агенты, ингибиторы киназы, антиангиогенные агенты, кардиопротекторы или другие терапевтические агенты. Варианты IgG могут быть введены одновременно с использованием одной или нескольких схем лечения. Например, вариант IgG может быть введен пациенту наряду с химиотерапией, лучевой терапией или как химиотерапией, так и лучевой терапией. В одном из вариантов реализации вариант IgG может быть введен совместно с одним или несколькими антителами, которые могут или не могут представлять собой вариант IgG. Согласно

другому варианту реализации, вариант IgG и один или несколько других видов противораковой терапии используют для лечения раковых клеток *ex vivo*. Предполагается, что указанное лечение *ex vivo* может быть подходящим в трансплантации костного мозга и в частности аутогенной трансплантации костного

5 мозга. Обязательно предполагается, что варианты IgG могут быть использованы в комбинации еще с другими терапевтическими методами, такими как хирургия.

Множество других терапевтических агентов может быть введено с вариантами IgG. В одном из вариантов реализации IgG вводят совместно с антиангиогенным агентом. В настоящем описании термин «антиангиогенный агент» означает соединение,

10 блокирующее или в некоторой степени препятствующее росту кровеносных сосудов. Антиангиогенный фактор может, например, представлять собой небольшую молекулу или белок, например, антитело, гибриды Fc или цитокин, связывающийся с фактором роста или рецептором фактора роста, вовлеченным в стимулирование ангиогенеза. В настоящем описании предпочтительный антиангиогенный фактор представляет собой

15 антитело, связывающееся с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF). В альтернативном варианте реализации IgG вводят совместно с терапевтическим агентом, индуцирующим или усиливающим адаптивный иммунный ответ, например, антителом, которое прицельно воздействует на CTLA-4. В альтернативном варианте реализации IgG вводят совместно с ингибитором тирозинкиназы. В настоящем описании термин

20 «ингибитор тирозинкиназы» означает молекулу, в некоторой степени ингибирующую тирозинкиназную активность тирозинкиназы. В альтернативном варианте реализации варианты IgG вводят совместно с цитокином.

Фармацевтические композиции предполагаются в случае, когда получают вариант IgG и один или несколько терапевтически активных агентов. Составы вариантов IgG

25 получают для хранения путем смешивания IgG необходимой степени чистоты с возможными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Указанные составы для

30 применения для введения *in vivo*, предпочтительно являются стерильными. Это легко осуществляют путем фильтрации через мембраны для стерилизующей фильтрации или другими способами. Варианты IgG и другие терапевтически активные агенты, указанные в настоящем описании, также могут быть получены в виде иммунолипосом и/или заключены в микрокапсулы.

Концентрация терапевтически активного варианта IgG в составе может варьироваться от примерно 0.1 до 100% масс. В предпочтительном варианте реализации концентрация IgG находится в диапазоне 0.003-1.0 моль. Для лечения пациента может быть введена терапевтически эффективная доза варианта IgG. В настоящем описании термин

40 «терапевтически эффективная доза» означает дозу, обеспечивающую необходимые эффекты. Точная доза будет зависеть от цели лечения и будет определена специалистом в данной области техники с использованием известных способов. Дозы могут находиться в диапазоне от 0.01 до 100 мг/кг массы тела или выше, например 0.01, 0.1, 1.0, 10 или 50 мг/кг массы тела, при этом доза 1-10 мг/кг является предпочтительной. Как известно в данной области техники, могут быть необходимы поправки на разрушение белков,

45 системную или локализованную доставку, и скорость синтеза новых протеаз, а также возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, продолжительность введения, взаимодействие лекарственных средств и тяжесть состояния, которые могут быть определены специалистом в данной области техники с помощью стандартного

исследования.

Введение фармацевтической композиции, содержащей вариант IgG, предпочтительно в форме стерильного водного раствора может быть осуществлено множеством способов, например, без ограничения перорально, подкожно, внутривенно, парентерально, интраназально, в ухо, внутрь глаза, ректально, вагинально, трансдермально, местно (например, гели, мази, лосьоны, кремы и т.д.), интраперитонеально, внутримышечно, внутрилегочно (например, система для ингаляции AERx®, выпускаемая Aradigm, или система доставки в легкие Inhance®, выпускаемая Nektar Therapeutics, и т.д.).

Лекарственное средство, указанное в настоящем описании, может быть введено одновременно с другими лекарственными средствами, т.е. лекарственные средства, указанные в настоящем описании, могут быть назначены совместно с другими видами терапии или лекарственными средствами, включая например, небольшие молекулы, другие биологические препараты, лучевую терапию, хирургию и т.д.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Ниже приведены примеры для иллюстрации настоящего изобретения. Данные примеры не ограничивают настоящее изобретение каким-либо конкретным применением или методикой применения. Для всех положений, описанных согласно настоящему изобретению, нумерация приведена согласно индексу EU, как у Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). Для специалистов в области техники, касающейся антител очевидно, что данное соглашение состоит из непоследовательной нумерации в конкретных областях последовательности иммуноглобулина, предоставляя стандартизированную ссылку на консервативные положения в семействах иммуноглобулина. Соответственно, положения любого указанного иммуноглобулина, определенные индексом EU, не будут обязательно соответствовать его порядковой последовательности.

ПРИМЕР 1. Создание ДНК, экспрессия и очистка вариантов Fc

Создавали модификации аминокислот в области Fc антител IgG с повышением их аффинности к неонатальному Fc рецептору FcRn. Варианты подвергали скринингу в случае ряда константных цепей различных IgG человека (фиг. 2), включая последовательности IgG1, IgG2 и гибридного IgG, содержащие СН1 и верхний шарнир IgG1 и область Fc IgG2. Для специалистов в данной области техники очевидно, что из-за различных взаимодействий области Fc IgG1 и IgG2 с FcγRs и комплементом, данные различные исходные области Fc будут обладать различными опосредуемыми FcγR и комплементом свойствами эффекторных функций. Типичные последовательности вариантов Fc в случае данных константных цепей исходного IgG показаны на фиг. 3.

Варианты Fc создавали в случае антитела, прицельно воздействующего на фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Вариабельные области (VH и VL) тяжелых и легких цепей представляют собой области гуманизированного варианта антитела A4.6.1, также называющегося бевацизумабом (Авастин®), которое разрешено для лечения множества раковых опухолей. Аминокислотные последовательности областей VH и VL данного антитела показаны на фиг. 4.

Гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи антител анти-VEGF создавали в векторе экспрессии рТТ5 млекопитающего. Гены константных цепей IgG1 и IgG2 человека получали из клонов IMAGE и субклонировали в вектор рТТ5. Ген IgG1/2 создавали с использованием мутагенеза с помощью ПЦР. Гены VH и VL, кодирующие антитела анти-VEGF, синтезировали в промышленном масштабе (Blue Heron Biotechnologies,

Bothell WA) и субклонировали в векторы, кодирующие подходящие константные цепи CL, IgG1, IgG2 и IgG1/2. Модификации аминокислот создавали путем сайт-направленного мутагенеза с использованием способов сайт-направленного мутагенеза QuikChange® (Stratagene, La Jolla CA). Секвенировали последовательности всех ДНК и в результате

5 подтверждали правильность последовательностей.

Плазмиды, содержащие ген тяжелой цепи (VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3), совместно трансфицировали с плазмидой, содержащей ген легкой цепи (VL-Ск), в клетки 293Е с использованием липофектамина (lipofectamine) (Invitrogen, Carlsbad CA) и выращивали в средах FreeStyle 293 (Invitrogen, Carlsbad CA). После 5 дней роста антитела очищали

10 от надосадочной жидкости культур путем аффинной хроматографии с белком А с использованием смолы MabSelect (GE Healthcare). Концентрации антител определяли путем анализа с использованием бицинхониновой кислоты (BCA) (Pierce).

ПРИМЕР 2. Вариантные антитела Fc сохраняют связывание с антигеном

Правильность экспрессированных вариантных антител подтверждали путем

15 демонстрации того, что они сохраняют специфичность в отношении антигена. Связывание VEGF контролировали путем поверхностного плазменного резонанса (ППР, Biacore), проводимого с использованием прибора Biacore 3000. Рекombинантный VEGF (VEGF-165, PeproTech, Rocky Hill, NJ) присоединяли к поверхности чипа CM5 путем соединения с N-гидроксисукцинимид/N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)

20 карбодиимидом (NHS/EDC) с использованием стандартных способов. Антитела дикого типа и вариантные антитела вводили в качестве аналитов и получали реакцию, измеряемую в единицах резонанса (RU). Фаза диссоциации была слишком медленной для того, чтобы измерить истинные константы равновесия и поэтому относительное связывание определяли путем измерения RU в конце фазы ассоциации, которые должны

ПРИМЕР 3. Измерение связывания с FcRn человека

30 Связывание вариантных антител с FcRn человека измеряли при pH 6.0, pH, при котором он в естественных условиях связан в эндосомах. Векторы, кодирующие бета-2-микроглобулин и меченые His гены альфа-цепей FcRn, создавали, совместно трансфицировали в клетки 293Т и очищали путем хроматографии с использованием никеля. Аффинность антитела к FcRn человека (hFcRn) при pH 6.0 измеряли на приборе

35 Biacore 3000 путем присоединения FcRn человека к поверхности чипа CM5 с использованием стандартной химии NHS/EDC. Антитела дикого типа и вариантные антитела использовали в подвижной фазе в 25-100 нМ концентрации и реакцию измеряли в единицах резонанса. Достигали фаз ассоциации и диссоциации при pH 6.0 с последующим введением буфера pH 7.4 с измерением высвобождения антитела от

40 рецептора при более высоком значении pH. Цикл с антителом и буфером обеспечивал базовую линию анализа, которую вычитали из сенсограммы каждого образца.

На фиг. 7 показаны сенсограммы Biacore связывания нативного IgG1 и выбранных вариантных антител Fc с FcRn человека при двух соответствующих значениях pH. Указанные данные показывают, что антитела дикого типа и вариантные антитела легко

45 связываются с чипом FcRn при pH 6.0 и медленно диссоциируют при этом pH, также как они диссоциировали бы в эндосоме, в то время как они быстро высвобождаются при pH 7.4, как при рециркуляции эндосомы к мембране и воздействию более высокого значения pH сыворотки.

Кривые ассоциации/диссоциации FcRn не соответствовали простой модели Ленгмюра, возможно вследствие поливалентности антитела и рецептора или гетерогенности чипа. Значения псевдо-Ка (обозначаемой Ка*) определяли путем подгонки к модели конформационного изменения с изменением показателя преломления (RI), зафиксированным при 0 RU. Данные значения для выбранных вариантных антител изображены на графике на фиг. 8. Относительную аффинность каждого варианта по сравнению с исходным IgG рассчитывали согласно уравнению $\text{Кратность} = (\text{Ка}^* \text{ дикого типа} / \text{Ка}^* \text{ варианта})$. Данные относительного связывания для всех вариантов Fc в области Fc IgG1 представлены на фиг. 9, а данные связывания для вариантов в антителах с областью Fc IgG2 (константные цепи IgG1 и IgG1/2) представлены на фиг. 10. Для многих вариантов эксперимент по связыванию повторяли многократно (n-раз), для эксперимента кратности рассчитывали относительно исходного IgG дикого типа в рамках каждого конкретного эксперимента по связыванию. В результате усреднения этих данных получали среднее и стандартное отклонение, как представлено на фиг. 9 и 10.

