

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201991879** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.02.03

(51) Int. Cl. *C07K 16/00* (2006.01)  
*C07K 16/10* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.02.12

---

(54) **ВАРИАНТЫ ПОЛИПЕПТИДОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) PA 2017 00097

(32) 2017.02.10

(33) DK

(86) PCT/EP2018/053464

(87) WO 2018/146317 2018.08.16

(71) Заявитель:  
ГЕНМАБ Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Бёрскенс Франк, Овердейк Марейе,  
Дикс Анник М., Де Йонг Роб,  
Стрюмане Кристин, Схюирман  
Янине, Паррен Паул (NL)

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

---

(57) Представлены полипептиды и антитела, содержащие Fc-область и антигенсвязывающий участок, причем Fc-область содержит усиливающую Fc-Fc мутацию и усиливающую связывание C1q мутацию, обеспечивая полипептиды или антитела с повышенной активностью CDC и/или агонистической активностью.

---

**201991879**  
**A1**

**201991879**

**A1**

## ВАРИАНТЫ ПОЛИПЕПТИДОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается содержащих Fc-область полипептидов, содержащих участки связывания, таких как антитела, имеющих по меньшей мере две аминокислотные замены в Fc-области по сравнению с исходным полипептидом или антителом.

### Уровень техники

Опосредованные Fc эффекторные функции моноклональных антител, как-то комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), вносят вклад в терапевтическое окно, определяемое эффективностью и токсичностью. CDC запускается при связывании C1q с Fc-областями антител. C1q представляет собой мультимерный белок, состоящий из шести глобулярных связывающих головок, прикрепленных к ножке.

Было показано, что гексамеризация IgG при связывании мишени на клеточной поверхности усиливается при точечных мутациях в Fc-области. Гексамеризация опосредуется межмолекулярными нековалентными взаимодействиями Fc-Fc, а взаимодействия Fc-Fc могут усиливаться при точечных мутациях в домене C<sub>H</sub>3, включая E345R и E430G.

В WO 2013/004842 раскрыты антитела или полипептиды, содержащие варианты Fc-области с модификациями одной или нескольких аминокислот, приводящими к модификации таких эффекторных функций, как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC).

В WO 2014/108198 раскрыты полипептиды типа антител, содержащие варианты Fc-области с модификациями одной или нескольких аминокислот, приводящими к усилению комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

В WO2016/164480 раскрыты антигенсвязывающие комплексы, обладающие активностью агонистов.

Усиление взаимодействий Fc-Fc между антителами может использоваться для усиления эффекта связывания антител со своей мишенью на поверхности клетки. Однако одного лишь усиления взаимодействия Fc-Fc между Fc-областями не всегда достаточно для выработки достаточно сильного сигнала для активации сигнального пути, напр., при связывании с рецептором.

Соответственно, целью настоящего изобретения является получение такого полипептида или антитела, содержащего Fc-область IgG человека и антигенсвязывающий участок, у которого будут усилены взаимодействия Fc-Fc и агонистическая активность типа усиления активации рецептора-мишени при связывании по сравнению с исходным полипептидом, причем исходным полипептидом является IgG человека того же изотипа и с таким же антигенсвязывающим участком, но без мутаций в Fc-области, т.е. исходный полипептид или исходное антитело.

Другой целью настоящего изобретения является получение такого полипептида, который активирует передачу сигналов, необязательно индуцирует усиление передачи сигналов при связывании антигенсвязывающего участка полипептида, напр., антитела, с соответствующим антигеном по сравнению с исходным полипептидом, причем исходный полипептид не имеет мутаций в Fc-области.

Следующей целью настоящего изобретения является получение полипептида со свойствами усиления взаимодействий Fc-Fc и усиления эффекторных функций типа CDC. Еще одной целью настоящего изобретения является получение полипептида со свойствами усиления взаимодействий Fc-Fc и усиления связывания C1q по сравнению с исходным полипептидом без каких-либо мутаций в Fc-области.

### **Сущность изобретения**

Как описано здесь, настоящее изобретение касается полипептидов или антител, содержащих Fc-область и антигенсвязывающий участок, причем Fc-область содержит усиливающую Fc-Fc мутацию и мутацию по связыванию C1q, обеспечивая полипептиды или антитела с повышенной активностью CDC и/или агонистической активностью.

Не ограничиваясь теорией, полагаем, что полипептиды или антитела по изобретению способны к стабильному связывающему взаимодействию между Fc-областями двух полипептидов или молекул антител при связывании с мишенью на поверхности клетки, что ведет к усилению олигомеризации типа образования гексамеров, тем самым обеспечивая avidность поверхности. Полипептиды или антитела по изобретению также имеют повышенную Fc-эффекторную реакцию по сравнению со своим исходным полипептидом или исходным антителом без мутаций в Fc-области, то есть исходным полипептидом или антителом того же изотипа.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены полипептиды или антитела, содержащие Fc-область иммуноглобулина человека и антигенсвязывающий участок, причем Fc-область включает: а) по меньшей мере одну замену, усиливающую Fc-Fc, в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и б) по меньшей мере одну замену по связыванию C1q, причем эти положения

соответствуют IgG1 человека по нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA 1969 May, 63(1): 78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 1991, NIH Publication No. 91-3242).

В одном аспекте изобретения предусмотрены полипептиды или антитела, содержащие Fc-область иммуноглобулина и антигенсвязывающий участок, причем Fc-область включает: а) замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и б) замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем эти положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

Замена в положении, соответствующем E430, E345, либо замена S440Y или S440W считается заменой, усиливающей Fc-Fc согласно настоящему изобретению.

Замена в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, считается заменой по связыванию C1q согласно настоящему изобретению.

Так, авторы настоящего изобретения в первом аспекте изобретения обнаружили, что введение первой мутации, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, вместе со второй мутацией, усиливающей связывание C1q, обеспечивает полипептиды или антитела с повышенной агонистической активностью и/или CDC.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены полипептиды или антитела, содержащие Fc-область иммуноглобулина человека и антигенсвязывающий участок, причем Fc-область включает: а) замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и б) замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем эти положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

Так, авторы изобретения обнаружили, что усиливающая Fc-Fc мутация вместе с одной или несколькими заменами по связыванию C1q в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, может обеспечить агонистическую активность.

Авторы изобретения также обнаружили, что усиливающая Fc-Fc мутация вместе с одной или несколькими заменами по связыванию C1q в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, может обеспечить усиление опосредованных Fc эффекторных функций типа усиления CDC.

Сочетание усиливающей Fc-Fc мутации и замены по связыванию C1q в

полипептидах или антителах также дает неожиданный эффект получения полипептидов или антител с агонистическими свойствами по сравнению с исходным полипептидом либо исходным антителом.

В одном воплощении настоящего изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y.

В одном воплощении настоящего изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T.

В одном воплощении настоящего изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y.

В одном воплощении настоящего изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену E430G. В одном воплощении настоящего изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену E345K. В одном воплощении настоящего изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену S440Y.

В одном воплощении настоящего изобретения полипептид или антитело содержит замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из K326, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения полипептид или антитело содержит замену в одном или нескольких положениях типа двух или трех положений, выбранных из группы, состоящей из K326A, K326W, E333S, E333A и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения полипептид или антитело содержит замену в одном или нескольких положениях типа двух или трех положений, выбранных из группы, состоящей из K326A, K326W, E333S, E333A, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения полипептид или антитело содержит замены K326W и E333S.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептидов или антител, содержащих Fc-область IgG человека и антигенсвязывающий участок, который включает: а) введение замены в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замены S440Y или S440W, и б) введение замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем эти положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептидов или антител, содержащих Fc-область IgG человека и антигенсвязывающий участок, который включает: а) введение замены в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замены S440Y или S440W, и б) введение замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем эти положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены композиции, содержащие по меньшей мере один полипептид или антитело, как описано здесь.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены полипептиды, антитела или композиции, как описано здесь, для применения в качестве лекарственных средств.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены полипептиды, антитела или композиции, как описано здесь, для применения при лечении рака, аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний или инфекционных заболеваний.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения лиц с заболеваниями, включающий введение им эффективного количества полипептида, антитела или композиции, как описано здесь.

Эти и другие аспекты изобретения, в частности различные применения и терапевтические применения полипептидов или антител, более подробно описаны ниже.

### **Краткое описание фигур**

На фиг. 1 представлен эффект E430G, K326A/E333A/P396L и K326A/E333A/P396L/E430G на эффективность антител IgG1-hDR5-01-G56T (A), IgG1-hDR-05 (B) и комбинации антител (C) на адгезированные раковые клетки VxPC-3 поджелудочной железы человека при определении методом 3-дневного анализа жизнеспособности (CellTiter-Glo). Представлены типичные примеры из двух экспериментов.

На фиг. 2 представлена эффективность моновалентных антител против DR5a с заменой K326A/E333A/P396L/E430G на адгезированные раковые клетки VxPC-3 поджелудочной железы (A) и COLO 205 толстой кишки (B) человека при определении методом 3-дневного анализа жизнеспособности (CellTiter-Glo). В качестве моновалентных антител против DR5 получали биспецифичное антитело с одним DR5-специфичным плечом, полученным из IgG1-hDR5-01-G56T, и одним неспецифичным плечом против белка gp120 ВИЧ, полученным из IgG1-b12, путем контролируемого обмена Fab-плеча. Представлены типичные примеры из трех экспериментов.

На фиг. 3 представлен эффект E430G в сочетании с K326A/E333A/P396L или двумя

из замен K326A/P396L, K326A/E333A или K326A/P396L на эффективность антител против DR5a типа IgG1-hDR5-01-G56T на адгезированные раковые клетки ВхРС-3 поджелудочной железы (А) и COLO 205 толстой кишки (В) человека при определении методом 3-дневного анализа жизнеспособности (CellTiter-Glo) и на связывание C1q при определении методом ELISA (С). Представлены типичные примеры из трех экспериментов.

На фиг. 4 представлен эффект E430G в сочетании с K326A/E333A или K326W/E333S на связывание C1q с антителом IgG1-CONA-C49W против DR5 при определении методом ELISA (А) и на эффективность антитела IgG1-hDR5-01-G56T против DR5 на адгезированные раковые клетки ВхРС-3 поджелудочной железы (В) и COLO 205 толстой кишки (В) человека при определении методом 3-дневного анализа жизнеспособности (CellTiter-Glo). Представлены типичные примеры из трех экспериментов.

На фиг. 5 представлен эффект E430G в сочетании с заменами по связыванию C1q S267E/H268F/S324T или с вариантом 113F IgG1 химерного изотипа IgG1/IgG3 на связывание C1q с антителом IgG1-hDR5-01-G56T против DR5 при определении методом ELISA (А) и на действие антитела IgG1-hDR5-01-G56T против DR5 на адгезированные раковые клетки поджелудочной железы (В) и COLO 205 толстой кишки (С) человека при определении методом 3-дневного анализа жизнеспособности (CellTiter-Glo). Представлены типичные примеры из трех экспериментов.

На фиг. 6 представлена сводка по 3-дневному анализу жизнеспособности (CellTiter-Glo) на адгезированных раковых клетках ВхРС-3 поджелудочной железы человека при 10 мкг/мл вариантов IgG1-hDR5-01-G56T, содержащих указанные мутации. Представлены эффекты, ранжированные по проценту жизнеспособных клеток относительно IgG1-hDR5-01-G56T дикого типа (WT), который принимали за 100%. Значимые эффекты на жизнеспособность клеток по сравнению с WT приведены как  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$  (односторонний метод ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта).

На фиг. 7 представлен агонистический эффект антител IgG1-CONA-C49W-K326A/E333A/P396L/E430G (А) и IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G (В) против DR5 на суспензию клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде в присутствии или в отсутствие 2,5 мкг/мл очищенного C1q человека при определении методом 24-часового анализа жизнеспособности. Процент жизнеспособных клеток представлен в виде процента отрицательных по TO-PRO-3 клеток.

На фиг. 8 представлен агонистический эффект 2,5 мкг/мл вариантов антитела IgG1-hDR5-01-G56T против DR5 с усиливающей Fc-Fc заменой E430G в сочетании с заменами

по связыванию C1q (A) и комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (B) на суспензию клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде в присутствии или в отсутствие ряда концентраций очищенного C1q человека при определении методом 24-часового анализа жизнеспособности. Процент жизнеспособных клеток представлен в виде процента отрицательных по TO-PRO-3 клеток. Представлены данные 4 различных экспериментов, а планки погрешностей означают стандартное отклонение.

На фиг. 9 представлена эффективность 2,5 мкг/мл агонистического антитела IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G (A) и комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (B) против DR5 на суспензию клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде с очищенным C1q человека и нейтрализующим антителом против C1q или без них при определении методом 24-часового анализа жизнеспособности. Процент жизнеспособных клеток представлен в виде процента отрицательных по TO-PRO-3 клеток.

На фиг. 10 представлена активация комплемента в фазе раствора при измерении по осаждению C4d при инкубации образцов антител в NHS для вариантов антитела IgG1-hDR5-01-G56T, содержащих усиливающую Fc-Fc замену 430G в сочетании с заменами по связыванию C1q K326W/E333S, K326A/E333A или K326A/E333A/P396L. В качестве положительного контроля для активации комплемента в фазе раствора определяли HAGG (агрегированный при нагревании  $\gamma$ -глобулин) и IgG1-CONA-RGY.

На фиг. 11 представлен эффект введения замен K326W, E333S или K326W/E333S в IgG-CONA-C49W и IgG1-CONA-C49W-E430G на связывание C1q при определении методом ELISA (A, B), на связывание C1q с антителами, связавшимися с DR5-положительными клетками WIL2-S SF при определении методом проточной цитометрии (C, D), и на снижение жизнеспособности суспензии клеток WIL2-S SF при определении методом 3-дневного анализа жизнеспособности (CellTiter-Glo) (E, F, G). Стандартные отклонения рассчитывали из двух независимых экспериментов.

На фиг. 12 представлен эффект введения замен K326W, E333S или K326W/E333S в IgG-CONA-C49W и IgG1-CONA-C49W-E430G (2,5 мкг/мл) на жизнеспособность суспензии клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде в присутствии ряда концентраций очищенного C1q человека при определении методом 24-часового анализа жизнеспособности. Процент жизнеспособных клеток определяли методом CellTiter-Glo.

На фиг. 13 представлен эффект добавления антитела против C1q на действие вариантов антитела IgG1-CONA-C49W против DR5 с усиливающими связывание C1q мутациями и/или с усиливающими взаимодействие Fc-Fc мутациями при 24-часовом анализе жизнеспособности на суспензии клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде с

добавлением очищенного C1q человека. Процент жизнеспособных клеток определяли методом CellTiter-Glo.

На фиг. 14 представлен эффект добавления пептида, ингибирующего взаимодействия Fc-Fc между вариантами антитела IgG1-CONA-C49W против DR5, опсонизированными в суспензии клеток WIL2-S SF, инкубированных в бессывороточной среде с добавлением очищенного C1q человека, при 24-часовом анализе жизнеспособности. Процент жизнеспособных клеток определяли методом CellTiter-Glo. В качестве неспецифического контрольного пептида использовали разупорядоченный пептид WCDLEGVTWHACL.

На фиг. 15 представлен эффект сочетания замен по связыванию C1q K326W/E333S с усиливающими Fc-Fc мутациями E345K, E345R или S440Y на агонистическое действие антитела IgG1-CONA-C49W против DR5 на адгезированные раковые клетки ВхРС-3 поджелудочной железы человека при определении методом 3-дневного анализа жизнеспособности (CellTiter-Glo).

На фиг. 16 представлен эффект мутации E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями S267E/H268F/S324T или с вариантом 113F IgG1 химерного изотипа IgG1/IgG3 при введении в антитело IgG1-CONA-C49W против DR5 на жизнеспособность адгезированных раковых клеток ВхРС-3 поджелудочной железы человека при определении методом 3-дневного анализа жизнеспособности (CellTiter-Glo).