На фиг. 9 и 10 показано, что ряд созданных вариантов связывается с большей аффинностью к связыванию FcRn человека при pH 6.0 по сравнению с IgG1 дикого типа. Улучшения в значительной степени зависели от идентичности замещения в определенном положении. Например, с использованием 2-кратности в качестве критериев улучшенного связывания, ряд мутаций в положении 434 в IgG2 повышал аффинность (A, S, Y, F и W), некоторые были нейтральными (в пределах 2-кратности IgG2 дикого типа) (G, H, M и T) и ряд замещений понижал аффинность (кратность <0.5) (D, E, K, P, R и V). Большее связывание в случае IgG1 не обязательно приводило к большему связыванию в IgG2 (например, 434T обладал улучшенным связыванием в IgG1, но не IgG2). Кроме того, улучшения, обусловленные отдельными вариантами, не всегда были аддитивными при комбинации. На фиг. На это продемонстрировано графически путем построения зависимости экспериментального кратного связывания FcRn выбранными двойными вариантами замещения от результата кратного связывания FcRn индивидуальными отдельными вариантами, составляющими их. Прямая линия отображает абсолютную аддитивность, т.е. значение, которое ожидают или предполагают исходя из результата отдельных замещений. Ряд двойных вариантов ложится на данную прямую или располагается рядом с ней (259I/319I, 259I/428L, 319I/428L и 308F/428L). Некоторые варианты обладают меньшей аддитивностью (319I/308F, 252Y/428L и 428L/434M). Для данных вариантов, в частности в случае последних двух (252Y/428L и 428L/434M), повышения аффинности одиночных замещений могли бы оказаться несовместимыми друг с другом при комбинировании. Являлось неожиданным, что повышения аффинности вариантов 259I/308F и 428L/434S к FcRn были значительнее, чем можно было ожидать исходя из значений аффинности их соответствующих одиночных замещений. Данные конкретные одиночные замещения обладали неожиданными синергичными повышениями при комбинировании. Различия между экспериментальными значениями аффинности и значениями аффинности, предполагаемыми исходя из значений аффинности одиночных вариантов, изображены на графике на фиг. 11b, при этом варианты сгруппированы согласно составным одиночным вариантам (259I, 308F и 319I - с левой стороны, а комбинации, содержащие 428L - с правой стороны). Синергия может быть количественно определена путем расчета кратности экспериментального значения относительно предполагаемого значения с последующей стандартизацией до 1 и переводом в процент (% синергии = $100 \times [(\text{экспериментальная кратность} / \text{предполагаемая кратность}) - 1]$). Данный анализ

изображен на графике на фиг. 11b, при этом варианты сгруппированы согласно составным одиночным вариантам. Данный график снова указывает на синергию некоторых вариантов, в частности 259I/308F и 428L/434S. Фиг. 11b и 11c также подчеркивают непредсказуемый характер комбинирования многих лучших одиночных замещений скрининга. Например, тогда как комбинация 428L с 434S и 259I приводила к синергичным улучшениям связывания, 252Y или 434M обладал отрицательным результатом при комбинировании с 428L. Существенное отличие между комбинацией 428L с 434S от комбинации с 434M также указывает на важность конкретной аминокислотной идентичности замещения в определенном положении.

ПРИМЕР 4. Тестирование вариантов в случаях других антител

Выбранные варианты создавали в случае антител, прицельно воздействующих на другие антигены, включая TNF (TNF α), CD25 (TAC), EGFR и IgE. На фиг. 4 предложены аминокислотные последовательности областей VH и VL антител, прицельно воздействующих на данные антигены, которые использовали согласно настоящему изобретению. Антитела анти-TNF дикого типа и вариантные Fc антитела анти-TNF содержат вариабельную область антитела полностью человеческого происхождения, адалимумаба (Хумира®), в настоящее время разрешенного для лечения ревматоидного артрита (РА), ювенильного идиопатического артрита (ЮИА), псориатического артрита (ПА), анкилозирующего спондилоартрита (АС) и болезни Крона (БК). Антитела анти-CD25 дикого типа и вариантные Fc антитела анти-CD25 представляют собой гуманизированные варианты антитела анти-TAC (Junghans et al., 1990, Cancer Research 50: 1495-1502), обозначаемые H1.8/L1 анти-TAC. Антитела анти-EGFR дикого типа и вариантные Fc антитела анти-EGFR представляют собой гуманизированные варианты антитела мыши, C225, обозначаемые H4.42/L3.32 C225. Наконец, антитела анти-IgE дикого типа и вариантные Fc антитела анти-IgE содержат вариабельную область гуманизированного антитела омализумаба (Ксолар®), разрешенного для лечения аллергической астмы.

Антитела дикого типа и вариантные антитела создавали, экспрессировали и очищали, как описано выше. Антитела тестировали на предмет связывания с FcRn человека при pH 6.0 с использованием Biacore, как описано выше. Данные относительного связывания вариантных антител анти-TNF, -CD25, -EGFR и -IgE с FcRn человека приведены на фиг. 12. Как можно видеть, указанные варианты повышают аффинность к FcRn в случае антител, прицельно воздействующих на множество антигенов.

ПРИМЕР 5. Фармакокинетические эксперименты у мышей с «включенным» (knock-in) FcRn человека

Для тестирования способности выбранных вариантов увеличивать время полужизни *in vivo*, фармакокинетические эксперименты проводили у мышей B6, являющихся гомозиготными «выключениями» (knock-outs) в отношении FcRn мыши и гетерозиготными «включениями» (knock-ins) в отношении FcRn человека (mFcRn^{-/-}, hFcRn⁺) (Petkova et al., 2006, Int Immunol 18(12): 1759-69, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки), в настоящем описании называемых «мышью hFcRn или hFcRn⁺». Группам 4-7 самок мышей, рандомизированных по массе тела (диапазон 20-30 г), делали одну внутривенную инъекцию антитела анти-VEGF (2 мг/кг) в хвостовую вену. Кровь (~50 мкл) забирали из орбитального сплетения в определенный момент времени, преобразовывали в сыворотку и хранили при -80°C до анализа. Продолжительность исследований составляла 28 или 49 дней. Во время данных исследований животные не пострадали.

Концентрации антител определяли с использованием двух иммуноферментных анализов (ELISA). В первых двух исследованиях (обозначаемых Исследование 1 и Исследование 2) античеловеческое антитело Fc козы (Jackson Immuno research) присоединяли к планшету, лунки промывали PBST (фосфатным буферным физиологическим раствором с 0.05% Tween) и блокировали 3% BSA в PBST. Затем добавляли сывороточные или калибровочные эталоны с последующим промыванием PBST, добавлением меченого европием античеловеческого IgG (Perkin Elmer) и последующим промыванием PBST. Получали сигнал флуоресценции с временным разрешением. Для Исследований 3-5 концентрацию в сыворотке обнаруживали с использованием аналогичного иммуноферментного анализа (ELISA), но рекомбинантный VEGF (VEGF-165, PeproTech, Rocky Hill, NJ) использовали в качестве связывающего реагента и обнаружение осуществляли с помощью биотинилированного античеловеческого каппа-антитела и меченого европием стрептавидина. ФК параметры определяли для индивидуальных мышей с помощью некомпартментной модели с использованием WinNonLin (Pharsight Inc, Mountain View CA). Номинальное время и дозу использовали с одинаковым сравнением моментов времени. Используемые моменты времени (лямбда Z диапазоны) составляли от 4 дней до конца исследования, несмотря на то, что все моменты времени использовали для более быстрого выведения мутантов, P257N и P257L.

Проводили пять ФК исследований антител у мышей $mFcRn^{-/-}$ $hFcRn^{+}$. На фиг. 13 показаны данные сывороточной концентрации для дикого типа и вариантных антител IgG1 (Исследование 3) и IgG2 (Исследование 5) соответственно. Подобранные ФК параметры всех ФК исследований *in vivo*, проведенных у мышей $mFcRn^{-/-}$ $hFcRn^{+}$, приведены на фиг. 14. ФК данные включают время полужизни, которое представляет собой бета-фазу, характеризующую выведение антитела из сыворотки, St_{max} , которая представляет собой максимальную наблюдаемую сывороточную концентрацию, ППК, которая представляет собой площадь под кривой «концентрация-время», и клиренс, который представляет собой клиренс антитела из сыворотки. Также для каждого варианта приведено рассчитанное кратное увеличение или уменьшение времени полужизни относительно исходного антитела IgG1 или IgG2 [кратное время полужизни = время полужизни (вариант) / время полужизни (дикий тип)].

Эти данные показывают, что ряд созданных вариантных Fc антител, обладающих повышенной аффинностью к FcRn при pH 6.0, увеличивает время полужизни *in vivo*. На фиг. 15а показан график зависимости времени полужизни *in vivo* от кратного связывания FcRn для антител IgG1 с выбранными мечеными вариантами. Результаты повторных экспериментов (обведены в кружок на фигуре) показывают, что данные модели *in vivo* являются воспроизводимыми. Лучшие одиночные варианты включают 308F и 434S, лучшие двойные варианты включают 259I/308F, 308F/428L, 308F/434S и 428L/434S и лучший тройной вариант представляет собой 259I/308F/428L. Существует общая корреляция между аффинностью к FcRn и временем полужизни *in vivo*, но она не является полностью предсказуемой. В частности, варианты 257L и 257N, которые увеличивали связывание FcRn 3.4- и 3.5-кратно соответственно, уменьшали время полужизни *in vivo* в 0.6 и 0.3 соответственно. График также снова подчеркивает важность аминокислотной идентичности в определенном положении - в то время как 308F/434S приводил к существенному увеличению времени полужизни, 308F/434M был лишь немного лучше по сравнению с IgG1 дикого типа.

На фиг. 15b показан график зависимости времени полужизни *in vivo* от кратного связывания FcRn для вариантных антител IgG2 с мечеными вариантами. Когда данные

IgG2 *in vivo* сравнивали с данными IgG1 *in vivo* (фиг. 15с), наблюдали неожиданный результат. Варианты приводили по существу к более значительному увеличению времени полужизни *in vivo* в случае области Fc IgG2, чем в области Fc IgG1. Самое продолжительное время полужизни одиночных и двойных вариантов всех антител во
 5 всех 5 исследованиях составляло 12,2 и 16,5, обусловленное 434S IgG2 и 428L/434S IgG2 соответственно. Резкие увеличения времени полужизни для вариантов IgG2 по сравнению с IgG1 происходили несмотря на то, что кратные увеличения вариантами в IgG2 были сопоставимы или даже ниже, чем в IgG1 (кратность 434S IgG1=3,8, кратность 434S IgG2=4,9, кратность 428L/434S IgG1=17,3, кратность 428L/434S IgG2=14,8). Таким образом,
 10 неожиданно антитело IgG2 может представлять собой лучшее применение для вариантов Fc для увеличения времени полужизни *in vivo* у млекопитающих.

ПРИМЕР 6. Вариантные иммуноадгезины

Варианты Fc согласно настоящему изобретению также оценивали на предмет их способности увеличивать время полужизни иммуноадгезинов (также называемых
 15 «гибридами Fc»). Выбранные варианты Fc создавали в иммуноадгезине анти-TNF, этанерцепте (Энбрел®). Этанерцепт представляет собой гибридный рецептор 2 TNF человека (TNF RII) и области Fc IgG1 человека, и является клинически разрешенным для лечения ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, псориатического артрита и псориаза. Также
 20 создавали вариант области Fc IgG2 данного гибрида Fc и в связи с этим также создавали выбранные варианты Fc. Аминокислотные последовательности иммуноадгезинов анти-TNF, охарактеризованных согласно настоящему изобретению, приведены на фиг. 16. Гены создавали с использованием рекурсивной ПЦР и субклонировали в вектор pTT5, а варианты Fc создавали с использованием способов мутагенеза QuikChange®.

25 Иммуноадгезины экспрессировали в клетках 293 Е и очищали, как описано выше.

Специфичность к связыванию очищенных иммуноадгезинов подтверждали путем тестирования связывания с рекомбинантным TNF с помощью Biacore. Иммуноадгезины фиксировали на биосенсорном чипе CM5 (Biacore) с иммобилизованным белком A/G (Pierce), полученном с использованием стандартного сочетания первичных аминов.

30 Иммуноадгезины иммобилизовали на поверхности Белка A/G и рекомбинантный TNF в серийных разведениях вводили на связанную с антителом поверхность с последующей фазой диссоциации. После каждого цикла поверхность регенерировали буфером. Данные обрабатывали путем обнуления времени и реакции перед введением рецептора и путем вычитания из базовых данных для объяснения изменений, вызванных введениями. Кинетические данные подгоняли к 1:1 модели связывания (Ленгмюр). Равновесные константы ассоциации (K_a), полученные в результате данных подборов, приведены на фиг. 17. Данные результаты показывают, что вариантные иммуноадгезины сохраняли аффинность к TNF, сопоставимую с коммерчески доступным энбрелом.

Вариантные иммуноадгезины тестировали на предмет связывания с FcRn человека
 40 при pH 6,0 с использованием Biacore, как описано выше. Результаты (фиг. 18) показывают, что также, как и в случае антител, указанные варианты улучшают связывание с FcRn по сравнению с их исходными белками иммуноадгезина IgG1 и IgG2.

Время полужизни вариантных иммуноадгезинов тестировали у мышей mFcRn^{-/-}
 45 hFcRn⁺, как описано выше. 12 мышам на группу вводили путем инъекции 2 мг/кг вариантного и исходного иммуноадгезина IgG1. Сывороточную концентрацию определяли с использованием иммуноферментного анализа (ELISA), аналогичного описанному выше, за исключением того, что античеловеческое антитело анти-TNF RII козы использовали в качестве связывающего реагента; обнаружение осуществляли с

помощью биотинилированного античеловеческого каппа-антитела и меченого европиум стрептавидина. На фиг. 19 показаны данные сывороточной концентрации для Fc IgG1 дикого типа и вариантных Fc иммуноадгезинов. Подобранные ФК параметры, как описано выше, полученные в результате ФК исследования, приведены на фиг. 20. Также для каждого варианта приведен рассчитанный % увеличения времени полужизни, рассчитанный как умноженное на 100 время полужизни вариантного гибрида Fc относительно времени полужизни исходного Fc IgG1 дикого типа. Данные результаты показывают, что варианты увеличивают время полужизни *in vivo* в случае иммуноадгезина.

ПРИМЕР 7. Фармакокинетический эксперимент на низших приматах

ФК свойства биопрепаратов у низших приматов точно установлены, в результате чего они являются предсказуемыми у людей. ФК исследование выполняли на яванских макаках (*macaca fascicularis*) для оценки способности вариантных антител анти-VEGF увеличивать время полужизни в сыворотке у низших приматов.

При подготовке к ФК исследованию у яванских макак измеряли связывание вариантных антител с FcRn яванских макак (*супо*) (сFcRn) при pH 6.0. сFcRn создавали, экспрессировали и очищали, как описано выше для FcRn человека. Связывание вариантных антител анти-VEGF с сFcRn измеряли с использованием Biacore, как описано выше. Данные представлены на фиг. 21. Данные результаты показывают, что варианты повышают аффинность к *супо* FcRn аналогичным образом, что и к FcRn человека. Диссоциация при более высоком значении pH (7.4) также происходила очень быстро (данные не показаны), аналогично наблюдаемой для связывания с FcRn человека. Данные результаты не являются неожиданными, приведена высокая гомология последовательностей рецепторов человека и супо-рецепторов (альфа цепь FcRn 96%, бета-2-микроглобулин 91%).

Фармакокинетические характеристики вариантов исследовали у низших приматов *in vivo*. Самцов яванских макак (*macaca fascicularis*, также называемых «макаками-крабоедами» массой 2.3-5.1 кг рандомизировали по массе и делили на 5 групп по 3 обезьяны на группу. Обезьянам делали одну инфузию 4 мг/кг антитела длительностью один час в периферийную вену. Образцы крови (1 мл) забирали из другой вены через 5 минут-90 дней после завершения инфузии, преобразовывали в сыворотку и хранили при -70°C. Во время данных исследований животные не пострадали.

Концентрации антител определяли с использованием способа «захвата» (фиксации) VEGF, как описано выше. ФК параметры определяли путем подгонки зависимости «концентрации-время» к некомпартментной модели, как осуществляли в ФК исследованиях мышей. Однако моменты времени день 10 - день 90 использовали для определений ФК параметров. ФК результаты изображены на графике на фиг. 22, а подобранные параметры приведены на фиг. 23. Данные результаты показывают, что варианты увеличивали время полужизни антитела *in vivo* до 3.2 раз. В лучшем случае (вариант 428L/434S) время полужизни увеличивали от 9.7 дней до 31.1 дней. ФК результаты, полученные у яванских макак, сопоставимы с результатами, полученными у мышей $niFcRn^{-/-}$ $hFcRn^{+}$, что обосновывает модель мыши $hFcRn$ в качестве системы для определения ФК свойств вариантов *in vivo* и подтверждает результаты указанных исследований.

В то время как конкретные варианты реализации настоящего изобретения были описаны выше для иллюстрации, для специалистов в данной области техники очевидно, что могут быть осуществлены многочисленные вариации в объеме настоящего изобретения, который определяется прилагаемой формулой изобретения. Содержание

всех указанных источников полностью включено в настоящее описание.

(57) Формула изобретения

1. Рекомбинантное антитело против C5, имеющее повышенное связывание с FcRn
5 мыши или человека по сравнению с нативным полипептидом Fc IgG1, содержащее
вариант Fc нативного полипептида Fc IgG1 дикого типа, где указанный вариант Fc
включает 428L/434S/259I и где нумерация приведена согласно индексу EU.

2. Рекомбинантное антитело против C5 по п. 1, которое выбрано из группы,
10 состоящей из химерного антитела, гуманизированного антитела или человеческого
антитела.

3. Нуклеиновая кислота, которая кодирует рекомбинантное антитело против C5 по
любому из пп.1-2.

4. Экспрессирующий вектор, который включает нуклеиновую кислоту по п. 3.

5. Клетка-хозяин, экспрессирующая рекомбинантное антитело против C5 по любому
15 из пп.1-2, включающая экспрессирующий вектор по п. 4.

6. Способ получения рекомбинантного антитела против C5 по любому из пп. 1-2,
который включает культивирование клеток по п. 5 в условиях, подходящих для
экспрессии указанного антитела.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> XENCOR, INC.
 LAZAR, GREGORY
 CHAMBERLAIN, AARON KEITH
 DAHIYAT, BASSIL I.
 DESJARLAIS, JOHN R.
 KARKI, SHER BAHADUR

<120> Fc VARIANTS WITH ALTERED BINDING TO FcRn

<130> 5026-WO03

<140> PCT/US2008/088053
 <141> 2008-12-22

<150> 61/016,793
 <151> 2007-12-26

<150> 61/ 031,353
 <151> 2008-02-25

<150> 61/046,353
 <151> 2008-04-18

<150> 61/050,172
 <151> 2008-05-02

<150> 61/079,779
 <151> 2008-07-10

<150> 61/099,178
 <151> 2008-09-22

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

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

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 3

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 4
<211> 377
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 5

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

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

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 6

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG1/2 constant heavy chain (CH1-hinge-CH2-CH3))

<400> 6

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 7
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IgG1 259I/308F

<400> 7

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

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

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

Страница 11

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Phe Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 8
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IgG1 434S/428L

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 9

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG2 434S

<400> 9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 10
<211> 326
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IgG2 434S/428L

<400> 10

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

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

<210> 11
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IgG1/2 434S

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgG1/2 434S/428L

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 13
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-VEGF VH

<400> 13

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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-VEGF VL

<400> 14

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 15

<211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Anti-TNF VH

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Anti-TNF VL

<400> 16

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 Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-CD25

<400> 17

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Arg Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-CD25 VL

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19
<211> 119
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-EGFR VH

<400> 19

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Thr Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-EGFR VL

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Asn

20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 21
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Anti-IgE VH
 <400> 21
 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 Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-IgE VL

<400> 22

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

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

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 23
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-TNF light chain

<400> 23

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 Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 24
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-TNF heavy chain IgG1 259I/308F

<400> 24

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 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

Страница 30

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 Ile 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 Phe 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 Glu Glu Met 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> 25
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-TNF heavy chain IgG1 434S/428L

<400> 25

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met 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 Leu
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 <210> 26
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Anti-TNF heavy chain IgG2 434S
 <400> 26
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

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

 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
290 295 300

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

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

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 27
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Anti-TNF heavy chain IgG2 434S/428L

<400> 27

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
290 295 300

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

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

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu
420 425 430

His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 28

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-TNF heavy chain IgG1/2 434S

<400> 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 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 Pro Val Ala 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 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

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

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

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

325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met 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 Met
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 Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 29
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-TNF heavy chain IgG1/2 434S/428L

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 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 Pro Val Ala 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 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

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

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

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

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met 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 Met
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 Leu His
420 425 430

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

Gly Lys
450

<210> 30

<211> 489

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-TNF Fc fusion with IgG1 Fc

<400> 30

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly

180	185	190
Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser		
195	200	205
Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser		
210	215	220
Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser		
225	230	235 240
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly		
245	250	255
Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
260	265	270
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
275	280	285
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
290	295	300
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
305	310	315 320
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
325	330	335
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
340	345	350
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
355	360	365
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
370	375	380
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
385	390	395 400

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
405 410 415

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
420 425 430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
435 440 445

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
450 455 460

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485

<210> 31

<211> 488

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-TNF Fc fusion with IgG2 Fc

<400> 31

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
245 250 255

Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
260 265 270

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
275 280 285

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

290 295 300
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 325 330 335
 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 340 345 350
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 355 360 365
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 370 375 380
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 385 390 395 400
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 405 410 415
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 420 425 430
 Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 435 440 445
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 450 455 460
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 465 470 475 480
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485
 <210> 32
 <211> 489
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-TNF Fc fusion with IgG1 259I/308F Fc

<400> 32

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
245 250 255

Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
260 265 270

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
275 280 285

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val
290 295 300

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
305 310 315 320

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
325 330 335

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Phe Leu His
340 345 350

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
355 360 365

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
370 375 380

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
385 390 395 400

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

405 410 415

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
420 425 430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
435 440 445

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
450 455 460

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485

<210> 33
<211> 489
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-TNF Fc fusion with IgG1 428L/434S Fc

<400> 33

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys

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

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
305 310 315 320

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
325 330 335

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
340 345 350

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
355 360 365

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
370 375 380

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
385 390 395 400

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
405 410 415

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
420 425 430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
435 440 445

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
450 455 460

Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln
465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485

<210> 34

<211> 488

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-TNF Fc fusion with IgG2 434S Fc

<400> 34

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser

Страница 54

195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
245 250 255

Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
260 265 270

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
275 280 285

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
290 295 300

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
305 310 315 320

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
325 330 335

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
340 345 350

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
355 360 365

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
370 375 380

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
385 390 395 400

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
405 410 415

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
420 425 430

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
435 440 445

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
450 455 460

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys
465 470 475 480

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485

<210> 35
<211> 488
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-TNF Fc fusion with IgG2 428L/434S Fc

<400> 35

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
245 250 255

Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
260 265 270

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
275 280 285

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
290 295 300

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

305 310 315 320
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 325 330 335
 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 340 345 350
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 355 360 365
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 370 375 380
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 385 390 395 400
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 405 410 415
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 420 425 430
 Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 435 440 445
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 450 455 460
 Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys
 465 470 475 480
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485