На фиг. 17 представлен эффект функционально моновалентного антитела против DR5 с мутациями K326W/E333S/E430G на жизнеспособность суспензии клеток WIL2-S SF при определении методом 1-дневного анализа жизнеспособности (CellTiter-Glo). Функционально моновалентное антитело против DR5 получали в виде биспецифического антитела путем контролируемого обмена Fab-плеча IgG1-CONA-C49W-F405L-K326W/E333S/E430G (DR5-специфичное плечо) и IgG1-b12-K409R-K326W/E333S/E430G (неспецифичное плечо, направленное против белка gp120 ВИЧ). RLU: относительные единицы люминесценции.

На фиг. 18 представлен эффект введения замен K326W/E333S/E430G на агонистическую активность вариантов антител против DR5 (IgG1-CONA-C49W и IgG3-CONA-C49W-R345H) изотипа IgG1 и IgG3 при определении методом 1-дневного анализа жизнеспособности на клетках WIL2-S SF (A) и 3-дневного анализа жизнеспособности на клетках ВхРС-3 (B), НРАФ-II (C) и НТ-29 (D). Жизнеспособность определяли с помощью набора CellTiter-Glo.

На фиг. 19 представлен эффект введения усиливающей гексамеризацию мутации E430G вместе с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333T или K326W/

E333S в антитело IgG1-CONA-C49W против DR5 на суспензию клеток WIL2-S при определении методом 24-часового анализа жизнеспособности (CellTiterGlo).

На фиг. 20 представлена скорость клиренса 450 мкг вводимого в/в антитела у мышей SCID. (А) Определяли общий IgG человека в образцах сыворотки методом ELISA и наносили на график зависимости концентрации от времени. Каждая точка данных представляет среднее  $\pm$  стандартное отклонение из трех образцов. (В) Определяли клиренс до 21 дня после введения антитела по формуле  $D \times 1,000 / AUC$ , где  $D$  – введенная доза, а  $AUC$  – площадь под кривой концентрация-время. Представлен типичный пример из 2 независимых экспериментов по ELISA.

На фиг. 21 представлен эффект усиливающей Fc-Fc мутации E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями (K326A/E333A или K326W/E333S) на связывание вариантов антитела IgG1-7D8 с FcRn человека при определении методом ELISA с фиксированным FcRnECDHis-B2M-BIO при pH 6,0 и 7,4. В качестве отрицательного контроля на связывание FcRn при pH 6,0 использовали IgG1-7D8-I235A/H310A/H435A (нокаут FcRn); а в качестве контроля на усиление связывания FcRn при pH 7,4 использовали IgG1-7D8-M252Y/S254T/T256E.

На фиг. 22 представлен анализ ADCC по высвобождению хрома на клетках WIL2-S SF в качестве мишени и PBMCs человека (3 доноров) в качестве эффекторных клеток (соотношение E:T = 100:1) в бессывороточной среде с добавлением очищенного C1q человека и без него. В отсутствие и в присутствии C1q помеченные хромом клетки WIL2-S SF инкубировали при различных концентрациях антител для сравнения активности ADCC у IgG1-7D8-F405L-K326W/E333S/E430G с таковой у IgG1-7D8-E430G и IgG1-7D8 дикого типа (WT). В качестве отрицательного контроля использовали неспецифическое антитело IgG1-b12.

На фиг. 23 представлен эффект K326W/E333S/E430G на агонистическую активность антител IgG1-hDR5-01-G56T IgG1-hDR5-05 против DR5 на суспензии клеток WIL2-S SF при определении методом 24-часового анализа жизнеспособности (CellTiterGlo).

На фиг. 24 представлен эффект комплементарной пары мутаций K439E, S440K в Fc на агонистическую активность нацеленной на два эпитопа комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G против DR5 на суспензии клеток WIL2-S SF при определении методом 24-часового анализа жизнеспособности (CellTiterGlo).

На фиг. 25 представлены результаты анализа CDC на клетках Wien 133 при тестировании вариантов антитела IgG1-Campath с усиливающими гексамеризацию мутациями E430G или K248E/T437R и с усиливающими гексамеризацию мутациями

K248E/T437R в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S. Клетки Wien 133 инкубировали при различных концентрациях вариантов антител в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS).

На фиг. 26 представлен эффект комбинирования усиливающей гексамеризацию мутации E430G и усиливающих связывание C1q мутаций K326W/E333S на действие антитела IgG1-DR4-chCTB007 против DR4 на адгезированные раковые клетки ВхРС-3 поджелудочной железы человека при определении методом 3-дневного анализа жизнеспособности (CellTiter-Glo).

На фиг. 27 представлен анализ CDC на В-лимфоцитах WIL2-S SF человека с вариантами антител против FAS IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-APO1 (B) и IgG1-CD95-HFE7A (C) в присутствии 20% нормальной сыворотки человека. Клетки WIL2-S SF инкубировали в течение 45 мин при различных концентрациях вариантов антител в присутствии 20% объединенной нормальной сыворотки человека (NHS). В качестве несвязывающего контрольного антитела использовали IgG1-b12.

На фиг. 28 представлен 45-минутный анализ жизнеспособности (CellTiter-Glo) на клетках WIL2-S SF при инкубации с вариантами антител против FAS IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-APO1 (B) и IgG1-CD95-HFE7A (C) в бессывороточной среде без C1q.

На фиг. 29 представлен 24-часовой анализ жизнеспособности (CellTiter-Glo) на клетках WIL2-S SF с вариантами антител против FAS IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-APO1 (B) и IgG1-CD95-HFE7A (C) в бессывороточной среде с C1q в качестве сшивающего средства.

На фиг. 30 представлен 24-часовой анализ жизнеспособности (CellTiter-Glo) на клетках WIL2-S SF при инкубации с вариантами антител против FAS IgG1-FAS-E09 (A), IgG1-CD95-APO1 (B) и IgG1-CD95-HFE7A (C) в бессывороточной среде без C1q.

На фиг. 31 представлена активность антител IgG1-CD134-SF2 (WT), IgG1-CD134-SF2-E345R, IgG1-CD134-SF2-E430G и IgG1-CD134-SF2-K326W/E333S/E430G при анализе с репортером OX40 Jurkat. Клетки Jurkat Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/OX40 инкубировали в течение 5 часов при различных концентрациях антител в присутствии 8% фетальной телячьей сыворотки. Регистрировали сигналы OX40 по люминесценции, детектируемой после стимуляции OX40 антителами против OX40, которые индуцируют экспрессию репортерного гена люциферазы. RLU: относительные единицы люминесценции.

На фиг. 32 представлен эффект усиливающей Fc-Fc мутации E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S у IgG1-CD40-SGN40 и IgG1-CD40-CP870893 на сигналы CD40. Клетки Jurkat Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/

CD40 инкубировали в течение 5 часов при различных концентрациях антител в присутствии 8% фетальной телячьей сыворотки. Регистрировали сигналы CD40 по люминесценции, детектируемой после стимуляции CD40 антителами против CD40 или лигандами CD40, которые индуцируют экспрессию репортерного гена люциферазы. RLU: относительные единицы люминесценции.

На фиг. 33 представлен эффект усиливающей Fc-Fc мутации E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S у IgG1-CD137-MOR7480 и IgG1-BMS-663513 на сигналы 4-1BB. Клетки Jurkat Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/4-1BB инкубировали в течение 5 часов при различных концентрациях антител в присутствии 1% фетальной телячьей сыворотки. Регистрировали сигналы 4-1BB по люминесценции, детектируемой после стимуляции 4-1BB антителами против 4-1BB или лигандами

4-1BB с антителом против His, которые индуцируют экспрессию репортерного гена люциферазы. В качестве отрицательного контроля использовали IgG-b12-K326W/E333S/E430G. RLU: относительные единицы люминесценции.

На фиг. 34 представлен эффект усиливающей Fc-Fc мутации E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S у IgG1-GITR-INCAGN01876 на сигналы GITR. Клетки Jurkat Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/GITR инкубировали в течение 5 часов при различных концентрациях антител в присутствии 1% фетальной телячьей сыворотки. Регистрировали сигналы GITR по люминесценции, детектируемой после стимуляции GITR антителами против GITR, которые индуцируют экспрессию репортерного гена люциферазы. RLU: относительные единицы люминесценции.

На фиг. 35 представлен эффект усиливающей Fc-Fc мутации E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S у антител GITR-36E5 подклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 на сигналы GITR. Клетки Jurkat Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/GITR инкубировали в течение 6 часов при конечной концентрации антител 111 нг/мл в присутствии 1% фетальной телячьей сыворотки. Регистрировали сигналы GITR по люминесценции, детектируемой после стимуляции GITR антителами против GITR, которые индуцируют экспрессию репортерного гена люциферазы. В качестве несвязывающего контроля использовали антитело IgG1-b12. RLU: относительные единицы люминесценции.

### **Раскрытие сущности изобретения**

При описании воплощений изобретения для ясности будет применяться специфическая терминология. Однако изобретение не должно ограничиваться

выбранными при этом специфическими терминами, и подразумевается, что каждый конкретный термин включает в себя все технические эквиваленты, которые работают аналогичным образом для достижения аналогичной цели.

### **Определения**

Термин “исходный полипептид” или “исходное антитело” следует понимать как полипептид или антитело, которое идентично полипептиду или антителу по изобретению, но при этом исходный полипептид или исходное антитело не имеет усиливающей Fc-Fc мутации и усиливающей связывание C1q мутации по настоящему изобретению.

Термин “полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и участок связывания” в контексте настоящего изобретения относится к полипептидам, содержащим Fc-область иммуноглобулина и участок связывания, который способен связываться с любой молекулой типа полипептида, который, напр., находится на клетке, бактерии или вирусе. Fc-область иммуноглобулина определяется как фрагмент антитела, который обычно образуется после расщепления антитела папаином (что известно специалистам в данной области), который включает две области C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 иммуноглобулина и соединительный участок, напр., шарнирный участок. Константный домен тяжелой цепи антитела определяет изотип антитела, напр., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD или IgE. Fc-область опосредует эффекторные функции антител вместе с рецепторами на клеточной поверхности, которые называются Fc-рецепторами, и белками системы комплемента. Участок связывания может представлять собой полипептидную последовательность типа белка, белкового лиганда, рецептора, антигенсвязывающего участка или лиганд-связывающего участка, способного связываться с клеткой, бактерией или вирусом. Если участок связывания, напр., рецептор, то “полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и участок связывания” может быть получен в виде слитого белка Fc-области иммуноглобулина и данного участка связывания. Если участок связывания представляет собой антигенсвязывающий участок, то “полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и участок связывания” может представлять собой антитело типа химерного, гуманизованного или человеческого антитела или же только тяжелую цепь антитела или слияние scFv-Fc. Полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и участок связывания, обычно содержит и соединительный участок, напр., шарнирный участок, и две области C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 тяжелой цепи иммуноглобулина, поэтому “полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и участок связывания” может представлять собой “полипептид, содержащий как минимум Fc-область иммуноглобулина и участок связывания”. Термин “Fc-область иммуноглобулина” в контексте настоящего изобретения означает, что присутствует соединительный участок,

напр., шарнирный, в зависимости от подтипа антитела, и области C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub> иммуноглобулина, напр., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgM или IgE человека. Полипептид не ограничивается человеческим источником, а может быть любого происхождения типа, напр., мыши или макаки-крабоеда. Термин “Fc-область дикого типа” в контексте настоящего изобретения означает Fc-область иммуноглобулина с такой аминокислотной последовательностью, которая встречается в природе.

Термин “шарнирный участок” в настоящем изобретении служит для обозначения шарнирного участка тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, шарнирный участок антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 216-230 по нумерации EU.

Термин “область C<sub>H2</sub>” или “домен C<sub>H2</sub>” в настоящем изобретении служит для обозначения области C<sub>H2</sub> тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область C<sub>H2</sub> антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 231-340 по нумерации EU. Однако область C<sub>H2</sub> также может быть любого из других подтипов, как описано здесь.

Термин “область C<sub>H3</sub>” или “домен C<sub>H3</sub>” в настоящем изобретении служит для обозначения области C<sub>H3</sub> тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область C<sub>H3</sub> антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 341-447 по нумерации EU. Однако область C<sub>H3</sub> также может быть любого из других подтипов, как описано здесь.

Термин “иммуноглобулин” относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей: одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре потенциально связаны между собой дисульфидными мостиками. Структура иммуноглобулинов хорошо изучена, напр., см. *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно V<sub>H</sub>) и константной области тяжелой цепи (C<sub>H</sub>). Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов: C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>. Тяжелые цепи соединяются между собой дисульфидными связями в так называемом “шарнирном участке”. Каждая легкая цепь обычно состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно V<sub>L</sub>) и константной области легкой цепи (C<sub>L</sub>). Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена C<sub>L</sub>. Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут еще подразделяться на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или по форме структурно определенных петель), также именуемые участками, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются с более консервативными участками, именуемыми каркасными участками (FR). Каждый V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> обычно состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1,

FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (также см. Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Если не указано иначе или не противоречит контексту, последовательности CDR идентифицируются здесь в соответствии с правилами IMGT с помощью DomainGapAlign (Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999, 27:209-212; и Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P., Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010); а также см. [http-адрес в Интернет: www.imgt.org/](http://www.imgt.org/). Если не указано иначе или не противоречит контексту, положения аминокислот в Fc-области/Fc-домене в настоящем изобретении приводятся по нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA 1969 May, 63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition – 1991 NIH Publication No. 91-3242).

Термин “антитело” (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекулам иммуноглобулинов, фрагментам молекул иммуноглобулинов или производным тех и других, которые обладают способностью к специфическому связыванию с антигеном. Антитела по настоящему изобретению содержат Fc-домен иммуноглобулина и антигенсвязывающий участок. Антитело обычно содержит две области C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub> и соединительный участок, напр., шарнирный участок, напр., по меньшей мере Fc-домен. Таким образом, антитело по настоящему изобретению может содержать Fc-область и антигенсвязывающий участок. Вариабельные области тяжелых и легких цепей молекул иммуноглобулина содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные или “Fc”-области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (как-то эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента типа C1q, первого компонента в классическом пути активации комплемента. Антитела также могут быть полиспецифичными типа биспецифичных антител или подобных молекул. Термин “биспецифичное антитело” относится к антителам, обладающим специфичностью по меньшей мере к двум разным, как правило неперекрывающимся эпитопам. Такие эпитопы могут быть на одной и той же или на разных мишенях. Если эпитопы находятся на разных мишенях, такие мишени могут быть на одних и тех же клетках или на разных клетках или типах клеток. Как указано выше, если не указано иначе или явно не противоречит контексту, термин антитело при этом включает фрагменты антител, которые содержат по меньшей мере часть Fc-области и сохраняют способность к специфическому связыванию с антигеном. Такие фрагменты могут быть получены любыми известными методами типа методов ферментативного расщепления, синтеза пептидов и рекомбинантной экспрессии. Было показано, что антигенсвязывающая функция антител может выполняться фрагментами полноразмерных антител. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином “Ab” или