CNI																						
Индекс	EU	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138
IgG1		A	S	T	K	O	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	O	O
IgG2		A	S	T	K	O	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S
IgG3		A	S	T	K	O	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	G	G
IgG4		A	S	T	K	O	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S
Индекс	EU	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159
IgG1		T	A	A	L	O	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
IgG2		T	A	A	L	O	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
IgG3		T	A	A	L	O	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
IgG4		T	A	A	L	O	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
Индекс	EU	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
IgG1		S	G	A	L	T	S	O	V	H	T	F	P	A	Y	L	Q	S	S	O	L	Y
IgG2		S	G	A	L	T	S	O	V	H	T	F	P	A	Y	L	Q	S	S	O	L	Y
IgG3		S	G	A	L	T	S	O	V	H	T	F	P	A	Y	L	Q	S	S	O	L	Y
IgG4		S	G	A	L	T	S	O	V	H	T	F	P	A	Y	L	Q	S	S	O	L	Y
Индекс	EU	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201
IgG1		S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N
IgG2		S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	N	E	G	T	Q	T	Y	T	C	N
IgG3		S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	T	C	N
IgG4		S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	K	T	Y	T	C	N
Индекс	EU	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220		
IgG1		V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	R	V	E	P	K	S	C	
IgG2		V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	T	Y	E	R	K	C	C		
IgG3		V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	Y	E	L	K	T	P		
IgG4		V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	S	K	Y	G		
		Fc >																				
Индекс	EU	221	222	223	224	225	226	227	230													
IgG1		D		K	T	H	T	C	P	P												

ФИГУРА 1 (продолжение)

CH2																													
Индекс EU	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257								
lgG1	Q	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P								
lgG2	Q	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P								
lgG3	Q	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P								
lgG4	Q	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P								
Индекс EU		258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280					
lgG1	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y								
lgG2	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y								
lgG3	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y								
lgG4	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y								
Индекс EU		279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300						
lgG1	V	D	O	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T								
lgG2	V	D	O	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T								
lgG3	V	D	O	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T								
lgG4	V	D	O	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T								
Индекс EU		300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320							
lgG1	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K								
lgG2	F	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K								
lgG3	F	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K								
lgG4	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K								
Индекс EU		321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340								
lgG1	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K									
lgG2	C	K	V	S	N	K	Q	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K									
lgG3	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K									
lgG4	C	K	V	S	N	K	Q	L	P	S	S	I	E	K	T	I	S	K	A	K									
CH1																													
Индекс EU	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361								
lgG1	Q	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	DE	E	LM	T	K	N								
lgG2	Q	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N								
lgG3	Q	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N								
lgG4	Q	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	Q	E	E	M	T	K	N								
Индекс EU		362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382							
lgG1	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E								
lgG2	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E								
lgG3	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E								
lgG4	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E								
Индекс EU		383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403							
lgG1	S	N	Q	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	Q	S								
lgG2	S	N	Q	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	M	L	D	S	D	Q	S								
lgG3	S	S	Q	Q	P	E	N	N	Y	N	T	T	P	P	M	L	D	S	D	Q	S								
lgG4	S	N	Q	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	Q	S								
Индекс EU		404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424							
lgG1	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	Q	N	V	F	S								
lgG2	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	Q	N	V	F	S								
lgG3	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	Q	N	V	F	S								
lgG4	F	F	L	Y	S	R	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	E	Q	N	V	F	S								
Индекс EU		425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445							
lgG1	C	S	V	M	H	E	AO	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P								
lgG2	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P								
lgG3	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	R	P	T	Q	K	S	L	S	L	S	P								
lgG4	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P								
Индекс EU		446	447																										
lgG1	G	K																											
lgG2	G	K																											
lgG3	G	K																											
lgG4	G	K																											

3/30

ФИГУРА 2

Каппа-константная легкая цепь (SEQ ID NO:1)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Константная тяжелая цепь IgG1 (CH1-шарнир-CH2-CH3) (SEQ ID NO:2)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

Константная тяжелая цепь IgG2 (CH1-шарнир-CH2-CH3) (SEQ ID NO:3)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN
GKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Константная тяжелая цепь IgG3 (CH1-шарнир-CH2-CH3) (SEQ ID NO:4)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPPEPKSCDTPPPCPRC
PEPKSCDTPPPCPRCPPEPKSCDTPPPCPRCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKA
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQENNYN
TTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCFSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK

Константная тяжелая цепь IgG4 (CH1-шарнир-CH2-CH3) (SEQ ID NO:5)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGK

Константная тяжелая цепь IgG1/2 (CH1-шарнир-CH2-CH3) (SEQ ID NO:6)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD
WLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

4/30

ФИГУРА 3

IgG1 259I/308F (SEQ ID NO:7)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEITCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTLFHLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

IgG1 434S/428L (SEQ ID NO:8)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTLVHLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSL
SLSPGK

IgG2 434S (SEQ ID NO:9)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYTQKSLSL
SPGK

IgG2 434S/428L (SEQ ID NO:10)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSLSL
SPGK

IgG1/2 434S (SEQ ID NO:11)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYTQKSL
SLSPGK

IgG1/2 434S/428L (SEQ ID NO:12)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSL
SLSPGK

5/30

Фигура 4

Anti-VEGF VH (SEQ ID NO:13)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAA
DFKRRTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLLTVSS

Anti-VEGF VL (SEQ ID NO:14)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGS
GSGDFTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVEIK

Anti-TNF VH (SEQ ID NO:15)

EVQLVESGGGLVQPGRSRLSCAASGFTDDYAMHWRQAPGKGLEWVSATWNSGHIDYADS
VEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLTVSS

Anti-TNF VL (SEQ ID NO:16)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGS
GSGDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK

Anti-CD25 VH (SEQ ID NO:17)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYRMHWRQAPGQGLEWMGWINPSTGYTEYNQ
KFQGRVTITADKSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGGGVFVDYWGQGTLLTVSS

Anti-CD25 VL (SEQ ID NO:18)

QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSISYMHWFQKKPGQSPQLLIYTTSNLASGVPARFSGS
SGTDYTLTISLQPEDFAVYYCHQRSTYPLTFGSGTKLEIK

Anti-EGFR VH (SEQ ID NO:19)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSNYGVHWRQAPGKGLEWMGIHWSGGSTDYSTSL
KSRLTISKDTSKSQVLTMTNMPVDATYYCARALTYDYEFAYWGQGTLLTVSS

Anti-EGFR VL (SEQ ID NO:20)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSNLHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGVPSRFSGS
SGDFTLTISLQAEDVAVYYCQNNNWPTTFGQGTKLEIK

Anti-IgE VH (SEQ ID NO:21)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNRQAPGKGLEWVASITYDGSTNYNPSV
KGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGTLLTVSS

Anti-IgE VL (SEQ ID NO:22)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSDYDGDSYMNYQQKPGKAPKLLIYAASYLESGVPSR
FSGSGSGDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIK

ФИГУРА 5

Легкая цепь анти-TNF (SEQ ID NO:23)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGS
 GSGTDFLTISLQPEDVATYYCQRYNRPAYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Тяжелая цепь анти-TNF IgG1 259I/308F (SEQ ID NO:24)

EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLTGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Тяжелая цепь анти-TNF IgG1 434S/428L (SEQ ID NO:25)

EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLTGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Тяжелая цепь анти-TNF IgG2 434S (SEQ ID NO:26)

EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 EYTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKC
 KVSNGKLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Тяжелая цепь анти-TNF IgG2 434S/428L (SEQ ID NO:27)

EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 EYTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKC
 KVSNGKLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Тяжелая цепь анти-TNF IgG1/2 434S (SEQ ID NO:28)

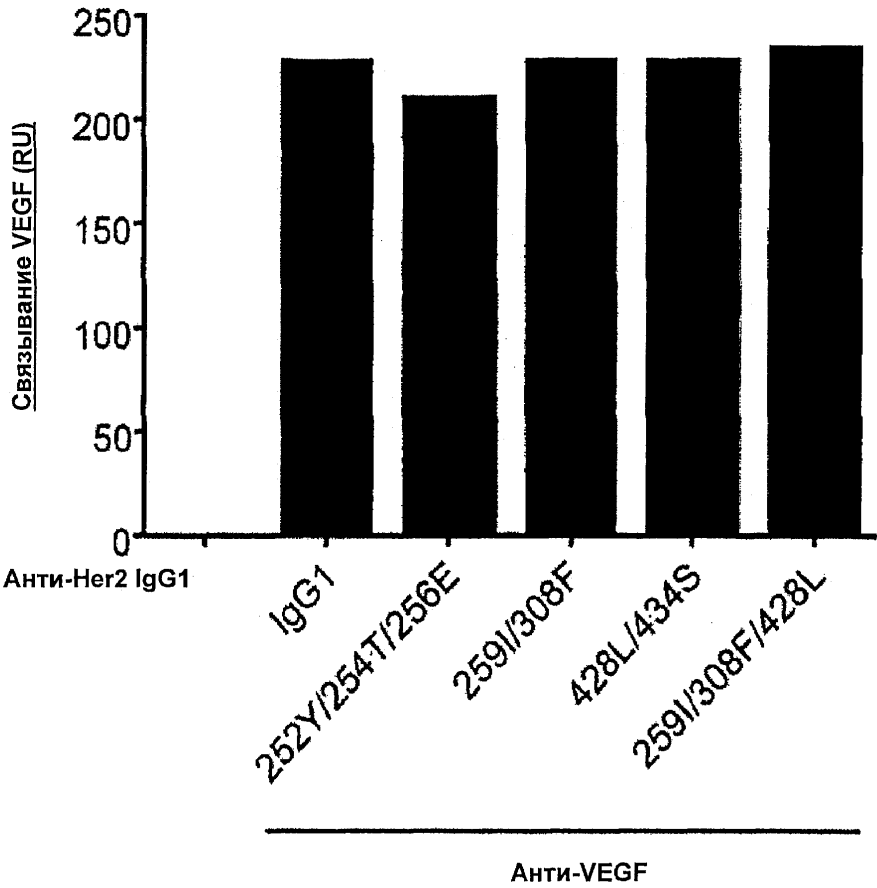
EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLTGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHSHYTQKSLSLSPGK

ФИГУРА 5 (продолжение)

Тяжелая цепь анти-TNF IgG1/2 434S/428L (SEQ ID NO:29)

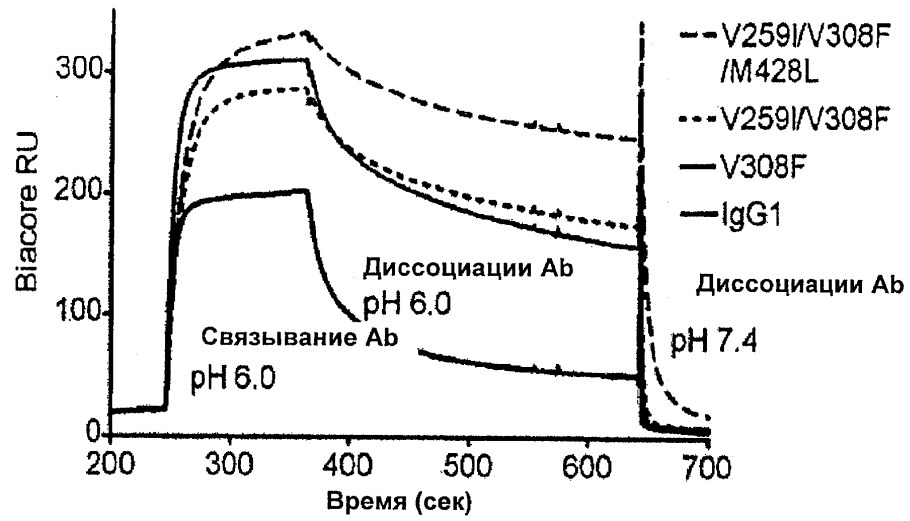
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGT LVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSODKHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