“антитело”, включают, без ограничения, моновалентные антитела (описанные в WO 2007/059782 от Genmab); антитела из тяжелых цепей, состоящие только из двух тяжелых цепей и встречающиеся в природе, напр., у верблюдов (напр., Hamers-Casterman (1993) Nature 363: 446); ThioMabs (Roche, WO 2011/069104); сконструированные путем обмена нитей домены (SEED или Seed-bodies), которые представляют собой асимметричные и биспецифичные антителоподобные молекулы (Merck, WO 2007/110205); Triomabs (Pharma/Fresenius Biotech, Lindhofer et al., 1995, J Immunol. 155:219; WO 2002/020039); Fc $\Delta$ Adp (Regeneron, WO 2010/151792), асимметрический каркас (Zymeworks/Merck, WO 2012/058768), mAb-Fv (Xencor, WO 2011/028952), Xmab (Xencor), иммуноглобулины с двойными вариабельными доменами (Abbott, DVD-Ig, U.S. Patent No. 7,612,181); антитела с двойными доменами и двумя головками (Unilever; Sanofi Aventis, WO 2010/0226923), диатела (ImClone/Eli Lilly), антитела в формате “knobs into-holes” (Genentech, WO 98/50431); DuoBody (Genmab, WO 2011/131746); биспецифичные IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat, WO 11/143545), DuetMab (MedImmune, US 2014/0348839), антитела в формате «electrostatic steering» (Amgen, EP 1870459 и WO 2009/089004; Chugai, US 2010/00155133; Oncomed, WO 2010/129304A); биспецифичные IgG1 и IgG2 (Rinat Neurosciences Corporation, WO 11/143545), CrossMAbs (Roche, WO 2011/117329), LUZ-Y (Genentech), bioclonic (Merus, WO 2013/157953), антитела с двойными нацеливающими доменами (GSK/Domantis), антитела типа два в одном или Fabs двойного действия, распознающие две мишени (Genentech, NovImmune, Adimab), перекрестно сшитые Mabs (Karmanos Cancer Center), ковалентно слитые mAbs (AIMM), CovX-bodies (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen Ilag), DutaMabs (Dutalys/Roche), iMabs (MedImmune), IgG-подобные биспецифичные (ImClone/Eli Lilly; Shen J. et al., J Immunol Methods, 2007, 318(1-2): 65-74), TIG-bodies, DIG-bodies и PIG-bodies (Pharmabcine), молекулы с двойным сродством и перенацеливанием (Fc-DART или Ig-DART фирмы Macrogenics, WO 2008/157379, WO 2010/080538), BEAT (Glenmark), Zybodies (Zyngenia), подходы с общей легкой цепью (Crucell/Merus, US 7262028) или с общими тяжелыми цепями (к $\lambda$ Bodies фирмы NovImmune, WO 2012/023053), а также слитые белки, содержащие полипептидную последовательность, слитую с содержащим Fc-область фрагментом антитела типа слитых scFv, как-то BsAb от ZymoGenetics/BMS, HERCULES от Biogen Idec (US 007951918), SCORPIONS от Emergent BioSolutions/Trubion и Zymogenetics/BMS, Ts2Ab (MedImmune/AZ (Dimasi N. et al., J Mol. Biol., 2009, 393(3): 672-92), слитые scFv от Genentech/Roche, слитые scFv фирмы Novartis, слитые scFv от Immunomedics, слитые scFv от Changzhou Adam Biotech Inc. (CN 102250246), TvAb фирмы Roche (WO 2012/025525, WO 2012/025530), mAb<sup>2</sup> фирмы f-Star (WO 2008/003116) и двойные слияния scFv. Также следует

иметь в виду, что термин антитело, если не указано иначе, включает и поликлональные антитела, моноклональные антитела (как-то человеческие моноклональные антитела), смеси антител (рекомбинантных поликлональных), к примеру, полученные по технологии фирм Symplogen и Merus (Oligoclonics), мультимерные Fc-белки, которые описаны в WO 2015/158867, слитые белки, описанные в WO 2014/031646, и антителоподобные полипептиды типа химерных антител и гуманизованных антител. Полученные антитела потенциально могут иметь любой изотип.

Термин “полноразмерное антитело” в настоящем изобретении относится к таким антителам (напр., исходным антителам), которые содержат все константные и переменные домены тяжелых и легких цепей, соответствующие тем, которые обычно встречаются в антителах дикого типа этого изотипа.

Термин “человеческое антитело” в настоящем изобретении охватывает такие антитела, у которых переменные и константные области происходят из последовательностей иммуноглобулина человека «зародышевой линии». Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человека «зародышевой линии» (напр., мутации, вставки или делеции, введенные при случайном или сайт-специфическом мутагенезе *in vitro* или при соматических мутациях *in vivo*). Однако термин “человеческое антитело” в настоящем изобретении не должен охватывать антитела, у которых на каркасные последовательности человека были привиты последовательности CDR зародышевой линии, происходящие из другого вида млекопитающих типа мыши.

Термин “химерное антитело” в настоящем изобретении относится к таким антителам, у которых оба типа цепей, т.е. тяжелая цепь и легкая цепь, являются химерными в результате инженерии антител. Химерной является такая цепь, которая содержит чужеродный переменный домен (происходящий из другого вида, чем человек, или же синтетический либо созданный из любого вида, включая человека), соединенный с константной областью человеческого происхождения.

Термин “гуманизованное антитело” в настоящем изобретении относится к таким антителам, у которых оба типа цепей являются гуманизованными в результате инженерии антител. Гуманизованной обычно является такая цепь, у которой определяющие комплементарность участки (CDR) переменных доменов являются чужеродными (происходящими из другого вида, чем человек, или синтетическими), тогда как остальная часть цепи имеет человеческое происхождение. Оценка гуманизации основывается на полученной аминокислотной последовательности, а не на методологии как таковой, что позволяет использовать другие методики, отличные от пересадки.

Термины “моноклональное антитело”, “моноклональное Ab”, “композиция моноклонального антитела”, “mAb” и подобные им в настоящем изобретении относятся к препаратам молекул Ab одного молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела проявляет единственную специфичность связывания и сродство к определенному эпитопу. Соответственно, термин “моноклональное антитело человека” относится к Abs, проявляющим единственную специфичность связывания, у которых переменные и константные области происходят из гаметных последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческие mAbs могут вырабатываться гибридомой, которая включает В-клетки, полученные от трансгенного или трансхромосомного животного, а не человека, типа трансгенной мыши, у которой геном содержит трансгенный репертуар тяжелой цепи и трансгенный репертуар легкой цепи человека, перенастроенный на выработку функционального человеческого антитела и слитый с иммортализованной клеткой.

Термин “изотип” в настоящем изобретении относится к классу иммуноглобулина (напр., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE или IgM) либо их аллотипам типа IgG1m(za) и IgG1m(f), которые кодируются генами константной области тяжелой цепи. Кроме того, каждый изотип тяжелой цепи может комбинироваться с легкой цепью каппа ( $\kappa$ ) или лямбда ( $\lambda$ ). Термин “смешанный изотип” в настоящем изобретении относится к Fc-области иммуноглобулина, полученной при комбинировании структурных особенностей одного изотипа с аналогичной областью из другого изотипа, при этом образуется гибридный изотип. Смешанный изотип может содержать Fc-область, последовательность которой состоит из двух или нескольких изотипов, выбранных из числа IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE или IgM, при этом образуются такие комбинации, напр., как IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4 или IgG1/IgA.

Термин “антигенсвязывающий участок”, “участок связывания антигена”, “связывающий участок” или “антигенсвязывающий домен” в настоящем изобретении относится к той области антитела, которая способна связываться с антигеном. Этот связывающий участок обычно определяется доменами  $V_H$  и  $V_L$  антитела, которые могут еще подразделяться на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или по форме структурно определенных петель), также именуемые участками, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются с более консервативными участками, именуемыми каркасными участками (FR). Антигеном может быть любая молекула типа полипептида, напр., которая находится на клетке, бактерии или вирусе.

Термин “мишень” в настоящем изобретении относится к молекулам, с которыми

связывается антигенсвязывающий участок антитела. Мишень включает любые антигены, против которых вырабатываются данные антитела. Термины “антиген” и “мишень” применительно к антителам могут применяться взаимозаменяемо и иметь одни и те же значения и цели в отношении любых аспектов или воплощений настоящего изобретения.

Термин “эпитоп” означает белковую детерминанту, которая способна специфически связываться с переменным доменом антитела. Эпитопы обычно состоят из таких поверхностных групп молекул, как аминокислоты, боковые цепи сахаридов либо их комбинации, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что связывание с первыми, но не с последними, утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (которые также называют иммунодоминантным компонентом эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании.

“Антитело” или “вариант антитела” или “вариант исходного антитела” в настоящем изобретении означает молекулу антитела, которая содержит одну или несколько мутаций по сравнению с “исходным антителом”. Различные термины могут применяться взаимозаменяемо и имеют одни и те же значения и цели в отношении любых аспектов или воплощений настоящего изобретения. Типичные форматы исходных антител включают, без ограничения, антитела дикого типа, полноразмерные антитела или Fc-содержащие фрагменты антител, биспецифичные антитела, человеческие антитела, гуманизованные антитела, химерные антитела либо их комбинации. Аналогичным образом “полипептид” или “вариант полипептида, содержащий Fc-область иммуноглобулина и участок связывания” или “вариант исходного полипептида, включающий Fc-область иммуноглобулина и участок связывания”, в настоящем изобретении означает такой “полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и участок связывания”, который содержит одну или несколько мутаций по сравнению с “исходным полипептидом, содержащим Fc-область иммуноглобулина и участок связывания”. Различные термины могут применяться взаимозаменяемо и имеют одни и те же значения и цели в отношении любых аспектов или воплощений настоящего изобретения. При аминокислотных заменах нативные аминокислоты могут заменяться на другие встречающиеся в природе аминокислоты или на не встречающиеся в природе производные аминокислот. Аминокислотные замены могут быть консервативными или не консервативными. В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут определяться как замены в пределах классов аминокислот, приведенных в одной или нескольких из

следующих трех таблиц.

### Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислые остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R) и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)

### Альтернативные классы консервативных замен аминокислотных остатков

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

### Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Остатки, содержащие спиртовые группы	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Циклоалкенил-связанные остатки	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Небольшие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень маленькие остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в формировании витков	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, N, D, E и R

В контексте настоящего изобретения замены у вариантов обозначаются так:

исходная аминокислота – положение – заменяющая аминокислота;

используется трехбуквенный код или однобуквенный код, включая коды Хаа и Х для обозначения аминокислотных остатков. Соответственно, обозначение “E345R” или “Glu345Arg” означает, что вариант содержит замену глутаминовой кислоты на аргинин в положении аминокислоты у варианта, соответствующем аминокислоте в положении 345 у исходного антитела.

Если положение как таковое отсутствует в антителе, но вариант содержит вставку аминокислоты, то это обозначается, к примеру, так:

положение – заменяющая аминокислота, напр., “448E”.

Такие обозначения особенно актуальны в связи с модификациями в серии гомологичных полипептидов или антител.

Точно так же, когда идентичность заменяющего аминокислотного остатка не важна:

исходная аминокислота – положение, напр., “E345”.

Для модификаций, при которых исходная аминокислота и/или заменяющая аминокислота может включать в себя более одной, но не все аминокислоты, в контексте изобретения замена глутаминовой кислоты на аргинин, лизин или триптофан в положении 345 может быть обозначена взаимозаменяемо как:

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

Кроме того, термин “замена” охватывает замены на любые из других девятнадцати природных аминокислот или на другие аминокислоты типа не природных аминокислот. Например, замена аминокислоты E в положении 345 включает каждую из следующих замен: 345A, 345C, 345D, 345G, 345H, 345F, 345I, 345K, 345L, 345M, 345N, 345P, 345Q, 345R, 345S, 345T, 345V, 345W и 345Y. Это эквивалентно обозначению 345X, где X означает любую аминокислоту. Эти замены также могут быть обозначены как E345A, E345C и т.д., или же E345A,C и т.д., или же E345A/C/и т.д. То же самое относится по аналогии ко всем приведенным здесь положениям, конкретно охватывая любые из таких замен.

В настоящем изобретении термин “эффекторная клетка” относится к таким иммунным клеткам, которые участвуют в эффекторной фазе иммунного ответа, в отличие от фаз распознавания и активации иммунного ответа. Типичные иммунные клетки включают клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например, лимфоциты (как-то В-клетки и Т-клетки, включая цитолитические Т-клетки (CTL)), клетки-киллеры, природные клетки-киллеры, макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфно-ядерные клетки, как-то нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) или рецепторы комплемента и выполняют специфические иммунные функции. В некоторых воплощениях такие эффекторные клетки, напр., как клетки природных киллеров, способны индуцировать ADCC. Например, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки и купферовские клетки, которые экспрессируют FcR, участвуют в специфическом уничтожении клеток мишени и презентации антигенов другим компонентам иммунной системы или в связывании с клетками, презентующими антигены. В некоторых воплощениях ADCC может еще больше усиливаться при запускаемой антителами классической активации комплемента, приводя к отложению активированных фрагментов

C3 на клетках мишени. Продуктами расщепления C3 являются лиганды рецепторов комплемента (CR) типа CR3, которые экспрессируются на миелоидных клетках. Распознавание фрагментов комплемента рецепторами CR на эффекторных клетках может способствовать усилению опосредованной Fc-рецепторами ADCC. В некоторых воплощениях запускаемая антителами классическая активация комплемента приводит к образованию фрагментов C3 на клетках мишени. Эти продукты расщепления C3 могут непосредственно способствовать комплемент-зависимой клеточной цитотоксичности (CDCC). В некоторых воплощениях эффекторные клетки могут подвергаться фагоцитозу антиген мишени, частицы мишени или клетки мишени. Экспрессия определенных FcR или рецепторов комплемента на эффекторных клетках может регулироваться такими гуморальными факторами, как цитокины. Например, было обнаружено, что экспрессия FcγRI повышается γ-интерфероном (IFN-γ) и/или G-CSF. Это усиление экспрессии повышает цитотоксическую активность несущих FcγRI клеток против мишеней. Эффекторные клетки могут подвергаться фагоцитозу целевой антиген либо фагоцитировать или лизировать клетки мишени. В некоторых воплощениях запускаемая антителами классическая активация комплемента приводит образованию фрагментов C3 на клетках мишени. Эти продукты расщепления C3 могут непосредственно вызывать фагоцитоз у эффекторных клеток или опосредованно путем усиления вызванного антителами фагоцитоза.

Термин “Fc-эффекторные функции” в настоящем изобретении служит для обозначения таких функций, которые являются следствием связывания полипептида или антитела со своей мишенью типа антигена на клеточной мембране, причем Fc-эффекторные функции относятся к Fc-области полипептида или антитела. Примеры Fc-эффекторных функций включают (i) связывание C1q, (ii) активацию комплемента, (iii) комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), (iv) антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), (v) связывание с Fcγ-рецептором, (vi) антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), (vii) комплемент-зависимую клеточную цитотоксичность (CDCC), (viii) усиление цитотоксичности комплементом, (ix) опосредованное антителом связывание с рецептором комплемента опсонизированного антитела, (x) опсонизацию и (xi) комбинации любых из (i)–(x).

Термин “зависимые от кластеризации функции” в настоящем изобретении служит для обозначения функций, которые являются следствием образования комплексов антигена после олигомеризации полипептидов или антител, связанных со своими антигенами, необязательно на клетках, клеточных мембранах, на вирионах или на других частицах. Примеры зависимых от кластеризации эффекторных функций включают: (i)

образование олигомеров антител, (ii) стабильность олигомеров антител, (iii) образование олигомеров антигена, (iv) стабильность олигомеров антигена, (v) индукцию апоптоза, (vi) модуляцию пролиферации типа снижения, ингибирования или стимуляции пролиферации и (vii) комбинации любых из (i)–(vi).

Термин “агонистический” в настоящем изобретении понимается как стимуляция или активация рецептора на клеточной мембране, приводящая к биологическому ответу типа внутриклеточной передачи сигналов. Такой агонистический эффект может привести к индукции апоптоза (запрограммированной смерти клеток) либо активации иммунных клеток или активации внутриклеточного пути.

Агонистическая активность или повышенная агонистическая активность может быть определена методом анализа жизнеспособности для антител, нацеленных на мишени, экспрессирующие внутриклеточной домен смерти, как описано в примере 2, по следующим стадиям:

i) посеять линию клеток, экспрессирующую мишень, соответствующую антителу, напр., DR5 в полистироловом плоскодонном 96-луночном планшете в течение ночи при 37°C,

ii) добавить серийные разведения антитела, напр., антитела против DR5 в диапазоне от 0,0003 до 20000 нг/мл и инкубировать в течение 3 дней при 37°C,

iii) определить жизнеспособность клеток путем определения наличия АТФ, напр., методом люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo,

iv) рассчитать жизнеспособность клеток по следующей формуле: % жизнеспособных клеток = [(люминесценция образца с антителом – люминесценция образца со стауроспорином)/(люминесценция образца без антитела – люминесценция образца со стауроспорином)]×100.

Агонистическая активность или повышенная агонистическая активность может быть определена репортерным методом для антител, нацеленных на мишени, активирующие внутриклеточный сигнальный путь, как описано в примерах 29, 30, 31 и 32, по следующим стадиям:

i) посеять клетки Jurkat, стабильно трансфицированные мишенью, напр., OX40, 4-1BB, CD40 или GITR и экспрессирующие репортерный ген люциферазы ниже от элемента отклика NFAT, и инкубировать клетки в плоскодонном 96-луночном планшете в течение ночи при 37°C,

ii) добавить серийные разведения антитела, напр., антитела против OX49, против 4-1BB, против CD40 или против GITR в диапазоне, напр., от 19,5 до 5000 нг/мл, и инкубировать в течение 5 ч,

iii) добавить субстрат люциферазы светлячка (5'-фторлюциферин) к клеткам и инкубировать в течение 5-10 мин,

iv) определить люминесценцию на считывающем устройстве Envision MultiLabel Plate reader.

Термин “вектор” в настоящем изобретении служит для обозначения молекул нуклеиновой кислоты, способных индуцировать транскрипцию сегмента нуклеиновой кислоты, вставленного в вектор. Одним из типов вектора является “плазмида”, которая имеет вид кольцевой двухцепочечной петли ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором сегмент нуклеиновой кислоты может быть вставлен в геном вируса. Некоторые векторы способны к автономной репликации в тех клетках-хозяевах, в которые они введены, к примеру, бактериальные векторы с бактериальным началом репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (как-то неэписомальные векторы млекопитающих) могут встраиваться в геном клетки-хозяина при введении в клетки-хозяева и при этом реплицироваться вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы именуется здесь как “рекомбинантные экспрессионные векторы” (или просто “экспрессирующие векторы”). В общем, экспрессирующие векторы, применимые в методах рекомбинантной ДНК, зачастую имеют вид плазмид. В настоящем описании термины “плазмида” и “вектор” могут применяться взаимозаменяемо, так как плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако настоящее изобретение должно охватывать и другие формы экспрессирующих векторов типа вирусных векторов (типа дефектных по репликации ретровирусов, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов), которые выполняют эквивалентные функции.

Термин “рекомбинантные клетки-хозяева” (или просто “клетки-хозяева”) в настоящем изобретении служит для обозначения клеток, в которые был введен экспрессирующий вектор. Следует иметь в виду, что такие термины служат не только для обозначения клеток определенного субъекта, но также и потомства таких клеток. Поскольку в последующих поколениях могут происходить определенные модификации вследствие мутаций или влияния окружающей среды, то такое потомство фактически может и не быть идентично исходным клеткам, но все же входит в рамки термина “клетки-хозяева” в настоящем изобретении. Рекомбинантные клетки-хозяева включают, к примеру, трансфектомы типа клеток CHO, клеток HEK-293, клеток PER.C6, NS0 и лимфоцитарных клеток, а также прокариотические клетки типа *E. coli* и другие эукариотические организмы типа растительных клеток и грибов.

Термин “трансфектома” в настоящем изобретении включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие Ab или целевой антиген, типа клеток CHO, клеток PER.C6, NS0, клеток HEK-293, растительных клеток или грибов, включая дрожжевые клетки.

Термин “препарат” относится к препаратам вариантов антител и смесей различных вариантов антител, которые могут обладать повышенной способностью к образованию олигомеров при взаимодействии с антигеном, ассоциированным с клетками (напр., с антигеном, экспрессированным на поверхности клеток), клеточными мембранами, вирионами или другими структурами, что может приводить к усилению передачи сигналов и/или активации их антигеном.

В настоящем изобретении термин “сродство” означает силу связывания одной молекулы, напр., антитела, с другой, напр., мишенью или антигеном, на одном и том же сайте, типа моновалентного связывания индивидуального антигенсвязывающего сайта антитела с антигеном.

В настоящем изобретении термин “авидность” относится к объединенной силе связывания по нескольким сайтам между двумя структурами типа между несколькими антигенсвязывающими сайтами антител, одновременно взаимодействующих с мишенью, или, напр., между антителом и C1q. Когда имеется более чем одно взаимодействие при связывании, две структуры будут диссоциировать только тогда, когда диссоциируют все сайты связывания, поэтому скорость диссоциации будет меньше, чем у индивидуальных сайтов связывания, обеспечивая тем самым большую эффективную общую прочность связывания (авидность) по сравнению с прочностью связывания индивидуальных сайтов связывания (сродством).

В настоящем изобретении термин “олигомер” относится к молекулам, состоящим из более чем одного, но ограниченного числа мономерных звеньев (напр., антител), в отличие от полимера, который, по крайней мере в принципе, состоит из неограниченного количества мономеров. Типичными олигомерами являются димеры, тримеры, тетрамеры, пентамеры и гексамеры. Для обозначения количества мономерных звеньев в олигомерах часто используются греческие префиксы, к примеру, тетрамер состоит из четырех звеньев, а гексамер состоит из шести звеньев.

Термин “олигомеризация” в настоящем изобретении служит для обозначения процесса, при котором мономеры преобразуются до конечной степени полимеризации. При этом отмечается, что полипептиды, антитела и/или другие димерные белки, содержащие участки связывания с мишенью по изобретению, могут образовывать олигомеры типа гексамеров посредством нековалентной ассоциации Fc-областей после

связывания с мишенью, напр., на поверхности клетки.

Термин “кластеризация” в настоящем изобретении служит для обозначения олигомеризации антител, полипептидов, антигенов или других белков посредством нековалентных взаимодействий.

Термин “усиливающие Fc-Fc” в настоящем изобретении служит для обозначения повышения прочности связывания или стабилизации взаимодействия между Fc-областями двух содержащих Fc-области антител или полипептидов с тем, чтобы полипептиды образовывали олигомеры при связывании с мишенью.

Усиливающие Fc-Fc замены в настоящем изобретении относятся к заменам в следующих положениях, соответствующих IgG1 человека по нумерации EU: E430, E345 или S440, при условии, что замены в положении S440 представлены S440Y или S440W. Так, усиливающие Fc-Fc замены в настоящем изобретении относятся к следующим заменам аминокислот: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y. В предпочтительном воплощении усиливающие Fc-Fc замены представлены E430G или E345K.

Термин “связывание C1q” в настоящем изобретении служит для обозначения прямого взаимодействия между C1q и полипептидом или антителом. Прямое связывание с C1q можно оценить, к примеру, при помощи иммобилизованного на искусственной поверхности антитела (как описано в примерах 4, 5 и 6). Мультивалентное взаимодействие, приводящее к высокой avidности связывания C1q с олигомером антитела, можно оценить по связыванию с заданным антигеном на поверхности клеток или вирионов.

Связывание C1q с полипептидом или антителом может быть определено методом ELISA по следующим стадиям: i) покрыть 96-луночный планшет Microton ELISA с помощью 1 мкг/мл полипептида или антитела в 100 мкл PBS при 4°C в течение ночи, ii) инкубировать планшет с серийными разведениями C1q по 100 мкл на лунку в диапазоне конечных концентраций C1q 30-0,01 мкг/мл при 3-кратных разведениях в течение 1 ч при 37°C, iii) инкубировать планшет с кроличьим антителом против C1q человека по 100 мкл на лунку в течение 1 ч при комнатной температуре, iv) инкубировать планшет с антителом свиньи против кроличьего IgG-HRP по 100 мкл на лунку в течение 1 ч при комнатной температуре, v) инкубировать планшет с субстратом при 1 мг/мл 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) по 100 мкл на лунку в течение 15 мин при комнатной температуре, vi) остановить реакцию добавлением 2% щавелевой кислоты по 100 мкл на лунку. Измерить поглощение при 405 нм на считывающем устройстве BioTek EL808 Microplate reader.

Термин “замена по связыванию C1q” в настоящем изобретении служит для обозначения таких замен в полипептидах, содержащих Fc-область иммуноглобулина и участок связывания антигена, которые усиливают прямое взаимодействие с C1q. Усиление связывания C1q, к примеру, может привести к снижению EC<sub>50</sub> у взаимодействия между C1q и полипептидом, содержащим Fc-область иммуноглобулина и участок связывания антигена, при измерении в соответствии с методом определения связывания C1q, описанным выше.

В настоящем изобретении термин “активация комплемента” относится к активации классического пути комплемента, которая запускается связыванием крупного макромолекулярного комплекса под названием C1 с комплексами антитело-антиген на поверхности. C1 представляет собой комплекс, который состоит из 6 распознающих C1q белков и гетеротетрамера сериновых протеаз C1r2C1s2. C1 – это первый белковый комплекс на ранних стадиях классического каскада комплемента, который включает ряд реакций расщепления, начиная с расщепления C4 на C4a и C4b и C2 на C2a и C2b. C4b откладывается и вместе с C2a образует ферментативно активную конвертазу, называемую C3-конвертазой, которая расщепляет компонент комплемента C3 на C3b и C3a, который образует C5-конвертазу. Эта C5-конвертаза расщепляет C5 в C5a и C5b, а последний компонент откладывается на мембране и в свою очередь запускает поздние стадии активации комплемента, при которых конечные компоненты комплемента C5b, C6, C7, C8 и C9 собираются в комплекс мембранной атаки (MAC). Каскад комплемента приводит к образованию пор в клеточной мембране, что вызывает лизис клетки, также известный как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Активацию комплемента можно оценить по эффективности C1q, методами анализа кинетики CDC (как описано в WO 2013/004842, WO 2014/ 108198) или методом клеточного отложения C3b и C4b, описанным в Beurskens et al., April 1, 2012, vol. 188 no. 7, 3532-3541.

Термин “комплемент-зависимая цитотоксичность” (“CDC”) в настоящем изобретении служит для обозначения процесса опосредованной антителами активации комплемента, приводящей к лизису клеток или вирионов при связывании антитела со своей мишенью на клетках или вирионах в результате образования пор в мембране при сборке MAC.

Термин “антителозависимая клеточная цитотоксичность” (“ADCC”) в настоящем изобретении служит для обозначения механизма уничтожения покрытых антителами клеток мишени или вирионов клетками, экспрессирующими Fc-рецепторы, которые распознают константную область связавшихся антител. Термин “антителозависимый клеточный фагоцитоз” (“ADCP”) в настоящем изобретении служит для обозначения

механизма элиминации покрытых антителами клеток мишени или вирионов путем их интернализации фагоцитами. Покрытые антителами интернализированные клетки мишени или вирионы содержатся в пузырьках, называемых фагосомами, которые затем сливаются с одной или несколькими лизосомами с образованием фаголизосом. ADCP можно оценить методом анализа цитотоксичности *in vitro* с макрофагами в качестве эффекторных клеток по видеомикроскопии, как описано в van Bij et al., *Journal of Hepatology*, Volume 53, Issue 4, October 2010, Pages 677-685.

Термин “комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность” (“CDCC”) в настоящем изобретении служит для обозначения механизма уничтожения клеток мишени или вирионов клетками, экспрессирующими рецепторы комплемента, которые распознают продукты расщепления комплемента-3 (C3), ковалентно связанные с клетками мишени или вирионами в результате опосредованной антителами активации комплемента. CDCC можно оценить таким же образом, как описано для ADCC.

Термин “период полужизни в плазме” в настоящем изобретении обозначает время, необходимое для снижения концентрации полипептида в плазме крови наполовину от его начальной концентрации во время элиминации (после фазы распределения). Для антител фаза распределения обычно составляет 1-3 дня, в течение которых концентрация в плазме крови уменьшается примерно на 50% вследствие перераспределения между плазмой и тканями. Период полужизни в плазме может быть измерен методами, хорошо известными в данной области.

Термин “скорость клиренса из плазмы” в настоящем изобретении является количественной мерой скорости, с которой полипептид удаляется из крови при введении в живой организм. Скорость клиренса из плазмы может быть рассчитана как доза/AUC (мл/день/кг), причем значение AUC (площадь под кривой) определяется по кривой концентрация-время.

Термин “конъюгат антитело-лекарственное средство” в настоящем изобретении означает содержащий антитело или Fc полипептид, обладающий специфичностью по меньшей мере к одному типу злокачественных клеток, лекарственное средство и линкер, связывающий лекарственное средство, напр., с антителом. Линкер расщепляется или не расщепляется в присутствии злокачественных клеток, а конъюгат антитело-лекарственное средство уничтожает злокачественные клетки.

Термин “захват конъюгата антитело-лекарственное средство” в настоящем изобретении означает процесс, при котором конъюгаты антитело-лекарственное средство связываются с мишенью на клетках с последующим захватом/поглощением через клеточную мембрану и тем самым поступают в клетки. Захват конъюгата антитело-

лекарственное средство можно оценить методом “анализа опосредованной антителами интернализации и уничтожения клеток при ADC против TF in vitro”, как описано в WO 2011/157741.

Термин “апоптоз” в настоящем изобретении означает процесс запрограммированной смерти клеток (PCD), который может происходить в клетках. Биохимические события приводят к характерным изменениям (морфологии) и гибели клеток. Эти изменения включают блеббинг, сморщивание клеток, фрагментацию ядра, конденсацию хроматина и фрагментацию хромосомной ДНК. Связывание антител с определенными рецепторами может вызвать апоптоз.

Термин “запрограммированная смерть клеток” или “PCD” в настоящем изобретении означает гибель клеток в любом виде, опосредованном внутриклеточной программой. Существуют различные формы PCD, причем общим у различных типов PCD является то, что они запускаются активными клеточными процессами, которые могут быть прерваны путем вмешательства во внутриклеточную передачу сигналов. В одном конкретном воплощении проявление любой формы PCD в клетках или ткани можно определить по окрашиванию клеток или ткани конъюгированным аннексином V, что коррелирует с наличием фосфатидилсерина.

Термин “аннексин V” в настоящем изобретении относится к белку из группы аннексинов, который связывается с фосфатидилсеринем (PS) на поверхности клетки.

Термин “FcRn” в настоящем изобретении служит для обозначения неонатального Fc-рецептора, который является рецептором Fc. Впервые он был обнаружен у грызунов как уникальный рецептор, способный транспортировать IgG из материнского молока через эпителий кишечника новорожденных грызунов в кровотоки новорожденных. Дальнейшие исследования выявили аналогичный рецептор у людей. Однако у людей он находится в плаценте, помогая облегчить транспортировку материнского IgG к растущему плоду, а также было показано, что он играет роль в мониторинге обновления IgG. FcRn связывает IgG при кислом pH 6,0–6,5, но не при нейтральном или более высоком pH. Поэтому FcRn может связывать IgG из просвета кишечника (внутри кишечника) при слегка кислом pH и обеспечивать эффективный однонаправленный транспорт к базолатеральной стороне (внутри организма), где значение pH составляет от нейтрального к щелочному (pH 7,0–7,5). Этот рецептор также играет роль в сохранении IgG у взрослых вследствие его нахождения на пути эндоцитоза в эндотелиальных клетках. Рецепторы FcRn в кислых эндосомах связываются с IgG, интернализированным посредством пиноцитоза, возвращая его на поверхность клетки и высвобождая при щелочном значении pH крови, тем самым предотвращая его деградацию в лизосомах. Этот механизм может

объяснить больший период полужизни IgG в крови по сравнению с другими изотипами.

Термин “белок А” в настоящем изобретении служит для обозначения поверхностного белка MSCRAMM в 56 кДа, первоначально обнаруженного в клеточной стенке бактерий *Staphylococcus aureus*. Он кодируется геном *sra*, а его регуляция контролируется топологией ДНК, клеточной осмолярностью и двухкомпонентной системой, называемой *ArlS-ArlR*. Он нашел применение в биохимических исследованиях благодаря своей способности к связыванию иммуноглобулинов. Он состоит из 5 гомологичных Ig-связывающих доменов, которые складываются в трехспиральный пучок. Каждый домен способен связывать белки многих видов млекопитающих, в особенности IgG. Он связывает Fc-область тяжелой цепи большинства иммуноглобулинов (перекрывая консервативный сайт связывания рецепторов FcRn), а также взаимодействует с областью Fab у семейства V<sub>H3</sub> человека. Посредством этих взаимодействий в сыворотке молекулы IgG связывают бактерии через свою Fc-область, а не только через свои Fab-области, по которым бактерии нарушают опсонизацию, активацию комплемента и фагоцитоз.

Термин “белок G” в настоящем изобретении служит для обозначения связывающего иммуноглобулин белка, который экспрессируется у стрептококковых бактерий группы С и G и очень похож на белок А, но с другой специфичностью. Это белок клеточной поверхности в 65 кДа (белок G типа G148) и в 58 кДа (белок G типа C40), который нашел применение при очистке антител благодаря его связыванию с Fc-областью.