ФИГУРА 6

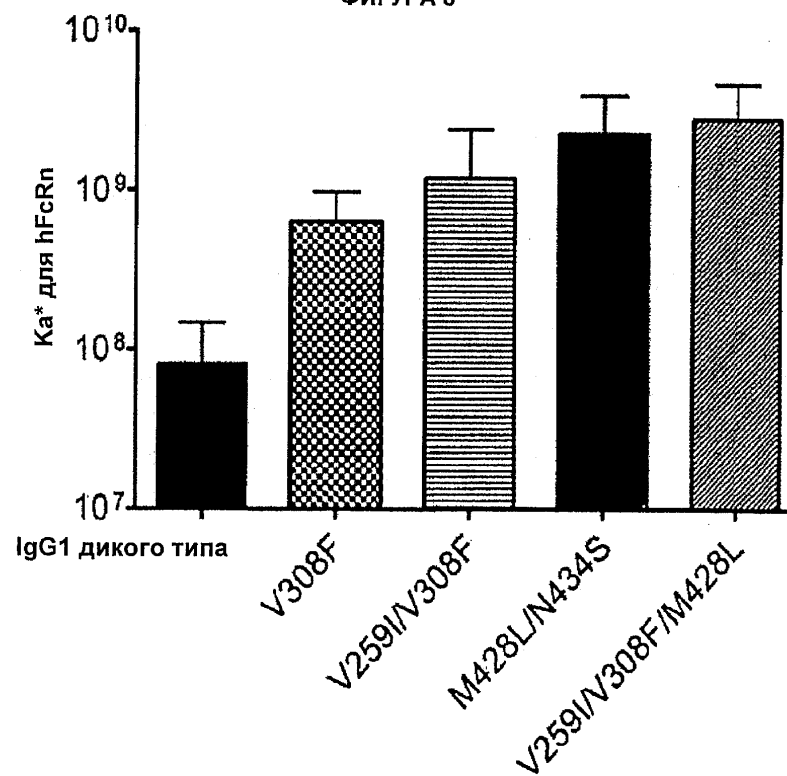


8/30

ФИГУРА 7



ФИГУРА 8



9/30

ФИГУРА 9

Вариант	IgG	Fv	n	Кратность Среднее	FcRn SD
WT	IgG1	Anti-VEGF		1.00	
T250I	IgG1	Anti-VEGF	1	1.31	
M252Q	IgG1	Anti-VEGF	5	2.36	3.07
M252Y	IgG1	Anti-VEGF	2	4.82	0.62
M252E	IgG1	Anti-VEGF	1	NB	
M252P	IgG1	Anti-VEGF	1	0.03	
M252R	IgG1	Anti-VEGF	1	0.02	
M252D	IgG1	Anti-VEGF	1	NB	
M252K	IgG1	Anti-VEGF	1	0.64	
R255Y	IgG1	Anti-VEGF	1	1.24	
P257L	IgG1	Anti-VEGF	1	3.39	
P257N	IgG1	Anti-VEGF	1	3.53	
V259I	IgG1	Anti-VEGF	2	1.14	0.19
V259F	IgG1	Anti-VEGF	1	1.44	
V259G	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259H	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259M	IgG1	Anti-VEGF	1	0.68	
V259N	IgG1	Anti-VEGF	1	1.87	
V259S	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259T	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259W	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259Y	IgG1	Anti-VEGF		ND	
T307Q	IgG1	Anti-VEGF	1	3.41	
T307N	IgG1	Anti-VEGF	1	0.83	
T307G	IgG1	Anti-VEGF	1	1.72	
V308F	IgG1	Anti-VEGF	6	4.96	1.05
Y319L	IgG1	Anti-VEGF	1	1.43	
Y319I	IgG1	Anti-VEGF	2	1.48	0.53
Y319A	IgG1	Anti-VEGF	1	2.68	
Y319G	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319H	IgG1	Anti-VEGF	1	1.81	
Y319M	IgG1	Anti-VEGF	1	1.95	
Y319N	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319Q	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319S	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319T	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319V	IgG1	Anti-VEGF	1	2.03	

10/30

ФИГУРА 9 (продолжение)

Вариант	IgG	Fv	n	Кратность Среднее	F_{CR} SD
Y319W	IgG1	Anti-VEGF	1	1.51	
E380A	IgG1	Anti-VEGF		ND	
E380Q	IgG1	Anti-VEGF	1	2.01	
E380R	IgG1	Anti-VEGF	1	3.41	
E380S	IgG1	Anti-VEGF	1	2.55	
E380V	IgG1	Anti-VEGF		ND	
M428L	IgG1	Anti-VEGF	3	3.00	0.37
N434A	IgG1	Anti-VEGF	4	2.15	0.54
N434S	IgG1	Anti-VEGF	6	3.77	0.79
N434M	IgG1	Anti-VEGF	3	4.83	1.23
N434T	IgG1	Anti-VEGF	1	3.32	
N434V	IgG1	Anti-VEGF		ND	
N434Y	IgG1	Anti-VEGF		ND	
P245Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	2.89	
T250I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	6.75	0.10
T250Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	3	6.30	0.82
M252Y/V259I	IgG1	Anti-VEGF	1	3.56	
M252Q/V259I	IgG1	Anti-VEGF	1	0.14	
M252Q/T307Q	IgG1	Anti-VEGF	1	0.43	
M252Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	1.04	
M252Y/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	9.63	0.32
M252Q/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	0.21	
M252Y/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	2.37	
M252Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	0.35	
M252Y/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	5.32	
M252Y/N434A	IgG1	Anti-VEGF	1	11.94	
M252Y/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	11.46	2.73
M252Q/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	0.20	
M252Q/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	0.48	
M252Y/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	2.79	
M252Y/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	61.60	
S254T/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	3.56	
T256V/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	5.04	1.94
T256E/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	35.53	
V259M/V308F	IgG1	Anti-VEGF	12	9.79	2.72
V259A/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	4.81	
V259L/V308F	IgG1	Anti-VEGF		ND	

11/30

ФИГУРА 9 (продолжение)

Вариант	IgG	Fv	n	Кратность Среднее	FcRn SD
V259I/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	2.00	
V259I/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	4.53	
V259I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	5.67	
V259I/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	0.87	
V259I/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	24.81	
L308I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	7.92	
T307P/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	3.17	
T307Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	5.57	0.69
T307S/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	5.22	
T307Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	7.25	
T307Q/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	14.18	
T307Q/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	1.99	
T307Q/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	50.43	
V308F/L308Y	IgG1	Anti-VEGF	1	5.37	
V308F/L308N	IgG1	Anti-VEGF	1	1.00	
V308F/Q311P	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V308F/Y319L	IgG1	Anti-VEGF	2	5.84	0.30
V308F/Y319F	IgG1	Anti-VEGF	1	3.10	
V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	4	13.71	2.13
V308F/N434M	IgG1	Anti-VEGF	2	4.20	0.78
V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	14.63	0.28
V308F/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	41.55	
Q311A/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	27.42	
Y319I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	3	4.93	0.82
Y319I/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	4.70	
Y319I/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	4.22	
Y319I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	4.42	
Y319I/N434Y	IgG1	Anti-VEGF		ND	
M428L/N434A	IgG1	Anti-VEGF	1	12.74	
M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	14	17.28	6.70
M428L/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	1.88	
M428L/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	39.54	
N434S/Y438F	IgG1	Anti-VEGF	1	4.43	
N434S/Y438M	IgG1	Anti-VEGF	1	2.58	
T250I/V259I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	11.29	
T250Q/V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	17.08	
T250I/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	12.26	

12/30

ФИГУРА 9 (продолжение)

Вариант	IgG	Fv	n	Кратность Среднее	FcRn SD
M252Y/S254T/T256E	IgG1	Anti-VEGF	10	11.37	2.90
M252Q/V259I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	0.65	
M252Y/V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	10.62	
M252Q/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	2.37	
M252Y/V308F/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	11.09	
M252Y/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	12.13	
M252Q/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	1.90	
V259I/T307Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	7.40	1.54
V259I/V308F/Y319L	IgG1	Anti-VEGF	1	3.53	
V259I/V308F/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	4.10	
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	13	19.94	10.46
V259I/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	3	10.86	3.38
V259I/V308F/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	7.06	
V259I/Y319I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	7.90	
V259I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	9.57	
V259I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	11.91	
T307Q/V308F/Y319L	IgG1	Anti-VEGF	1	4.24	
T307Q/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	4.04	
V308F/Y319I/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	10.20	
V308F/Y319I/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	NF	
V308F/Y319I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	12.39	5.63
V308F/Y319I/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	3.78	
V308F/Y319I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	NF	
V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	5	16.68	4.89
V308F/M428L/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	8.14	
Y319I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	13.90	
M252Y/S254T/T256E/N434A	IgG1	Anti-VEGF	1	11.37	
M252Y/S254T/T256E/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	10.29	2.99
M252Y/S254T/T256E/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	9.84	4.04
M252Y/S254T/T256E/M428L	IgG1	Anti-VEGF	2	11.43	8.01
M252Y/S254T/T256E/T307Q	IgG1	Anti-VEGF	1	13.50	
M252Y/S254T/T256E/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	3.82	
V259I/V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	24.22	
V259I/V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	14.23	0.75
V308F/Y319I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	10.37	
M252Y/S254T/T256E/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	7.21	

13/30

Вариант	ФИГУРА 10		n	Кратность FcRn	
	IgG	Fv		Среднее	SD
WT	IgG2	Anti-VEGF	1	1.00	
V259I	IgG2	Anti-VEGF	1	1.02	
V308F	IgG2	Anti-VEGF	2	3.66	2.07
M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	4.19	
N434A	IgG2	Anti-VEGF	1	3.83	
N434S	IgG2	Anti-VEGF	2	4.88	1.05
N434G	IgG2	Anti-VEGF	1	1.60	
N434H	IgG2	Anti-VEGF	1	1.45	
N434M	IgG2	Anti-VEGF	1	1.51	
N434T	IgG2	Anti-VEGF	1	1.22	
N434Y	IgG2	Anti-VEGF	1	21.39	
N434D	IgG2	Anti-VEGF	1	NB	
N434E	IgG2	Anti-VEGF	1	NB	
N434F	IgG2	Anti-VEGF	1	16.79	
N434K	IgG2	Anti-VEGF	1	NB	
N434P	IgG2	Anti-VEGF	1	0.26	
N434R	IgG2	Anti-VEGF	1	0.44	
N434V	IgG2	Anti-VEGF	1	0.48	
N434W	IgG2	Anti-VEGF	1	39.81	
T250Q/M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	7.62	
V259I/V308F	IgG2	Anti-VEGF	1	8.58	
V308F/M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	16.13	
V308F/N434S	IgG2	Anti-VEGF	1	16.36	
M428L/N434S	IgG2	Anti-VEGF	1	14.80	
M252Y/S254T/T256E	IgG2	Anti-VEGF	1	8.34	
V259I/V308F/M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	15.29	

ФИГУРА 10 (продолжение)

Вариант	IgG	Fv	п	Кратность Среднее	FcRn SD
WT	IgG1/2	Anti-VEGF		1.00	
N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.28	
L251A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.65	
L251F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.95	
L251I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.28	
L251M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.83	
L251N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.34	
L251V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.31	
R255H/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.23	
R255Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.53	
T307M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.09	
T307V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.25	
Q311A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.35	
Q311D/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.39	
Q311E/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.94	
Q311F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.95	
Q311G/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.26	
Q311I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	15.81	
Q311K/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.57	
Q311L/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	9.00	
Q311M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	9.12	
Q311N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.27	
Q311P/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.56	
Q311R/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.96	
Q311T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.17	
Q311V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	14.17	
Q311W/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.97	
Q311Y/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.65	
L314P/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.35	
L314I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.54	
L314M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.05	
L314Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.75	
L314V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.34	
H429N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.78	
H429V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.69	
E430A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.24	
E430D/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.79	

15/30

ФИГУРА 10 (продолжен)

Вариант	IgG	Fv	n	Кратность FcRn Среднее SD
E430F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.79
E430I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.27
E430L/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.40
E430Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.20
E430S/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.58
E430T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.37
A431F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.21
A431G/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.31
A431H/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	6.29
A431M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.06
A431S/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.18
A431T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.46
A431V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.64
L432A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.83
L432F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.14
L432G/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.71
L432H/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.69
L432I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.96
L432N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.43
L432Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.59
L432V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.24
H433A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.41
H433D/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.75
H433E/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.73
H433F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.78
H433I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.94
H433K/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.65
H433L/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.14
H433M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.91
H433P/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	6.33
H433S/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.68
H433T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.88
H433V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.41
H433Y/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.58
N434S/Y436A	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.03
N434S/Y436D	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.79
N434S/Y436E	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.36