### **Конкретные воплощения изобретения**

Как описано здесь, вне ожидания замены аминокислот в Fc-области полипептидов или антител дают полипептиды или антитела с улучшенными эффекторными функциями, напр., по CDC и/или агонистической активности. Авторы изобретения обнаружили, что при введении мутаций, усиливающих взаимодействия Fc-Fc, типа замены в положении, выбранном из группы, состоящей из: E430, E345 и S440, вместе с заменой по связыванию C1q, Fc-эффекторные функции полипептида или антитела могут быть улучшены. Кроме того, авторы изобретения также обнаружили, что комбинация усиливающей Fc-Fc мутации и замены по связыванию C1q, может давать полипептиды типа антител с агонистическими свойствами или улучшенными агонистическими свойствами.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены полипептиды или антитела, содержащие Fc-область иммуноглобулина человека и участок связывания антигена, причем Fc-область содержит: а) по меньшей мере одну усиливающую Fc-Fc замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345 и S440, при условии, что мутация в S440 представлена S440Y или S440W, и б) по меньшей мере одну замену по

связыванию C1q, при этом положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1969 May, 63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 1991 NIH Publication No. 91-3242)

В одном аспекте изобретения предусмотрены полипептиды или антитела, содержащие Fc-область иммуноглобулина человека и участок связывания антигена, причем Fc-область содержит: а) замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и б) замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

Замена в положении, соответствующем E430, E345, либо замена S440Y или S440W считается усиливающей Fc-Fc заменой по настоящему изобретению.

Замена в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, считается заменой по связыванию C1q по настоящему изобретению.

Мутация в одном из следующих положений: E430, E345 или S440 при условии, что мутация в S440 представлена S440Y или S440W, дает эффект усиления взаимодействий Fc-Fc и олигомеризации у полипептида или антитела. Усиление олигомеризации происходит при связывании антигенсвязывающего участка полипептида или антитела с соответствующим целевым антигеном. При усилении олигомеризации образуются такие, напр., олигомеры, как гексамеры. Образование олигомерных структур типа гексамеров ведет к усилению Fc-эффекторных функций, напр., CDC за счет повышения avidности связывания C1q у полипептида. Комбинация усиливающей Fc-Fc мутации с заменой по связыванию C1q типа одной или нескольких замен в положении, выбранном из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, дает полипептид или антитело с улучшенными эффекторными функциями. Комбинация усиливающей Fc-Fc замены и замены по связыванию C1q также ведет к образованию полипептида или антитела с агонистической активностью. В одном воплощении полипептид или антитело может обладать повышенной агонистической активностью по сравнению с исходным полипептидом или исходным антителом.

Полипептиды или антитела по настоящему изобретению представляют особый интерес при активации внутриклеточного сигнального пути посредством связывания с рецептором на клеточной поверхности.

В одном воплощении по изобретению повышение или усиление Fc-эффекторной функции или активности полипептида или антитела, содержащего усиливающую Fc-Fc замену и замену по связыванию C1q, следует понимать так, что полипептид или антитело

сравнивают с исходным полипептидом или исходным антителом, то есть исходный полипептид или исходное антитело не содержит замен по изобретению, но в остальном они идентичны.

Настоящим изобретением предусмотрены новые терапевтические средства на основе полипептидов или антител с улучшенными свойствами типа CDC и агонистической активности. Так, полипептиды или антитела по изобретению обладают улучшенными свойствами, зависящими от Fc-области, типа CDC, и они также обладают улучшенными свойствами, зависящими от участка связывания антигена, типа агонистической активности.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены полипептиды или антитела, содержащие Fc-область иммуноглобулина человека и участок связывания антигена, причем Fc-область содержит: а) замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и б) замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере одну замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в двух или трех положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены по связыванию C1q, выбранные из одной из групп, состоящих из:

- i) двух замен по связыванию C1q в положениях K326, E333,
- ii) трех замен по связыванию C1q в положениях K326, E333 и P396, и
- iii) трех замен по связыванию C1q в положениях S267, H268 и S324.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен по связыванию C1q находятся в положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, при условии, что замена в положении G236 не представлена G236F, G236R, G236Y.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен по связыванию C1q находятся в положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, при условии, что замена в положении S267 не представлена

S267H, S267I, S267K, S267G.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен по связыванию C1q находятся в положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, при условии, что замена в положении H268 не представлена H268K, H268D, H268E.

В одном воплощении изобретения по меньшей мере одна усиливающая Fc-Fc замена выбрана из группы, состоящей из E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y.

В одном воплощении изобретения по меньшей мере одна усиливающая Fc-Fc замена выбрана из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T.

В одном воплощении изобретения по меньшей мере одна усиливающая Fc-Fc замена выбрана из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену E430G. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену E345K. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену E345R. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену S440Y.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T, и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T, и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы K326, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения Fc-область содержит замену E430G и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y, и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы: G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y, и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы: K326, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения Fc-область содержит замену E345K и замену в

одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения Fc-область содержит замену E345R и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из S440Y и S440W, и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из S440Y и S440W, и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы K326, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения Fc-область содержит замену S440Y и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

Итак, предусмотрены воплощения, которые обеспечивают усиление связывания C1q и/или агонистических свойств полипептидов или антител при связывании антигена на клеточной поверхности. В одном воплощении изобретения полипептиды или антитела обладают улучшенными агонистическими свойствами. В одном воплощении изобретения полипептиды или антитела включают Fc-область, содержащую первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, при этом одна из вышеприведенных замен может находиться в первой и/или второй тяжелой цепи.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из K326, E333 и P396. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены типа двух или трех замен в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из K326, E333 и P396. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях K326 и E333. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях K326 и P396. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях P396 и E333. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях K326, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену в положении E430 и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из K326, E333 и P396. В одном воплощении изобретения полипептид или







одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену в положении E345 и замены в положениях H268 и S324. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену в положении E345 и замены в положениях S267, H268 и S324.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S440Y или S440W и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из S267, H268 и S324. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S440Y или S440W и замены в одном или нескольких положениях типа двух или трех положений, выбранных из группы, состоящей из S267, H268 и S324. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S440Y или S440W и замены в положениях S267 и H268. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S440Y или S440W и замены в положениях S267 и S324. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S440Y или S440W и замены в положениях H268 и S324. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S440Y или S440W и замены в положениях S267, H268 и S324.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен выбраны из группы, состоящей из S267E, H268F и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит одну или несколько типа двух или трех замен, выбранных из группы, состоящей из S267E, H268F и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S267E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену H268F. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S267E и H268F. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S267E и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены H268F и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S267E, H268F и S324T.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит: а) по меньшей мере одну замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и б) по меньшей мере одну замену, выбранную из одной из следующих групп, состоящих из:

- i. K326A,
- ii. E333A,
- iii. E333T,
- iv. P396L,

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену в положении E430 и по меньшей мере одну замену, выбранную из одной из следующих групп, состоящих из:

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

Итак, предусмотрены воплощения, в которых одна замена находится в положении E430. В одном воплощении замена в положении E430 выбрана из группы, состоящей из: E430G, E430S, E430F, E430T.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену E430G и замену, выбранную из одной из следующих групп, состоящих из:

- i. K326A,
- ii. E333A,
- iii. E333T,

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430G, K326W и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430G, K326A и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430G, K333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430G, K326A, E333A и P396L.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430S, K326W и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430S, K326A и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430S, K333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430S, K326A, E333A и P396L.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430F, K326W и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430F, K326A и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430F, K333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430F, K326A, E333A и P396L.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430T, K326W и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430T, K326A и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430T, K333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430T, K326A, E333A и P396L.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену в положении E345 и по меньшей мере одну замену, выбранную из одной из следующих групп, состоящих из:

- i. K326A,

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

Итак, предусмотрены воплощения, в которых одна замена находится в положении E345. В одном воплощении замена в положении E345 выбрана из группы, состоящей из: E345K, E345Q, E345R, E345Y.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену E345K и по меньшей мере одну замену, выбранную из одной из следующих групп, состоящих из:

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345K, K326W и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело

содержит замены E345K, K326A и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345K, K326A, E333A и P396L.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену E345R и по меньшей мере одну замену, выбранную из одной из следующих групп, состоящих из:

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K326W и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K326A и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K326A, E333A и P396L.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345Q, K326W и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345Q, K326A и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345Q, K333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345Q, K326A, E333A и P396L.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345Y, K326W и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345Y, K326A и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345Y, K333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345Y, K326A, E333A и P396L.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S440Y или S440W и по меньшей мере одну замену, выбранную из одной из следующих групп, состоящих из:

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S440Y и по меньшей мере одну замену, выбранную из одной из следующих групп, состоящих из:

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены

S440Y, K326W и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S440Y, K326A и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S440Y, K333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S440Y, K326A, E333A и P396L.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S440W, K326W и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S440W, K326A и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S440W, K333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S440W, K326A, E333A и P396L.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело дополнительно содержит одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из G236A, I332E, S239D и I332E.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело дополнительно содержит по меньшей мере две замены, выбранные из группы, состоящей из:

- i. G236A, I332E, и
- ii. S239D, I332E.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит: а) по меньшей мере одну замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и б) замены, выбранные из одной из следующих групп, состоящих из:

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену в положении E430 и замены, выбранные из одной из следующих групп, состоящих из:

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену E430G и замены, выбранные из одной из следующих групп, состоящих из:

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

iv. S267E, H268F, S324T, S239D, I332E.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену в положении E345 и замены, выбранные из одной из следующих групп, состоящих из:

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену E345K и замены, выбранные из одной из следующих групп, состоящих из:

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену E345R и замены, выбранные из одной из следующих групп, состоящих из:

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S440Y или S440W и замены, выбранные из одной из следующих групп, состоящих из:

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S440Y и замены, выбранные из одной из следующих групп, состоящих из:

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

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит одну или несколько дополнительных замен. Так, в одном воплощении изобретения полипептид или антитело согласно любому описанному здесь аспекту или воплощению содержит одну или несколько дополнительных замен в Fc-области.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит дополнительную замену, соответствующую положению K439, или, если Fc-область не содержит замены в положении S440, то дополнительная замена может быть в положении S440.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит дополнительную замену в полипептиде или антителе, соответствующую положению K439 или S440, при условии, что замена в S440 не представлена S440Y или S440W.

Полипептиды или антитела, содержащие усиливающую Fc-Fc замену и замену по связыванию C1q по настоящему изобретению и дополнительную замену в положении S440 типа S440K, не образуют олигомеров с полипептидами или антителами, содержащими замену в положении S440 типа S440K. Полипептиды или антитела, содержащие усиливающую Fc-Fc замену и замену по связыванию C1q по настоящему изобретению и дополнительную замену в положении K439 типа K439E, не образуют олигомеров с полипептидами или антителами, содержащими мутацию в положении K439 типа K439E. В одном воплощении дополнительная замена выбрана из S440K или K439E.

В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит дополнительную замену, которая представляет собой замену, ингибирующую гексамеризацию, и соответствует K439E или S440K в IgG1 человека по нумерации EU. Так, в одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит усиливающую Fc-Fc замену типа E430G и ингибирующую гексамеризацию замену K439E. В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит усиливающую Fc-Fc замену типа E345K и ингибирующую гексамеризацию замену K439E. В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит усиливающую Fc-Fc замену типа E430G и ингибирующую гексамеризацию замену S440K. В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит усиливающую Fc-Fc замену типа E345K и ингибирующую гексамеризацию замену S440K. Итак, предусмотрены воплощения, которые обеспечивают исключительную гексамеризацию между комбинациями антител, содержащих замену K439E, и антител, содержащих замену S440K. То есть ингибирующие замены K439E и S440K можно рассматривать как комплементарные замены. Комбинации антител с двумя различными комплементарными заменами, ингибирующими гексамеризацию, могут представлять особый интерес в композициях, содержащих по меньшей мере два антитела с различной специфичностью.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит: а) замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 не представлена S440Y или S440W, и б) замену в одном или нескольких

положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, и с) замену K439E.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит: а) замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430 и E345, и б) замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, и с) замену S440K.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430G, K326W, E333S и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430G, K326A, E333A и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430G, K333A, P396L и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430G, K326A, E333A, P396L и K439E.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345K, K326W, E333S и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345K, K326A, E333A и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345K, K333A, P396L и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345K, K326A, E333A, P396L и K439E.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K326W, E333S и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K326A, E333A и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K333A, P396L и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K326A, E333A, P396L и K439E.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S440Y, K326W, E333S и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S440Y, K326A, E333A и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S440Y, K333A, P396L и K439E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S440Y, K326A, E333A, P396L и K439E.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит: а) замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430 и E345, и б) замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, и с) замену S440K.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены

E430G, K326W, E333S и S440K. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430G, K326A, E333A и S440S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430G, K333A, P396L и S440S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E430G, K326A, E333A, P396L и S440K.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345K, K326W, E333S и S440K. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345K, K326A, E333A и S440K. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345K, K333A, P396L и S440K. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345K, K326A, E333A, P396L и S440K.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K326W, E333S и S440K. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K326A, E333A и S440S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K333A, P396L и S440K. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E345R, K326A, E333A, P396L и S440K.

Полипептид или антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну усиливающую Fc-Fc замену и одну или несколько замен по связыванию C1q, но, как описано выше, также может содержать дополнительные замены для введения дополнительных функций в полипептид или антитело. В одном воплощении полипептид или антитело содержит не более 10 замен, как-то девять замен, как-то восемь замен, как-то семь замен, как-то шесть замен, как-то пять замен, как-то четыре замены, как-то три замены или же две замены.

Итак, предусмотрены воплощения, которые позволяют полипептидам или антителам по изобретению иметь дополнительные замены, которые вводят дополнительные признаки в полипептид или антитело. Кроме того, дополнительные замены также допускают изменения Fc-области в положениях, не участвующих во взаимодействии Fc-Fc, а также в положениях, не вовлеченных в Fc-эффекторные функции. Кроме того, дополнительные замены могут быть связаны и с аллельными вариациями.

В одном воплощении изобретения Fc-эффекторная функция у полипептида или антитела повышается по меньшей мере на 20% по сравнению с исходным полипептидом или исходным антителом, которое идентично данному антителу за исключением того, что оно не содержит усиливающей Fc-Fc замены и замены по связыванию C1q в Fc-области.

В одном воплощении изобретения Fc-эффекторная функция у полипептида или

антитела повышается по меньшей мере на 40%, на 50% или на 60% по сравнению с исходным полипептидом или исходным антителом, которое идентично данному антителу за исключением того, что оно не содержит усиливающей Fc-Fc замены и замены по связыванию C1q в Fc-области.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело обладает повышенной Fc-эффекторной функцией.

В одном воплощении изобретения Fc-эффекторная функция выбрана из следующей группы: комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность, активация комплемента, антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз, связывание C1q и связывание FcγR. В одном воплощении Fc-эффекторная функция представляет собой сигнализацию FcγRIIIa. То есть вторая мутация по изобретению способна уменьшить по меньшей мере одну Fc-эффекторную функцию.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело обладает агонистической активностью. То есть полипептид или антитело обладает агонистической активностью по сравнению с исходным полипептидом или исходным антителом.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело обладает повышенной агонистической активностью. То есть полипептид или антитело обладает повышенной агонистической активностью по сравнению с исходным полипептидом или исходным антителом. В одном воплощении полипептид или антитело обладает повышенной агонистической активностью по сравнению с полипептидом или антителом, содержащим такую же усиливающую Fc-Fc мутацию, но не содержащую мутации по C1q.

Агонистическая активность рецепторов TNFR-SF требует экзогенного сшивания для проявления агонистической активности. Это можно измерить косвенным методом, напр., на клетках HEK293, содержащих управляемый NF-kB секретируемый репортерный ген (напр., экспрессирующий люциферазу ген pMetLuc-Reporter, Clontech), которые стабильно трансфицированы представляющим интерес рецептором TNFR-SF. Перекрестная сшивка рецептора ведет к активации промотора и секреции, напр., белка люциферазы в среду. В нужные моменты времени можно измерить активность люциферазы для анализа, отбирая образец среды и добавляя субстрат. Активность люциферазы, которая является мерой агонистической активности, можно измерить на люминометре. См. пример для OX40 в Zhang et al., J Biol Chem., 2016 Dec 30, 291(53): 27134-27146.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело обладает повышенной агонистической активностью. То есть полипептид или антитело обладает повышенной

агонистической активностью по сравнению с исходным полипептидом или исходным антителом.

В одном воплощении изобретения полипептид представляет собой антитело, моноспецифичное антитело, биспецифичное антитело или мультиспецифичное антитело. В одном воплощении полипептид представляет собой моноспецифичный полипептид, биспецифичный полипептид или мультиспецифичный полипептид.

Полипептиды по изобретению не ограничиваются антителами, содержащими природный, напр., человеческий Fc-домен, но они также могут представлять собой антитела, содержащие другие мутации, отличные от мутаций по настоящему изобретению, как-то, напр., мутации, затрагивающие гликозилирование или позволяющие антителу становиться биспецифичным антителом. Термином “природное антитело” обозначаются любые антитела, которые не содержат генетически введенных мутаций. При этом антитело, которое содержит природные модификации, напр., различные аллотипы, следует понимать как “природное антитело” в смысле настоящего изобретения и тем самым как исходное антитело. Такие антитела могут служить матрицей как минимум для двух замен по настоящему изобретению и поэтому они составляют антитела по изобретению. Примером исходного антитела, содержащего другие замены, чем замены по настоящему изобретению, является биспецифичное антитело, описанное в WO 2011/131746 (Genmab), где использовались восстановительные условия для активации обмена половинок молекул двух антител, содержащих IgG4-подобные участки C<sub>H3</sub>, получая тем самым биспецифичные антитела без сопутствующего образования агрегатов. Другие примеры исходных антител включают, без ограничения, биспецифичные антитела типа гетеродимерных: Triomabs (Fresenius); биспецифичные IgG1 и IgG2 (Rinat Neurosciences Corporation); FcΔAdp (Regeneron); knobs-into-holes (Genentech); electrostatic steering (Amgen, Chugai, Oncomed); SEEDbody (Merck); асимметрические каркасы (Zymeworks); mAb-Fv (Xencor); и LUZ-Y (Genentech). Другие типичные форматы исходных антител включают, без ограничения, антитела дикого типа, полноразмерные антитела или Fc-содержащие фрагменты антител, человеческие антитела, гуманизованные антитела, химерные антитела или любые их комбинации.

В одном воплощении полипептид или антитело содержит Fc-область, содержащую замену R435H.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрены полипептиды или антитела, содержащие Fc-область иммуноглобулина человека и участок связывания антигена, причем Fc-область содержит: а) замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и б) замену в одном или

нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333, P396, и с) замену R435H, при этом положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

Полипептид или антитело может представлять собой любое человеческое антитело любого изотипа, напр., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM или IgA, необязательно полноразмерное человеческое антитело типа полноразмерного антитела IgG1 человека.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело представляет собой антитело IgG1 человека, напр., аллотипа IgG1m(za) или IgG1m(f).

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит Fc-область изотипа IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM, IgA человека или смешанного изотипа. То есть Fc-область полипептида или антитела по изобретению содержит по меньшей мере первую и вторую мутацию, введенные в Fc-область соответствующего изотипа IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM, IgA человека или смешанного изотипа. В одном воплощении изобретения Fc-область имеет смешанный изотип, выбранный из следующей группы: IgG1/IgG2, IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4 и IgG3/IgG4. При смешанном изотипе Fc-область состоит из аминокислотной последовательности более чем одного изотипа.

В одном воплощении изобретения Fc-область представлена изотипом IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека или смешанным изотипом.

В одном воплощении изобретения Fc-область представлена IgG человека.

В предпочтительном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит Fc-область, которая представлена изотипом IgG1 человека.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит Fc-область, которая представлена аллотипом IgG1m(f), IgG1m(a), IgG1m(z), IgG1m(x) или смешанным аллотипом.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит Fc-область, приведенную в SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 89, 168, 169 или 170, причем Fc-область содержит замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представлена S440Y или S440W, и замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, при этом положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит Fc-область, приведенную в SEQ ID NO: 77, 78 или 90, причем Fc-область содержит замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268,

S324, K326, I332, E333 и P396, при этом положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит Fc-область, приведенную в SEQ ID NO: 80, 82, 83, 84, 87 или 88.

В одном воплощении изобретения полипептид представляет собой человеческое антитело, гуманизованное антитело или химерное антитело.

### **Мультиспецифичные антитела**

Полипептиды или антитела по изобретению не ограничиваются антителами, содержащими природный, напр., человеческий Fc-домен, но они также могут представлять собой антитела, содержащие другие мутации, отличные от мутаций по настоящему изобретению, как-то, напр., мутации, затрагивающие гликозилирование или позволяющие антителу становиться мультиспецифичным антителом или биспецифичным антителом. Термином “природное антитело” обозначаются любые антитела, которые не содержат генетически введенных мутаций. При этом антитело, которое содержит природные модификации, напр., различные аллотипы, следует понимать как “природное антитело” в смысле настоящего изобретения и тем самым как исходное антитело. Такие антитела могут служить матрицей как минимум для двух замен по настоящему изобретению и поэтому они составляют антитела по изобретению. Примером исходного антитела, содержащего другие замены, чем замены по настоящему изобретению, является биспецифичное антитело, описанное в WO 2011/131746 (Genmab), где использовались восстановительные условия для активации обмена половинок молекул двух антител, содержащих IgG4-подобные участки C<sub>H</sub>3, получая тем самым биспецифичные антитела без сопутствующего образования агрегатов. Другие примеры исходных антител включают, без ограничения, биспецифичные антитела типа гетеродимерных: Triomabs (Fresenius); биспецифичные IgG1 и IgG2 (Rinat Neurosciences Corporation); FcΔAdp (Regeneron); knobs-into-holes (Genentech); electrostatic steering (Amgen, Chugai, Oncomed); SEEDbody (Merck); асимметрические каркасы (Zymeworks); mAb-Fv (Xencor); и LUZ-Y (Genentech). Другие типичные форматы исходных антител включают, без ограничения, антитела дикого типа, полноразмерные антитела или Fc-содержащие фрагменты антител, человеческие антитела, гуманизованные антитела, химерные антитела или любые их комбинации.

Следует иметь в виду, что в описанном ниже аспекте мультиспецифичных антител могут использоваться любые воплощения настоящего изобретения, описанные здесь. Так, в одном воплощении варианты по настоящему изобретению представляют собой антитела, выбранные из моноспецифичных антител, биспецифичных антител или

мультиспецифичных антител. В одном конкретном воплощении биспецифичные антитела имеют формат, описанный в WO 2011/131746.

Биспецифичные антитела по настоящему изобретению не ограничиваются определенным форматом и могут быть любыми из описанных здесь.

В другом аспекте изобретения предусмотрены полипептиды или антитела, которые составляют биспецифичный полипептид или антитело, содержащее первую тяжелую цепь иммуноглобулина и первый участок связывания антигена, и второй полипептид или антитело, содержащее вторую тяжелую цепь иммуноглобулина и второй участок связывания антигена, причем первый и второй участки связывания антигена связывают разные эпитопы на одном и том же или на разных антигенах, причем первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

а) замену в положении, выбранном из группы, соответствующей E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представлена S440Y или S440W,

б) одну или несколько замен в положении, выбранном из группы, состоящей из G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396,

с) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: K409, T366, L368, K370, D399, F405 и Y407;

а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из F405, T366, L368, K370, D399, Y407 и K409, при этом дополнительная мутация в первом полипептиде отличается от дополнительной мутации во втором полипептиде.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены полипептиды или антитела, включающие Fc-область IgG человека, содержащую первую тяжелую цепь и первый участок связывания антигена, вторую тяжелую цепь и второй участок связывания антигена, причем первая и вторая тяжелая цепь содержит: а) замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345 и S440, при условии, что замена в S440 представлена S440Y или S440W, и б) замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, и с) дополнительную замену в положении F405 или K409; причем дополнительные замены различны у первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи с тем, что если первая тяжелая цепь содержит замену в положении F405, то вторая тяжелая цепь содержит замену в K409 и наоборот.

Итак, предусмотрены воплощения, в которых первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь не идентичны, так как (с) дополнительная мутация находится не в одном и том же положении в первой и второй тяжелой цепи.

Следует иметь в виду, что в описанном ниже аспекте мультиспецифичных антител могут использоваться любые воплощения настоящего изобретения, описанные здесь. Так, в одном воплощении варианты по настоящему изобретению представляют собой антитела, выбранные из моноспецифичных антител, биспецифичных антител или мультиспецифичных антител. В одном конкретном воплощении биспецифичные антитела имеют формат, описанный в WO 2011/131746.

В одном конкретном воплощении настоящего изобретения первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409 типа K409R; а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405 типа F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

- a) замену, соответствующую положению E430,
- b) замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396,
- c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R; а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

- a) замену, соответствующую положению E345,
- b) замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396,
- c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R; а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

- a) замену, соответствующую S440Y или S440W,
- b) замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396,
- c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R; а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E430G,  
b) две замены, соответствующие K326W, E333S,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E430G,  
b) две замены, соответствующие K326W, E333T,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E430G,  
b) две замены, соответствующие K326A, E333A,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E430G,  
b) две замены, соответствующие K333A, P396L,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E430G,  
b) три замены, соответствующие K326A, E333A, P396L,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E430G,  
b) три замены, соответствующие K326A, E333T, P396L,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E345K,  
b) две замены, соответствующие K326W, E333S,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E345K,  
b) две замены, соответствующие K326W, E333T,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E345K,  
b) две замены, соответствующие K326A, E333A,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E345K,  
b) две замены, соответствующие K333A, P396L,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E345K,  
b) три замены, соответствующие K326A, E333A, P396L,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E345K,  
b) три замены, соответствующие K326A, E333T, P396L,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E345R,  
b) две замены, соответствующие K326W, E333S,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E345R,  
b) две замены, соответствующие K326W, E333T,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E345R,  
b) две замены, соответствующие K326A, E333A,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E345R,  
b) две замены, соответствующие K333A, P396L,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую E345R,  
b) три замены, соответствующие K326A, E333A, P396L,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую S440Y,  
b) две замены, соответствующие K326W, E333S,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую S440Y,  
b) две замены, соответствующие K326W, E333T,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

a) замену, соответствующую S440Y,  
b) две замены, соответствующие K326A, E333A,  
c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

- a) замену, соответствующую S440Y,
- b) две замены, соответствующие K333A, P396L,
- c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

В одном воплощении настоящего изобретения первая и/или вторая тяжелая цепь содержит:

- a) замену, соответствующую S440Y,
- b) три замены, соответствующие K326A, E333A, P396L,
- c) причем первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую K409R, а вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену, соответствующую F405L.

### **Мишени и способы применения**

Полипептиды или антитела по настоящему изобретению могут связывать мишени, которые активируют пути передачи сигналов. В одном воплощении мишенью является мишень, которая активирует, ингибирует, модулирует и/или регулирует путь передачи сигналов. Примерами мишеней, которые могут быть особенно пригодными в качестве мишеней по настоящему изобретению, являются рецепторы на клеточной поверхности и лиганды.

Рецепторы на клеточной поверхности включают, к примеру, рецепторы, принадлежащие к таким семействам рецепторов, как семейство рецепторов гемопозитических факторов, семейство рецепторов цитокинов, семейство тирозинкиназных рецепторов, семейство серин/треонинкиназных рецепторов, семейство рецепторов TNF, семейство связанных с G-белком рецепторов, семейство рецепторов GPI, семейство тирозинфосфатазных рецепторов, семейство факторов адгезии и семейство гормональных рецепторов. Имеются различные ссылки, касающиеся рецепторов, принадлежащих к этим семействам рецепторов, и их характеристик, которые включают, к примеру, Cooke B.A., King R.J.B., van der Molen H.J., ed. *New Comprehensive Biochemistry*, Vol. 18B "Hormones and their Actions Part II" pp. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., New York, USA; Patthy L. (1990) *Cell*, 61: 13-14; Ullrich A. et al. (1990) *Cell*, 61: 203-212; Massagel J. (1992) *Cell*, 69: 1067-1070; Miyajima A. et al. (1992) *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 295-331; Taga T. and Kishimoto T. (1992) *FASEB J.*, 7: 3387-3396; Fantl W.I. et al. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 453-481; Smith C.A. et al. (1994) *Cell*, 76: 959-962; Flower D.R. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1422: 207-234; и M. Miyasaka, ed., *Cell Technology*, supplementary volume, Handbook series, "Handbook for Adhesion Factors" (1994) (Shujunsha, Tokyo, Japan).

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит участок связывания антигена, причем участок связывания антигена связывается с представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR-SF) или суперсемейства связанных с G-белком рецепторов (GPCR).

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело связывается с рецептором на клеточной поверхности, включая, к примеру, рецепторы гормонов и рецепторы цитокинов. Типичные рецепторы цитокинов включают, к примеру, рецепторы гемопоэтических факторов, рецепторы лимфокинов, рецепторы факторов роста, рецепторы контролирующих дифференцировку факторов и т.п. Примеры рецепторов цитокинов: рецептор эритропоэтина (EPO), рецептор тромбопоэтина (TPO), рецептор колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF), рецептор колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF), рецептор колониестимулирующего фактора гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF), рецептор фактора некроза опухолей (TNF), рецептор интерлейкина-1 (IL-1), рецептор интерлейкина-2 (IL-2), рецептор интерлейкина-3 (IL-3), рецептор интерлейкина-4 (IL-4), рецептор интерлейкина-5 (IL-5), рецептор интерлейкина-6 (IL-6), рецептор интерлейкина-7 (IL-7), рецептор интерлейкина-9 (IL-9), рецептор интерлейкина-10 (IL-10), рецептор интерлейкина-11 (IL-11), рецептор интерлейкина-12 (IL-12), рецептор интерлейкина-13 (IL-13), рецептор интерлейкина-15 (IL-15), рецептор  $\alpha$ -интерферона (IFN- $\alpha$ ), рецептор  $\beta$ -интерферона (IFN- $\beta$ ), рецептор  $\gamma$ -интерферона (IFN- $\gamma$ ), рецептор гормона роста (GH), рецептор инсулина, рецептор фактора пролиферации стволовых клеток крови (SCF), рецептор фактора роста сосудистого эпидермиса (VEGF), рецептор фактора роста эпидермальных клеток (EGF), рецептор фактора роста нервов (NGF), рецептор фактора роста фибробластов (FGF), рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGF), рецептор  $\beta$ -трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ), рецептор ингибирующего миграцию лейкоцитов фактора (LIF), рецептор цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), рецептор онкостатина M (OSM) и рецепторы семейства Notch.

Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF) представляет собой группу рецепторов, характеризующихся способностью к связыванию лигандов суперсемейства фактора некроза опухолей (TNFSF) через внеклеточный богатый цистеином домен. Рецепторы TNF образуют тримерные комплексы в плазматической мембране. TNFRSF включает следующие 29 белков: TNFR1 (Uniprot P19438), FAS (Uniprot P25445), DR3 (Uniprot Q93038), DR4 (Uniprot O00220), DR5 (Uniprot O14763), DR6 (Uniprot O75509), NGFR (Uniprot P08138), EDAR (Uniprot Q9UNE0), DcR1 (Uniprot O14798), DcR2 (Uniprot Q9UBN6), DcR3 (Uniprot O95407), OPG (Uniprot O00300), TROY

(Uniprot Q9NS68), XEDAR (Uniprot Q9HAV5), LTbR (Uniprot P36941), HVEM (Uniprot Q92956), TWEAKR (Uniprot Q9NP84), CD120b (Uniprot P20333), OX40 (Uniprot P43489), CD40 (Uniprot P25942), CD27 (Uniprot P26842), CD30 (Uniprot P28908), 4-1BB (Uniprot Q07011), RANK (Uniprot Q9Y6Q6), TACI (Uniprot O14836), BLYSR (Uniprot Q96RJ3), BCMA (Uniprot Q02223), GITR (Uniprot Q9Y5U5), RELT (Uniprot Q969Z4).

Некоторые TNFRSF участвуют в апоптозе и содержат внутриклеточный домен смерти, как-то FAS, DR4, DR5, TNFR1, DR6, DR3, EDAR и NGFR. Другие TNFRSF вовлечены в другие пути передачи сигналов типа пролиферации, выживания и дифференцировки, как-то DcR1, DcR2, DcR3, OPG, TROY, XEDAR, LTbR, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLYSR, BCMA, GITR, RELT. Рецепторы TNF экспрессируются в самых разных тканях млекопитающих, особенно в лейкоцитах.