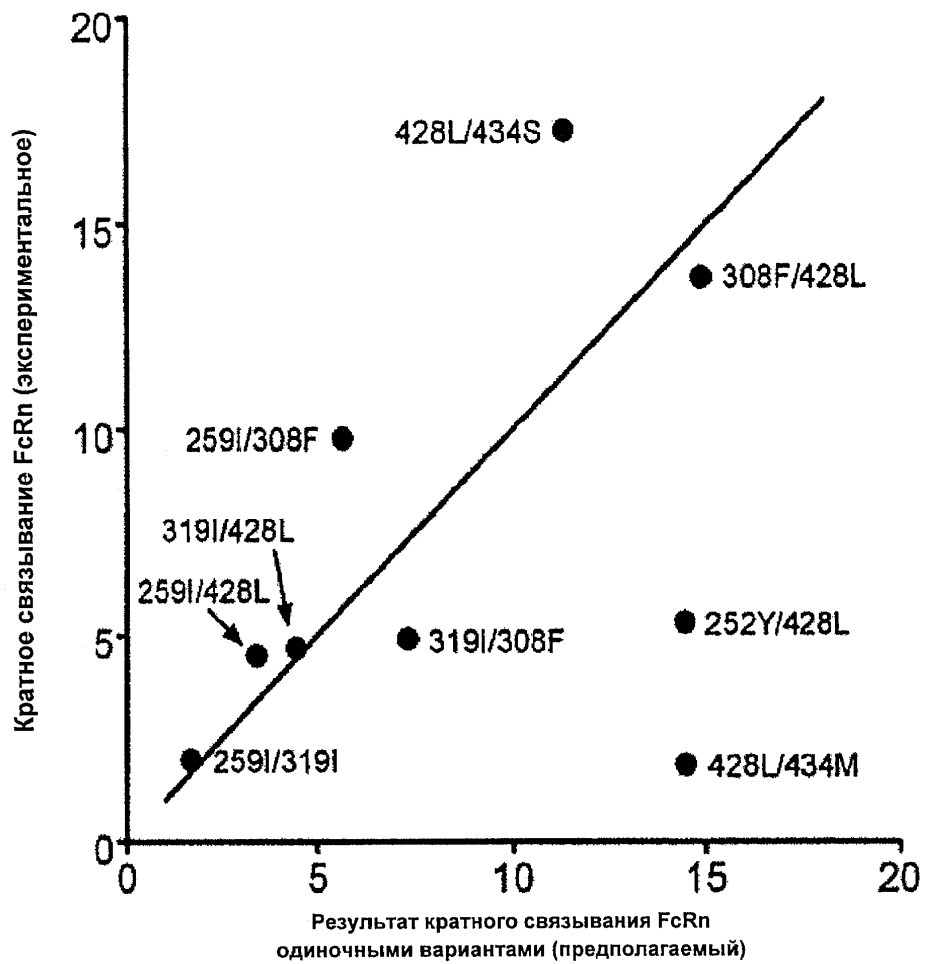
16/30

ФИГУРА 10 (продолжение)

Вариант	IgG	Fv	1 Кратность Среднее	1 FcRn SD
N434S/Y436G	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.24
N434S/Y436H	IgG1/2	Anti-VEGF	1	7.63
N434S/Y436I	IgG1/2	Anti-VEGF	1	30.57
N434S/Y436K	IgG1/2	Anti-VEGF	1	9.00
N434S/Y436L	IgG1/2	Anti-VEGF	1	12.81
N434S/Y436N	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.39
N434S/Y436Q	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.14
N434S/Y436R	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.60
N434S/Y436S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	6.67
N434S/Y436T	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.71
N434S/Y436V	IgG1/2	Anti-VEGF	1	17.46
N434S/Y436W	IgG1/2	Anti-VEGF	1	19.47
N434S/T437I	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.96
G236R/L328R	IgG1	Anti-VEGF	1	1.25
V308F/I332E	IgG1	Anti-VEGF	1	4.15
I332E/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	3.91
G236A/V308F/I332E	IgG1/2 ELLG 327A	Anti-VEGF	1	1.82
G236A/I332E/N434S	IgG1/2 ELLG 327A	Anti-VEGF	1	3.87

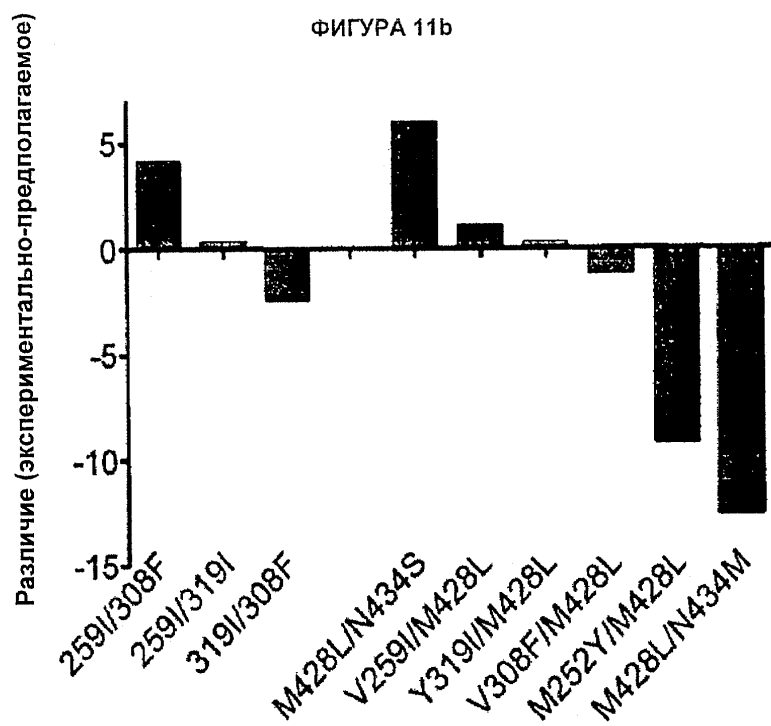
17/30

ФИГУРА 11а

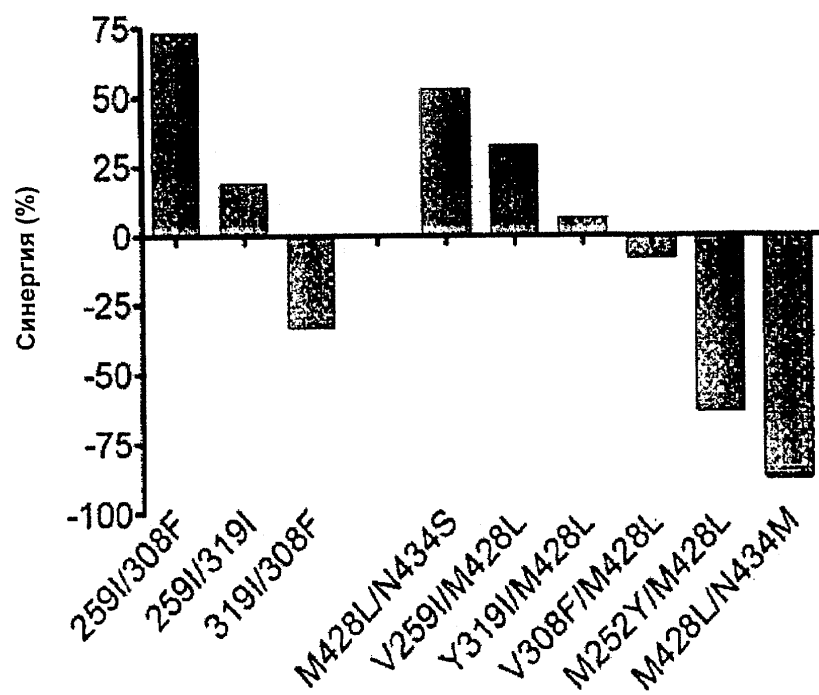


18/30

ФИГУРА 11b



ФИГУРА 11c



19/30

ФИГУРА 12a

Вариант	IgG	Fv	n	Кратность Среднее	FcRn SD
Дикий тип	IgG1	Anti-TNF		1.00	
V259I/V308F	IgG1	Anti-TNF	3	13.25	5.09
M428L/N434S	IgG1	Anti-TNF	2	19.76	4.42
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-TNF	2	49.85	5.09
G238RL/L328R	IgG1	Anti-TNF	1	0.99	
Дикий тип	IgG2	Anti-TNF		1.00	
N434S	IgG2	Anti-TNF	2	3.12	0.79
M428L/N434S	IgG2	Anti-TNF	3	19.99	8.69
L328R	IgG2	Anti-TNF	1	0.97	
L328R/M428L/N434S	IgG2	Anti-TNF	1	19.67	
Дикий тип	IgG1/2	Anti-TNF		1.00	
N434S	IgG1/2	Anti-TNF	2	7.22	0.16
M428L/N434S	IgG1/2	Anti-TNF	3	25.39	5.13
L328R	IgG1/2	Anti-TNF	1	1.87	
L328R/M428L/N434S	IgG1/2	Anti-TNF	1	39.90	

ФИГУРА 12b

Вариант	IgG	Fv	n	Кратность Среднее	FcRn SD
Дикий тип	IgG1	Anti-CD25		1.00	
V259I/V308F	IgG1	Anti-CD25	1	3.49	
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-CD25	1	19.97	
Дикий тип	IgG1/2	Anti-CD25		1.00	
N434S	IgG1/2	Anti-CD25	1	5.16	
M428L/N434S	IgG1/2	Anti-CD25	1	28.00	

20/30

ФИГУРА 12c

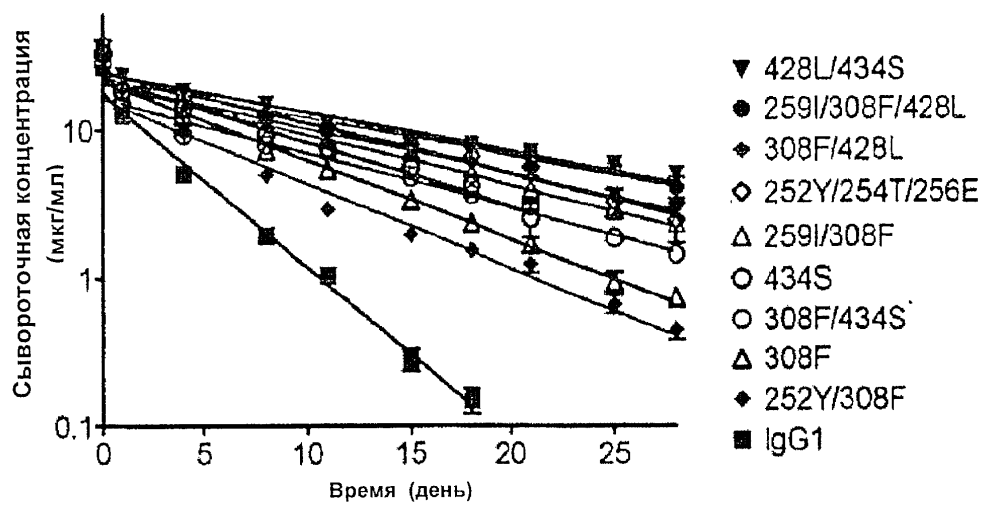
Вариант	IgG	Fv	n	Кратность Среднее	FcRn SD
Дикий тип	IgG1	Anti-EGFR		1.00	
V259I/V308F	IgG1	Anti-EGFR	3	14.23	8.51
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-EGFR	2	32.96	20.16
Дикий тип	IgG1/2	Anti-EGFR		1.00	
N434S	IgG1/2	Anti-EGFR	1	1.61	
N434S/M428L	IgG1/2	Anti-EGFR	1	5.93	

ФИГУРА 12d

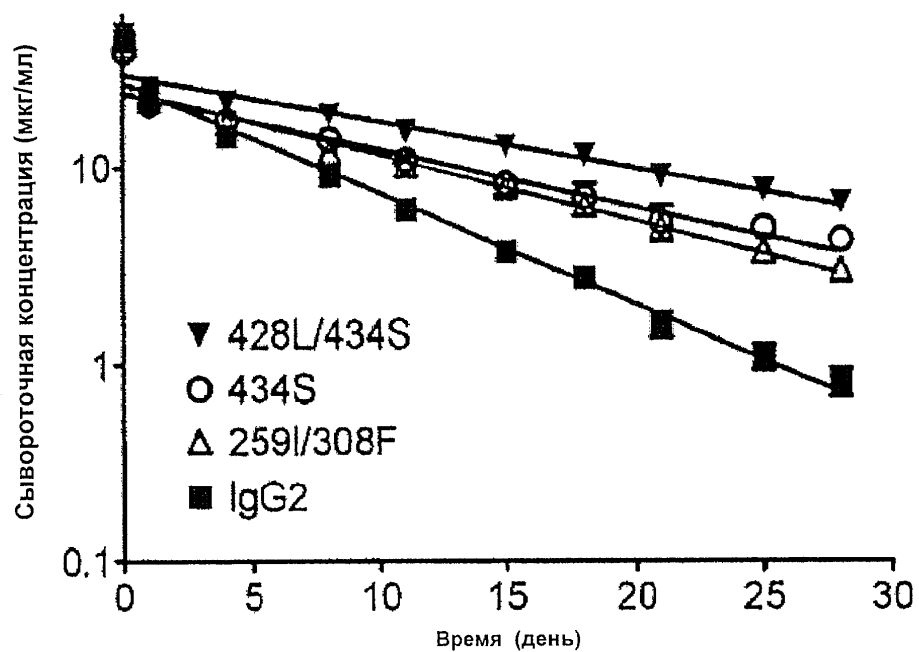
Вариант	IgG	Fv	n	Кратность Среднее	FcRn SD
Дикий тип	IgG1	Anti-IgE		1.00	
M428L	IgG1	Anti-IgE	1	3.06	
N434S	IgG1	Anti-IgE	1	4.38	
V259I/V308F	IgG1	Anti-IgE	1	8.34	
V308F/Y319I	IgG1	Anti-IgE	1	5.39	
V308F/M428L	IgG1	Anti-IgE	1	14.25	
M428L/N434S	IgG1	Anti-IgE	1	12.63	
M252Y/S254T/T256E	IgG1	Anti-IgE	1	9.58	
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-IgE	1	20.27	
V259I/V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-IgE	1	27.29	

21/30

ФИГУРА 13а



ФИГУРА 13б



22/30

ФИГУРА 14

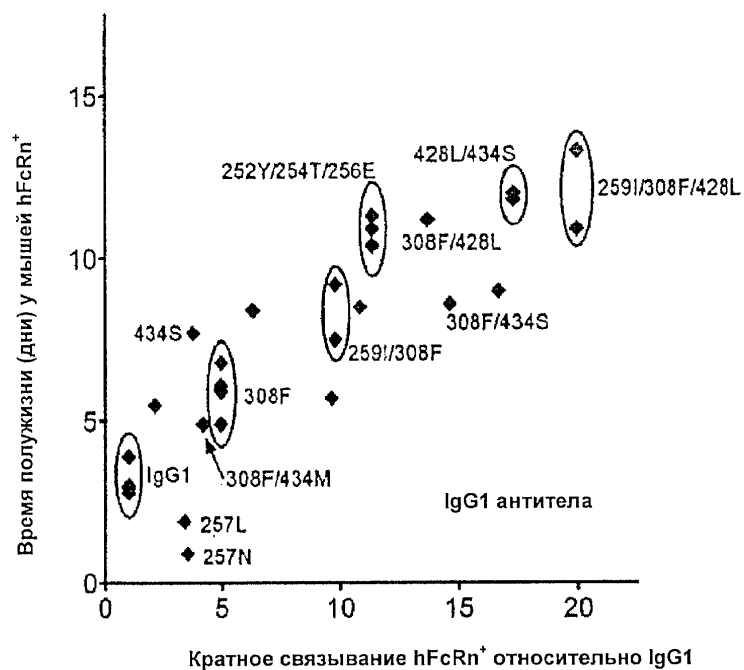
Вариант Fc	IgG	n	Время полужизни (день)			Cmax (мкг/мл)		ППК День*мкг/мл		Клиренс (мл/день/кг)	
			Среднее	SD	Кратность	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD
Исследование 1											
Дикий тип (нативный IgG1)	IgG1	6	3	0.5	1.0	28.5	7.3	69.8	8.4	29.1	4.2
P257L	IgG1	6	1.9	0.4	0.6	18.1	8.4	38	11.3	59.5	28.8
P257N	IgG1	6	0.9	0.1	0.3	30.1	4.7	38.2	6.1	53.4	8.8
V308F	IgG1	6	4.9	0.3	1.6	30.1	9.4	129.2	11	15.6	1.3
T250Q/M428L	IgG1	6	8.4	2.8	2.8	22.3	3.8	186	52.5	12	5.4
M252Y/S254T/T256E	IgG1	4	10.9	1.2	3.6	34.6	10.1	330.8	57.3	6.2	1.1
N434A	IgG1	6	5.5	2.1	1.6	24.5	6.2	143.1	26.9	14.3	2.2
Исследование 2											
Дикий тип (нативный IgG1)	IgG1	7	3.9	0.52	1.0	36	5.6	92	13	22	2.9
V308F	IgG1	7	6.8	0.99	1.7	28	8.7	152	34.6	14	3.4
M252T/S254T/T256E	IgG1	7	11.3	1.2	2.9	25	7	241	64.2	8.9	2.6
Исследование 3											
Дикий тип (нативный IgG1)	IgG1	6	2.8	0.3	1.0	27	6	69	10	29.4	4.6
V308F	IgG1	6	5.9	0.4	2.1	33	3	173	33	11.8	1.9
M252T/S254T/T256E	IgG1	6	10.4	1.5	3.7	34	6	317	67	6.6	1.5
N434S	IgG1	6	7.7	1.5	2.8	33	11	228	75	10	4.6
V259M/V308F	IgG1	6	9.2	1.5	3.3	36	5	262	47	7.9	1.4
V308F/M428L	IgG1	6	11.2	1.1	4.0	38	6	307	50	6.7	1.1
M252Y/V308F	IgG1	6	5.7	0.4	2.0	40	6	140	24	14.7	2.6
M428L/N434S	IgG1	6	12	2.9	4.3	37	9	400	112	5.5	2
V308F/N434S	IgG1	6	8.6	0.3	3.1	28	3	195	25	10.4	1.3
V259M/V308F/M428L	IgG1	6	13.3	2.7	4.8	37	6	383	68	5.3	0.8

ФИГУРА 14 (продолжение)

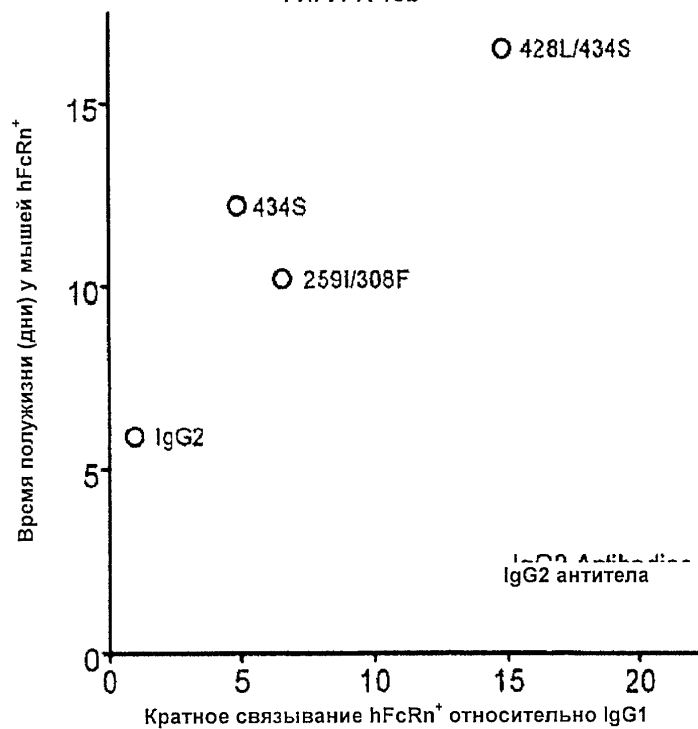
Вариант Fc	IgG	n	Время полужизни (день)			Cmax (мкг/мл)		ППК День*мкг/мл		Клиренс (мл/день/кг)	
			Среднее	SD	Кратность	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD
Исследование 4											
Дикий тип (нативный IgG1)	IgG1	6	2.9	0.4	1.0	32.5	3.1	72.7	5.8	27.6	2.3
M252Y/S254T/T256E	IgG1	6	11.3	1.6	3.9	40.6	5.8	378.5	60.7	5.4	0.8
V308F/N434M	IgG1	6	4.9	0.6	1.7	38.6	5.4	153.6	21.3	13.2	1.9
V259I/V308F	IgG1	6	7.5	0.8	2.6	37.9	3.8	234.5	23.1	8.6	0.9
V308F	IgG1	6	6.1	0.4	2.1	37.8	1.9	172.2	16.7	11.7	1.2
V308F/Y319I	IgG1	6	6	0.5	2.1	38.1	6.5	205.5	71	10.5	3.1
M428L/N434S	IgG1	6	11.8	0.6	4.1	42	4.6	392.4	52.2	5.2	0.7
V308F/M428L/N434S	IgG1	6	9	0.4	3.1	31.8	7.9	204.6	34.2	10	1.8
V259I/V308F/N434S	IgG1	6	8.5	1.8	2.9	33.4	7.3	254.9	29	7.9	0.9
V259I/V308F/M428L	IgG1	6	10.9	0.6	3.8	35	7.5	295.1	54.5	7	1.3
Исследование 5											
Дикий тип (нативный IgG1)	IgG2	6	5.9	0.9	1.0	43.8	5	212.3	33.8	9.6	1.5
N434S	IgG2	6	12.2	1.3	2.1	39.1	6.4	381.6	91.6	5.5	1.2
V259I/V308F	IgG2	6	10.2	0.6	1.7	42.3	1.3	342	21.2	5.9	0.4
M428L/N434S	IgG2	6	16.5	1.1	2.8	48	5.8	603.3	72.9	3.4	0.4

24/30

ФИГУРА 15а

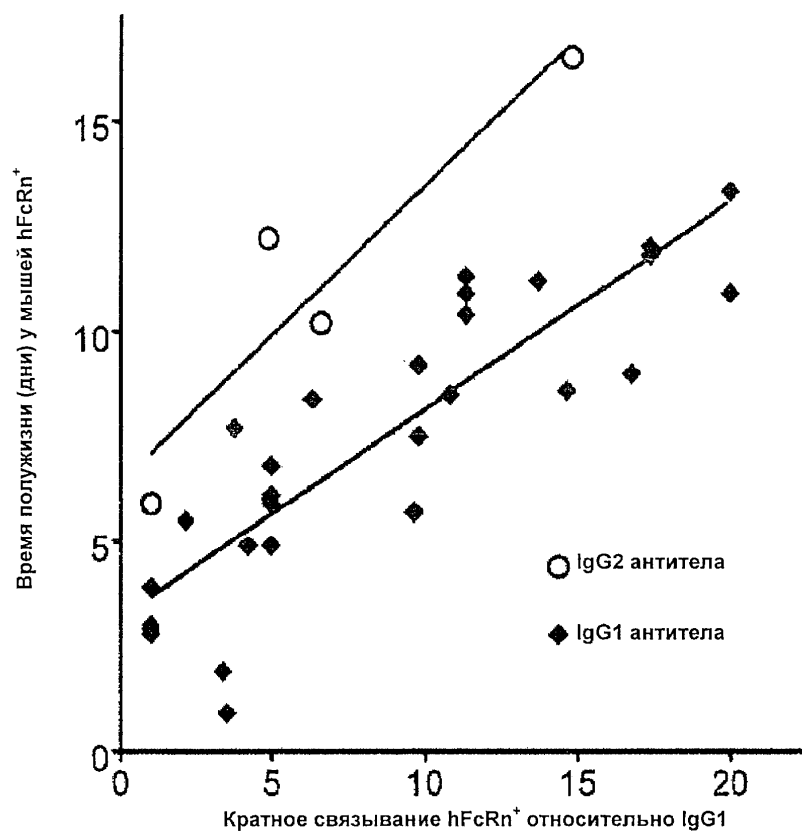


ФИГУРА 15b



25/30

ФИГУРА 15с



ФИГУРА 16

Гибрид Fc анти-THF с Fc IgG1 (SEQ ID NO:30)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSTNTSSTDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGSPSPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Гибрид Fc анти-THF с Fc IgG2 (SEQ ID NO:31)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSTNTSSTDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGSPSPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYS
 SKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФИГУРА 16 (продолжение)