В одном воплощении изобретения участок связывания антигена связывается с представителем TNFR-SF, выбранным из группы, состоящей из: FAS, DR4, DR5, TNFR1, DR6, DR3, EDAR, NGFR, OX40, CD40, CD30, CD27, 4-1BB, RANK, TACI, BLYSR, BCMA, RELT и GITR.

В одном воплощении изобретения участок связывания антигена связывается с представителем TNFR-SF. В одном воплощении изобретения участок связывания антигена связывается с таким представителем TNFR-SF, который не содержит внутриклеточного домена смерти. В одном воплощении изобретения TNFR-SF выбран из группы: OX40, CD40, CD30, CD27, 4-1BB, RANK, TACI, BLYSR, BCMA, RELT и GITR. В одном воплощении изобретения TNFR-SF выбран из группы: FAS, DR4, DR4, TNFR1, DR6, DR3, EDAR и NGFR.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с OX40, причем Fc-область IgG1 содержит:

- a. замену E430G и
- b. замены K326W и E333S.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с CD40, причем Fc-область IgG1 содержит:

- a. замену E430G и
- b. замены K326W и E333S.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с CD137, причем Fc-область IgG1 содержит:

- a. замену E430G и
- b. замены K326W и E333S.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с GITR, причем Fc-область IgG содержит:

- a. замену E430G и
- b. замены K326W и E333S.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с GITR, причем Fc-область IgG1 содержит:

- a. замену E430G и
- b. замены K326W и E333S.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с GITR, причем Fc-область IgG2 содержит:

- a. замену E430G и
- b. замены K326W и E333S.

Полипептид или антитело по изобретению может связываться с любой мишенью, а примеры таких мишеней или антигенов по изобретению могут быть направлены против: TNFR1, FAS, DR3, DR4, DR5, DR6, NGFR, EDAR, DcR1, DcR2, DcR3, OPG, TROY, XEDAR, LTbR, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, GITR, RELT.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с FAS, причем Fc-область IgG1 содержит:

- a. замену E430G и
- b. замены K326W и E333S.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с DR5, причем Fc-область IgG1 содержит:

- a. замену E430G и
- b. замены K326A и E333A.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с DR5, причем Fc-область IgG1 содержит:

- a. замену E430G и
- b. замены K326A и E333T.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с DR5, причем Fc-область IgG1 содержит:

- a. замену E430G и
- b. замену K326A.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с DR5, причем Fc-область IgG1 содержит:

a. замену E430G и

b. замену E333A.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с DR5, причем Fc-область IgG1 содержит:

a. замену E430G и

b. замены K326W и E333S.

В одном воплощении изобретения антитело содержит участок связывания антигена, который связывается с CD20, причем Fc-область IgG1 содержит:

a. замену E430G и

b. замены K326W и E333S.

В одном воплощении изобретения участок связывания антигена связывается с представителем суперсемейства фактора некроза опухолей (TNF-SF).

В одном воплощении изобретения участок связывания антигена связывается с представителем TNF-SF, выбранным из группы, состоящей из:  $\beta$ -лимфотоксина (TNF-C), OX40L, CD154, FasL, CD70, CD153, RANKL, APRIL и BAFF.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело связывается с рецептором на клеточной поверхности, включая, к примеру, рецепторы гормонов и рецепторы цитокинов. Типичные рецепторы цитокинов включают, к примеру, рецепторы гемопоэтических факторов, рецепторы лимфокинов, рецепторы факторов роста, рецепторы контролирующих дифференцировку факторов и т.п. Примеры рецепторов цитокинов: рецептор эритропоэтина (EPO), рецептор тромбопоэтина (TPO), рецептор колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF), рецептор колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF), рецептор колониестимулирующего фактора гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF), рецептор фактора некроза опухолей (TNF), рецептор интерлейкина-1 (IL-1), рецептор интерлейкина-2 (IL-2), рецептор интерлейкина-3 (IL-3), рецептор интерлейкина-4 (IL-4), рецептор интерлейкина-5 (IL-5), рецептор интерлейкина-6 (IL-6), рецептор интерлейкина-7 (IL-7), рецептор интерлейкина-9 (IL-9), рецептор интерлейкина-10 (IL-10), рецептор интерлейкина-11 (IL-11), рецептор интерлейкина-12 (IL-12), рецептор интерлейкина-13 (IL-13), рецептор интерлейкина-15 (IL-15), рецептор  $\alpha$ -интерферона (IFN- $\alpha$ ), рецептор  $\beta$ -интерферона (IFN- $\beta$ ), рецептор  $\gamma$ -интерферона (IFN- $\gamma$ ), рецептор гормона роста (GH), рецептор инсулина, рецептор фактора пролиферации стволовых клеток крови (SCF), рецептор фактора роста сосудистого эпидермиса (VEGF), рецептор фактора роста эпидермальных клеток (EGF), рецептор фактора роста нервов (NGF), рецептор фактора роста фибробластов (FGF), рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGF), рецептор  $\beta$ -трансформирующего

фактора роста (TGF- $\beta$ ), рецептор ингибирующего миграцию лейкоцитов фактора (LIF), рецептор цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), рецептор онкостатина М (OSM) и рецепторы семейства Notch.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело связывается с рецептором на клеточной поверхности, выбранным из группы, состоящей из: CTLA-4, PD1, TIM-3, LAG-3, ICOS, CD28 и PDL-1.

Полипептид или антитело по изобретению может связываться с любой мишенью, а примеры таких мишеней или антигенов описаны выше.

#### **Способы повышения агонистической активности полипептидов или антител**

Предполагается, что описанные ниже воплощения со ссылкой на полипептиды или антитела относятся к полипептидам или антителам, содержащим Fc-область иммуноглобулина и участок связывания антигена, причем полипептиды или антитела также могут составлять мультиспецифичные полипептиды или антитела, содержащие первую Fc-область иммуноглобулина и первый участок связывания антигена, и второй полипептид или антитело, содержащее вторую Fc-область иммуноглобулина и второй участок связывания антигена.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептидов или антител путем введения усиливающей Fc-Fc замены и замены по связыванию C1q.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептидов или антител, содержащих Fc-область иммуноглобулина человека и участок связывания антигена, который включает: а) введение по меньшей мере одной замены в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замены S440Y или S440W, и б) введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

Введение а) по меньшей мере одной замены по изобретению в одно из следующих положений E430, E345 или S440 дает эффект усиления взаимодействий Fc-Fc у полипептидов или антител. Введение б) одной или нескольких замен по изобретению в одно из следующих положений G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396 дает эффект повышения агонистической активности у полипептидов или антител.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептидов или антител, содержащих Fc-область иммуноглобулина человека и участок связывания антигена, причем Fc-область содержит а) по меньшей мере одну замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430,

E345, либо замену S440Y или S440W, а способ включает b) введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептидов или антител, содержащих Fc-область иммуноглобулина человека и участок связывания антигена, причем Fc-область содержит а) по меньшей мере одну замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, а способ включает b) введение по меньшей мере двух замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

Повышение агонистической активности полипептидов или антител по настоящему изобретению следует понимать как повышение агонистической активности полипептида или антитела по сравнению с исходным полипептидом или антителом, или же повышение агонистической активности полипептида или антитела также может означать то, что полипептид или антитело сравнивают с полипептидом или антителом, содержащим усиливающую Fc-Fc мутацию, но не мутацию по связыванию C1q. Таким образом, следует понимать, что полипептид или антитело можно сравнивать с исходным полипептидом или исходным антителом, содержащим идентичный участок связывания антигена и Fc-область без усиливающей Fc-Fc замены и без замены по связыванию C1q, или же полипептид или антитело можно сравнивать с полипептидом или антителом, содержащим идентичный участок связывания антигена и Fc-область с усиливающей Fc-Fc заменой, но без замены по связыванию C1q.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен находятся в положении, выбранном из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, при условии, что замена в положении G236 не представлена G236F, G236R, G236Y.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен находятся в положении, выбранном из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, при условии, что замена в положении S267 не представлена S267H, S267I, S267K, S267G.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен находятся в положении, выбранном из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, при условии, что замена в положении H268 не представлена H268K, H268D, H268E.

В одном воплощении изобретения по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W

и S440Y. Таким образом, предусмотрены воплощения, в которых замена усиливает взаимодействия Fc-Fc.

В одном воплощении изобретения по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F, E430T.

В одном воплощении изобретения по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R, E345Y.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену E430G. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену E345K. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену E345R. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену S440Y.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E430G, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E430G, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E430G, причем способ включает введение замен из одной из групп, состоящих из:

- i) K326W и E333S,
- ii) K326W и E333T,

- iii) K326A и E333A,
- iv) K326A, E333A и P396L,
- v) K326W,
- vi) E333S,
- vii) E333T.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345K, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345K, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345K, причем способ включает введение замен из одной из групп, состоящих из:

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

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения

агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345R, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345R, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345R, причем способ включает введение замен из одной из групп, состоящих из:

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

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из S440Y и S440W, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из S440Y и S440W, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену S440Y, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит

замену S440Y, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену S440Y, причем способ включает введение замен из одной из групп, состоящих из:

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

Итак, предусмотрены воплощения, которые способствуют усилению агонистических свойств полипептидов или антител при связывании антигена клеточной поверхности. В одном воплощении полипептиды или антитела имеют повышенные агонистические свойства. В одном воплощении полипептиды или антитела содержат Fc-область, содержащую первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, причем одна из вышеприведенных замен может находиться в первой и/или второй тяжелой цепи.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен находятся в положении, выбранном из группы, состоящей из K326, E333 и P396. В одном воплощении изобретения одна или несколько замен типа двух или трех замен находятся в положениях, выбранных из группы, состоящей из K326, E333 и P396. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях K326 и E333. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях K326 и P396. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях P396 и E333. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях K326, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит одну или несколько типа двух или трех замен, выбранных из группы, состоящей из K326A, K326W, E333S, E333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену K326A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену K326W. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело

содержит замены K326W и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены K326W и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены K326W и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены K326A и E333A. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены K326A и E333S. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены K326A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены E333S и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены K326A, E333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены K326S, E333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены K326W, E333A и P396L. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены K326W, E333S и P396L.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен находятся в положении, выбранном из группы, состоящей из S267, H268 и S324. В одном воплощении изобретения одна или несколько замен типа двух или трех замен находятся в положениях, выбранных из группы, состоящей из S267, H268 и S324. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях S267 и H268. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях S267 и S324. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях H268 и S324. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях S267, H268 и S324.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен находятся в положении, выбранном из группы, состоящей из S267E, H268F и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит одну или несколько типа двух или трех замен, выбранных из группы, состоящей из S267E, H268F и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S267E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену H268F. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S267E и H268F. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S267E и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены H268F и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S267E, H268F и S324T.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ, в котором Fc-

область содержит одну или несколько дополнительных замен.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ, в котором Fc-область содержит дополнительную замену в следующих положениях IgG1 человека по нумерации EU: S440 или K439. В одном воплощении изобретения Fc-область содержит дополнительную замену, соответствующую одному из следующих положений: S440 или K439, при условии, что дополнительная замена не находится в положении S440, если в S440 находится улучшающая Fc-Fc замена. Полипептиды или антитела, содержащие усиливающую Fc-Fc замену и замену по связыванию C1q по настоящему изобретению и дополнительную замену в положении S440 типа S440K, не образуют олигомеров с полипептидами или антителами, содержащими мутацию в положении S440 типа S440K. Полипептиды или антитела, содержащие усиливающую Fc-Fc замену и замену по связыванию C1q по настоящему изобретению и дополнительную замену в положении K439 типа K439E, не образуют олигомеров с полипептидами или антителами, содержащими мутацию в положении K439 типа K439E. Таким образом, предусмотрен способ, который способствует образованию олигомеров между полипептидами или антителами, у которых первый полипептид или антитело содержит замену K439E, а второй полипептид или антитело содержит замену S440K. Так, при определенных структурах первого и второго полипептидов могут обязательно формироваться олигомеры типа, напр., гексамеров. Это может представлять интерес в таких способах, в которых полипептиды связывают различные мишени или эпитопы, а при комбинировании этих различных мишеней или эпитопов должны образовываться олигомеры.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ, в котором дополнительная замена выбрана из S440K или K439E.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения агонистической активности, в котором агонистическая активность повышается по меньшей мере на 20% по сравнению с исходным полипептидом или исходным антителом, которое идентично данному полипептиду или антителу или же полипептиду или антителу с идентичной усиливающей Fc-Fc заменой, но без замены по связыванию C1q. В другом воплощении изобретения полипептид или антитело обладает повышенной агонистической активностью по меньшей мере на 30%, на 40%, на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90% или на 95% по сравнению с исходным полипептидом или исходным антителом или же с полипептидом или антителом с идентичной усиливающей Fc-Fc заменой, но без замены по связыванию C1q.

#### **Способы повышения активности CDC**

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ повышения

активности CDC у полипептидов или антител путем введения усиливающей Fc-Fc замены и замены по связыванию C1q.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептидов или антител, содержащих Fc-область иммуноглобулина человека и участок связывания антигена, который включает: а) введение по меньшей мере одной замены в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замены S440Y или S440W, и б) введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

Введение а) по меньшей мере одной замены по изобретению в одно из следующих положений E430, E345 или S440 дает эффект усиления взаимодействий Fc-Fc у полипептидов или антител. Введение б) одной или нескольких замен по изобретению в одно из следующих положений G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396 дает эффект повышения активности CDC у полипептидов или антител.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептидов или антител, содержащих Fc-область иммуноглобулина человека и участок связывания антигена, причем Fc-область содержит а) по меньшей мере одну замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, а способ включает б) введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептидов или антител, содержащих Fc-область иммуноглобулина человека и участок связывания антигена, причем Fc-область содержит а) по меньшей мере одну замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, а способ включает б) введение по меньшей мере двух замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

Повышение агонистической активности полипептидов или антител по настоящему изобретению следует понимать как повышение активности CDC у полипептида или антитела по сравнению с исходным полипептидом или антителом, или же повышение агонистической активности полипептида или антитела также может означать то, что полипептид или антитело сравнивают с полипептидом или антителом, содержащим усиливающую Fc-Fc мутацию, но не мутацию по связыванию C1q. Таким образом, следует понимать, что полипептид или антитело можно сравнивать с исходным

полипептидом или исходным антителом, содержащим идентичный участок связывания антигена и Fc-область без усиливающей Fc-Fc замены и без замены по связыванию C1q, или же полипептид или антитело можно сравнивать с полипептидом или антителом, содержащим идентичный участок связывания антигена и Fc-область с усиливающей Fc-Fc заменой, но без замены по связыванию C1q.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен находятся в положении, выбранном из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, при условии, что замена в положении G236 не представлена G236F, G236R, G236Y.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен находятся в положении, выбранном из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, при условии, что замена в положении S267 не представлена S267H, S267I, S267K, S267G.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен находятся в положении, выбранном из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, при условии, что замена в положении H268 не представлена H268K, H268D, H268E.

В одном воплощении изобретения по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y. Таким образом, предусмотрены воплощения, в которых замена усиливает взаимодействия Fc-Fc.

В одном воплощении изобретения по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F, E430T.

В одном воплощении изобретения по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R, E345Y.

В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену E430G. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену E345K. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену E345R. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит по меньшей мере замену S440Y.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и

E430T, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E430G, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E430G, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E430G, причем способ включает введение замен из одной из групп, состоящих из:

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

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345K, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения

активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345K, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345K, причем способ включает введение замен из одной из групп, состоящих из:

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

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345R, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345R, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену E345R, причем способ включает введение замен из одной из групп, состоящих из:

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

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из S440Y и S440W, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из

группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из S440Y и S440W, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену S440Y, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену S440Y, причем способ включает введение одной или нескольких замен в положениях, выбранных из группы K326A, K326W, E333A, E333S, E333T и P396L.