Гибрид Fc анти-THF с Fc IgG1 259I/308F Fc (SEQ ID NO:32)

MAPVAVWAALAVGLELWAAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPPPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEITCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTFLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLY
 KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Гибрид Fc анти-THF с Fc IgG1 428L/434S Fc (SEQ ID NO:33)

MAPVAVWAALAVGLELWAAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPPPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTFLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLY
 KLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Гибрид Fc анти-THF с Fc IgG2 434S Fc (SEQ ID NO:34)

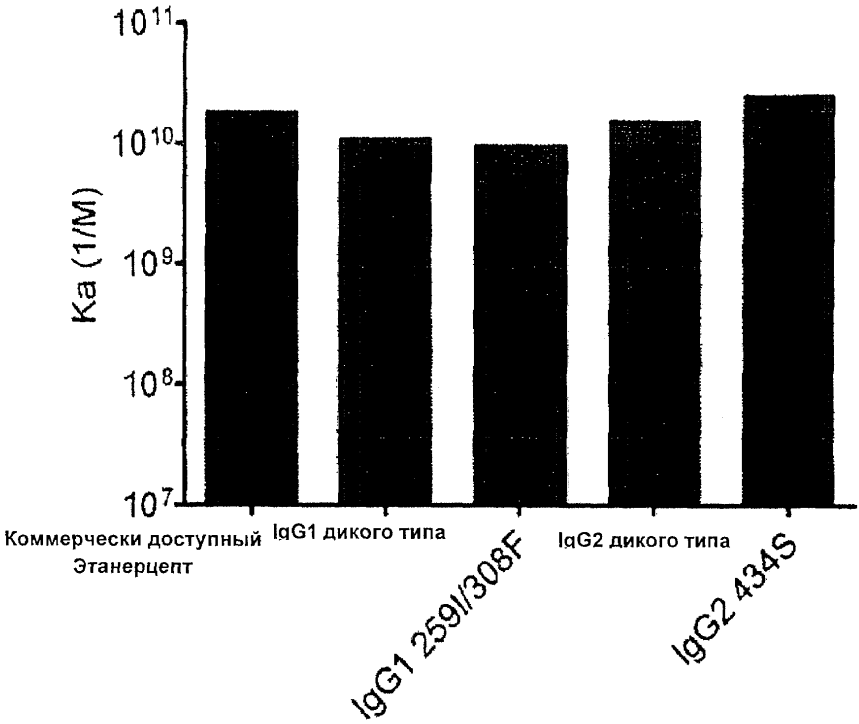
MAPVAVWAALAVGLELWAAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPPPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Гибрид Fc анти-THF с Fc IgG2 428L/434S Fc (SEQ ID NO:35)

MAPVAVWAALAVGLELWAAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPPPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

27/30

ФИГУРА 17

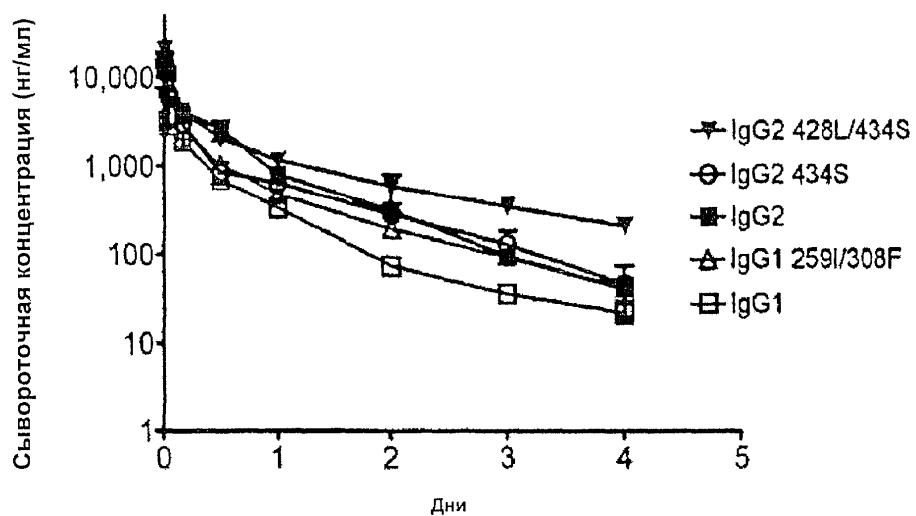


ФИГУРА 18

Вариант	Область Fc	«Партнер» по слиянию	n	Кратность FcRn Среднее SD	
Дикий тип	IgG1	TNFR	1.00		
V259I/V308F	IgG1	TNFR	4	4.86	2.22
M428L/N434S	IgG1	TNFR	2	7.24	1.57
Дикий тип	IgG2	TNFR	1.00		
N434S	IgG2	TNFR	3	6.93	2.02
M428L/N434S	IgG2	TNFR	3	11.78	4.33

28/30

ФИГУРА 19



ФИГУРА 20

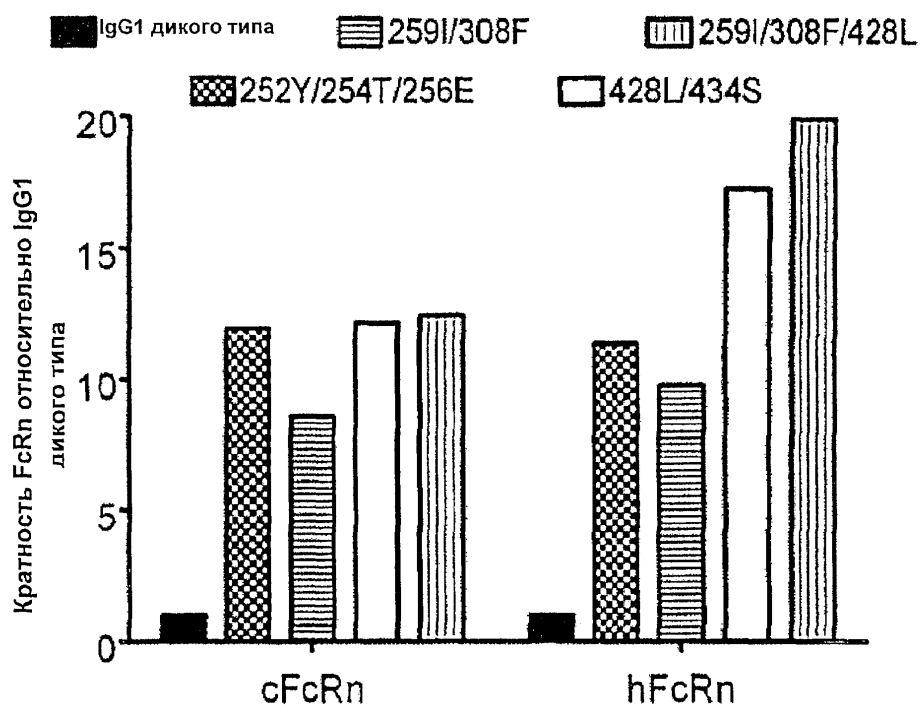
Вариант Fc	Fc	n	Время полужизни (день)	Увеличение (%)	C _{max} (нг/мл)	ППК (День*нг/мл)	Клиренс (мл/день/кг)
Дикий тип	IgG1	12	0.60	n/a	22253.3	1324.7	1177.7
V259I/V308F	IgG1	12	0.81	136	12175.6	2291.5	741.9
Дикий тип	IgG2	12	0.65	n/a	14580.2	3686.3	423.2
N434S	IgG2	12	0.77	119	12086.8	2531.3	655.8
M428L/N434S	IgG2	12	1.01	156	30676.7	4405.2	354.1

29/30

ФИГУРА 21а

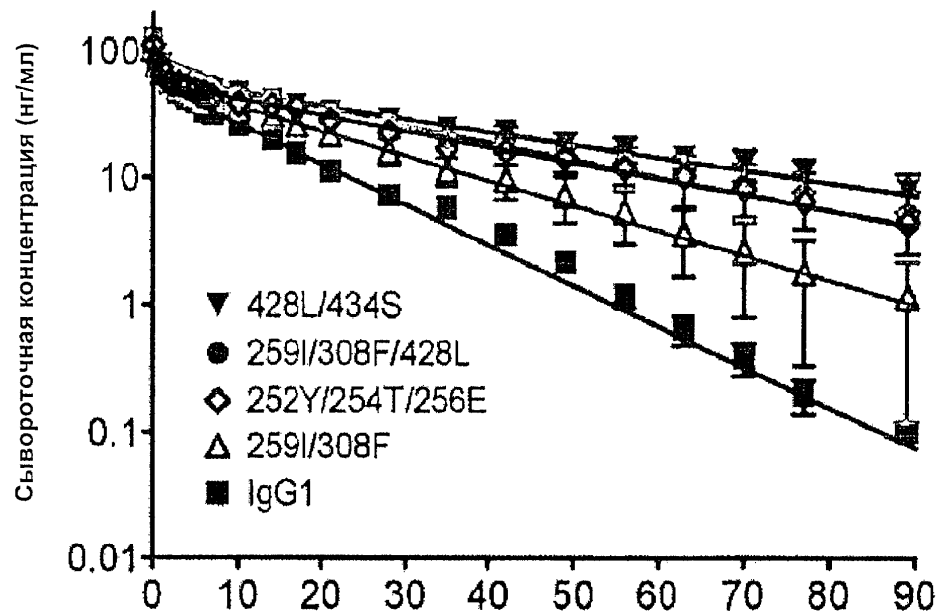
	Кратность супоFcRn человека			Кратность FcRn человека		
	n	Среднее	SD	n	Среднее	SD
IgG1 дикого типа		1.00			1.00	
M252Y/S254T/T256E	2	11.95	2.23	10	11.37	2.90
V259I/V308F	2	8.60	1.86	12	9.79	2.72
M428L/N434S	3	12.18	1.23	14	17.28	6.70
V259I/V308F/M428L	4	12.43	0.57	13	19.94	10.46

ФИГУРА 21b



30/30

ФИГУРА 22



ФИГУРА 23

Вариант Fc	IgG	n	Время полужизни (день)			Cmax (мкг/мл)		ППК (День*нг/мл)		Клиренс (мл/день/кг)	
			Среднее	SD	Кратность	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD
Дикий тип (нативный IgG1)	IgG1	3	9.7		1.0	101.2		822.9		4.9	
M252Y/S254T/T256E	IgG1	3	24.2	1.6	2.5	111.2	13.9	1919	210.1	2.1	0.2
V259I/V308F	IgG1	3	16.2	6.4	1.7	102.8	3.2	1352.6	367	3.1	0.9
M428L/N434S	IgG1	3	31.1	7.9	3.2	126	17	2660.9	791	1.6	0.6
V259I/V308F/M428L	IgG1	3	25.1	5.9	2.6	124.6	14.3	2301.6	922.5	1.9	0.8