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ повышения активности CDC у полипептида или антитела, у которого Fc-область содержит замену S440Y, причем способ включает введение замен из одной из групп, состоящих из:

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

Итак, предусмотрены воплощения, которые способствуют усилению активности CDC у полипептидов или антител при связывании антигена клеточной поверхности. В одном воплощении полипептиды или антитела обладают повышенной активностью CDC. В одном воплощении полипептиды или антитела содержат Fc-область, содержащую первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, причем одна из вышеприведенных замен может находиться в первой и/или второй тяжелой цепи.

В одном воплощении изобретения одна или несколько замен находятся в положении, выбранном из группы, состоящей из K326, E333 и P396. В одном воплощении изобретения одна или несколько замен типа двух или трех замен находятся в положениях, выбранных из группы, состоящей из K326, E333 и P396. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены в положениях K326 и E333. В



положении, выбранном из группы, состоящей из S267E, H268F и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит одну или несколько типов двух или трех замен, выбранных из группы, состоящей из S267E, H268F и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S267E. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену H268F. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замену S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S267E и H268F. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S267E и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены H268F и S324T. В одном воплощении изобретения полипептид или антитело содержит замены S267E, H268F и S324T.

### **Композиции**

Предполагается, что описанные ниже воплощения со ссылкой на полипептиды или антитела относятся к полипептидам или антителам, содержащим Fc-область иммуноглобулина и участок связывания антигена, причем полипептиды или антитела также могут составлять мультиспецифичные полипептиды или антитела, содержащие первую Fc-область иммуноглобулина и первый участок связывания антигена, и второй полипептид или антитело, содержащее вторую Fc-область иммуноглобулина и второй участок связывания антигена.

Изобретением также предусмотрены композиции, содержащие описанные здесь полипептиды или антитела и их варианты. Конкретные аспекты и воплощения будут описаны ниже. Кроме того, такие полипептиды или антитела могут быть получены в соответствии с любым описанным здесь способом.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены композиции, содержащие по меньшей мере один описанный здесь полипептид или антитело.

В одном воплощении настоящего изобретения композиции содержат один или несколько полипептидов или антител в соответствии с любым описанным здесь аспектом или воплощением.

В одном воплощении настоящего изобретения композиции содержат первый полипептид или антитело и второй полипептид или антитело, как описано здесь в любом аспекте или воплощении.

В одном аспекте композиция содержит первый и второй полипептид или антитело, причем первый и второй полипептид или антитело содержит Fc-область, содержащую:

(i) по меньшей мере одну замену, которая представляет собой усиливающую Fc-  
Fc мутацию; и

(ii) одну или несколько замен, которые являются заменами по связыванию C1q; и  
(iii) дополнительную мутацию, которая предотвращает олигомеризацию между Fc-областями с идентичными дополнительными мутациями, причем первый и второй полипептид или антитело не содержат одинаковых дополнительных мутаций.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело и второй полипептид или антитело, причем первый и второй полипептид или антитело содержит i) по меньшей мере одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и ii) одну или несколько замен в положении, выбранном из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, и iii) дополнительную мутацию, причем первый и второй полипептид или антитело не содержат одинаковых дополнительных мутаций. Таким образом, композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее вторую Fc-область.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) по меньшей мере одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W; и

(ii) одну или несколько замен в положении, выбранном из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396; и

(iii) дополнительную замену в положении K439 или S440 при условии, что если дополнительная замена приходится на S440, то замена согласно (i) не приходится на S440, при условии, что первая и вторая Fc-области не содержат дополнительной замены согласно (iii) в одном и том же аминокислотном положении,

(iv) причем замены соответствуют положениям аминокислот в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат (i) первую мутацию, (ii) вторую мутацию, (iii) дополнительную мутацию, причем мутации соответствуют следующим положениям аминокислот в IgG1 человека по нумерации EU:

(i) по меньшей мере одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей

из E430, E345, либо замену S440Y или S440W; и

(ii) одну или несколько замен в положении, выбранном из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396; и

(iii) дополнительную замену в положении K439 в первой Fc-области и дополнительную замену в положении S440 во второй Fc-области или наоборот, при условии, что если дополнительная замена находится в положении S440, то первая замена не приходится на S440;

(iv) причем замены соответствуют положениям аминокислот в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) по меньшей мере одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W; и

(ii) одну или несколько замен в положении, выбранном из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области;

(iv) причем замены соответствуют положениям аминокислот в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) по меньшей мере одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W; и

(ii) одну или несколько замен в положении, выбранном из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396; и

(iii) дополнительную замену S440K в первой Fc-области и дополнительную замену K439E во второй Fc-области;

(iv) причем замены соответствуют положениям аминокислот в IgG1 человека по нумерации EU.

Таким образом, предусмотрены воплощения, в которых и первый, и второй полипептид или антитело обладает повышенной агонистической активностью и/или

активностью CDC, или же только первый либо второй полипептид обладает повышенной агонистической активностью и/или активностью CDC.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

- (i) замену в положении аминокислоты, соответствующей E430; и
- (ii) одну или несколько замен в положении, выбранном из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396; и
- (iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

- (i) замену в положении аминокислоты, соответствующей E345; и
- (ii) одну или несколько замен в положении, выбранном из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396; и
- (iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

- (i) замену E430G; и
- (ii) одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из K326W, K326A, E333S, E333A, P396L, S267E, H268F, S324T, G263A, S324E, I332E и S239D; и
- (iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

- (i) замену E430G; и
- (ii) одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из K326W, K326A,

E333S, E333A и P396L; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) замену E430G; и

(ii) по меньшей мере две замены, выбранные из группы, состоящей из K326W, K326A, E333S, E333A и P396L; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) замену E430G; и

(ii) замены K326W и E333S; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) замену E345K; и

(ii) одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из K326W, K326A, E333S, E333A, P396L, S267E, H268F, S324T, G263A, S324E, I332E и S239D; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) замену E345K; и

(ii) одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из K326W, K326A,

E333S, E333A и P396L; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) замену E345K; и

(ii) по меньшей мере две замены, выбранные из группы, состоящей из K326W, K326A, E333S, E333A и P396L; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) замену E345K; и

(ii) замены K326W и E333S; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) замену E345R; и

(ii) одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из K326W, K326A, E333S, E333A, P396L, S267E, H268F, S324T, G263A, S324E, I332E и S239D; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) замену E345R; и

(ii) одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из K326W, K326A,

E333S, E333A и P396L; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) замену E345R; и

(ii) по меньшей мере две замены, выбранные из группы, состоящей из K326W, K326A, E333S, E333A и P396L; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) замену E345R; и

(ii) замены K326W и E333S; и

(iii) дополнительную замену K439E в первой Fc-области и дополнительную замену S440K во второй Fc-области или наоборот.

В другом воплощении изобретения композиция содержит первый и второй полипептид или антитело, причем первый и второй полипептид или антитело содержат Fc-область, содержащую:

(i) по меньшей мере одну замену, которая представляет собой усиливающую Fc-Fc мутацию;

(ii) дополнительную мутацию, которая предотвращает олигомеризацию между Fc-областями с идентичными дополнительными мутациями, причем первый и второй полипептид или антитело не содержат одинаковых дополнительных мутаций;

(iii) а либо первая, либо вторая Fc-область содержит одну или несколько замен, которые являются заменами по связыванию C1q. Таким образом, в некоторых воплощениях только первый или второй полипептид или антитело содержит вторую мутацию, снижающую Fc-эффektorные функции.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и

вторую Fc-область, причем первая и вторая Fc-области содержат:

(i) по меньшей мере одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W;

(ii) дополнительную мутацию K439E или S440K, причем первая и вторая Fc-область не содержат одинаковых дополнительных замен, а если по меньшей мере одна замена представлена S440Y или S440W, то дополнительная мутация не представлена S440K;

(iii) а либо первая, либо вторая Fc-область содержит одну или несколько замен в положении, выбранном из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая Fc-область содержит (i) по меньшей мере одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, ii) одну или несколько замен в положении, выбранном из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, и iii) дополнительную мутацию K439E; а вторая Fc-область содержит (i) по меньшей мере одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и ii) дополнительную мутацию S440K. Таким образом, предусмотрены воплощения, в которых только первый полипептид или антитело обладает повышенной агонистической активностью и/или повышенной активностью CDC.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая Fc-область содержит (i) по меньшей мере одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из E430, E345, ii) одну или несколько замен в положении, выбранном из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, и iii) дополнительную мутацию S440K; а вторая Fc-область содержит (i) по меньшей мере одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и ii) дополнительную мутацию K439E. Таким образом, предусмотрены воплощения, в которых только первый полипептид или антитело обладает повышенной агонистической активностью и/или повышенной активностью CDC.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или

антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая Fc-область содержит (i) замену E430G и ii) одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из K326W, K326A, E333S, E333A и P396L, и iii) дополнительную замену K439E; а вторая Fc-область содержит (i) замену E430G и ii) дополнительную замену S440K.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая Fc-область содержит (i) замену E430G и ii) одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из K326W, K326A, E333S, E333A и P396L, и iii) дополнительную замену S440K; а вторая Fc-область содержит (i) замену E430G и ii) дополнительную замену K439E.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая Fc-область содержит (i) замену E430G, ii) замены K326W и E333S и iii) дополнительную замену S440K; а вторая Fc-область содержит (i) замену E430G и ii) дополнительную замену K439E. В одном воплощении изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело, содержащее первый участок связывания антигена и первую Fc-область, и второй полипептид или антитело, содержащее второй участок связывания антигена и вторую Fc-область, причем первая Fc-область содержит (i) замену E430G, ii) замены K326W и E333S и iii) дополнительную замену K439E; а вторая Fc-область содержит (i) замену E430G и ii) дополнительную замену S440K.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит полипептид или антитело, способное связываться с представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR-SF) или суперсемейства сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR)

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит полипептид или антитело, способное связываться с представителем TNFR-SF, выбранным из группы, состоящей из TNFR1, FAS, DR3, DR4, DR5, DR6, NGFR, EDAR, DcR1, DcR2, DcR3, OPG, TROY, XEDAR, LTbR, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, GITR и RELT.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит полипептид

или антитело, способное связываться с представителем TNFR-SF с внутриклеточным доменом смерти, выбранным из следующей группы, состоящей из TNFR1, FAS, DR3, DR4, DR5, DR6, NGFR и EDAR.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит полипептид или антитело, способное связываться с представителем TNFR-SF без внутриклеточного домена смерти, выбранным из следующей группы, состоящей из DcR1, DcR2, DcR3, OPG, TROY, XEDAR, LT $\beta$ R, HVEM, TWEAKR, CD120b, OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR, RELT.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит полипептид или антитело, способное связываться с представителем TNFR-SF, принадлежащим к группе иммуноактиваторов, состоящей из OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR и RELT.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит полипептид или антитело, причем первый полипептид и второй полипептид связываются с разными эпитопами на одном или нескольких представителях TNFR-SF без внутриклеточного домена смерти, выбранных из следующей группы, состоящей из OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR и RELT.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит полипептид или антитело, причем первый полипептид связывается с одним представителем TNFR-SF без внутриклеточного домена смерти, выбранным из следующей группы, состоящей из OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR и RELT, и не блокирует связывание второго антитела, связывающегося с одним представителем TNFR-SF без внутриклеточного домена смерти, выбранным из следующей группы, состоящей из OX40, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, RANK, TACI, BLySR, BCMA, GITR и RELT.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первый полипептид или антитело и второй полипептид или антитело, которые присутствуют в композиции в молярном соотношении от 1:49 до 49:1, как-то в молярном соотношении 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, в соотношении 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первый полипептид и второй полипептид и/или любой дополнительный полипептид, которые присутствуют в композиции в эквимолярном соотношении.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция в соответствии с любым аспектом или воплощением представляет собой фармацевтическую композицию.

### **Терапевтические применения**

Полипептиды, антитела, биспецифичные антитела или композиции в соответствии с любым из аспектов или воплощений настоящего изобретения могут применяться в качестве лекарственных средств, то есть для терапевтического применения.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены полипептиды, антитела или композиции в соответствии с любым из приведенных здесь аспектов или воплощений для применения в качестве лекарственных средств.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены полипептиды, антитела или композиции в соответствии с любым из приведенных здесь аспектов или воплощений для применения при лечении рака, аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний или инфекционных заболеваний.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения лиц с заболеваниями, включающий введение им эффективного количества полипептида, антитела или композиции в соответствии с любым из приведенных здесь аспектов или воплощений.

В одном воплощении заболевание выбирают из группы раковых, аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и инфекционных заболеваний.

В одном воплощении способ в соответствии с любым из приведенных здесь аспектов или воплощений также предусматривает введение дополнительного терапевтического средства.

В одном воплощении дополнительным терапевтическим средством является одно или несколько противораковых средств, выбранных из группы, состоящей из химиотерапевтических средств (включая, без ограничения, паклитаксель, темозоломид, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, иринотекан, доксорубицин, гемцитабин, 5-фторурацил, пеметрексед), ингибиторы киназ (включая, без ограничения, сорафениб, сунитиниб или эверолимус), средства, модулирующие апоптоз (включая, без ограничения, рекомбинантный TRAIL человека или биринапант), ингибиторы RAS, ингибиторы протеасом (включая, без ограничения, бортезомиб), ингибиторы гистондеацетилазы (включая, без ограничения, вориностат), нутрицевтики, цитокины (включая, без ограничения, IFN- $\gamma$ ), антитела или миметики антител (включая, без ограничения, антитела против EGFR, против IGF-1R, против VEGF, против CD20, против CD38, против HER2, против PD-1, против PD-L1, против CTLA4, против CD40, против CD137, против GITR и миметики антител), конъюгаты типа антитело-лекарственное средство.

### **Наборы**

Предполагается, что описанные ниже воплощения со ссылкой на полипептиды или

антитела относятся к полипептидам или антителам, содержащим Fc-область иммуноглобулина и участок связывания антигена, причем полипептиды или антитела также могут составлять мультиспецифичные полипептиды или антитела, содержащие первую Fc-область иммуноглобулина и первый участок связывания антигена, и второй полипептид или антитело, содержащее вторую Fc-область иммуноглобулина и второй участок связывания антигена.

Изобретением также предусмотрены наборы для одновременного, раздельного или последовательного применения в терапии, содержащие описанные здесь полипептиды или антитела. Кроме того, такие варианты могут быть получены любым из описанных здесь способов.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены наборы, содержащие полипептиды, антитела или композиции в соответствии с любым из описанных здесь аспектов или воплощений, причем данные полипептиды, антитела или композиции находятся в одном или нескольких контейнерах типа флаконов.

В одном воплощении настоящего изобретения набор содержит полипептид, антитело или композицию в соответствии с любым из описанных здесь аспектов или воплощений для одновременного, раздельного или последовательного применения в терапии.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение полипептидов, антител, композиций или наборов в соответствии с любым из описанных здесь воплощений для применения в способах диагностики.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы диагностики, включающие введение полипептидов, антител, композиций или наборов в соответствии с любым из описанных здесь воплощений по меньшей мере в одну часть организма человека или других млекопитающих.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение полипептидов, антител, композиций или наборов в соответствии с любым из описанных здесь воплощений при визуализации по меньшей мере части организма человека или других млекопитающих.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы визуализации по меньшей мере части организма человека или других млекопитающих, включающие введение вариантов, композиций или наборов в соответствии с любым из описанных здесь воплощений.

### **Другие применения**

Предполагается, что описанные ниже воплощения со ссылкой на полипептиды или

антитела относятся к полипептидам или антителам, содержащим Fc-область иммуноглобулина и участок связывания антигена, причем полипептиды или антитела также могут составлять мультиспецифичные полипептиды или антитела, содержащие первую Fc-область иммуноглобулина и первый участок связывания антигена, и второй полипептид или антитело, содержащее вторую Fc-область иммуноглобулина и второй участок связывания антигена.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены полипептиды и антитела по изобретению, как описано выше, для применения в качестве лекарственных средств, в частности, для применения в качестве лекарственных средств для лечения заболеваний или расстройств. Примеры таких заболеваний и расстройств включают, без ограничения, раковые, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, инфекционные заболевания, бактериальные, вирусные или грибковые инфекции.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены полипептиды, антитела, биспецифичные антитела, композиции и наборы, описанные здесь, для лечения таких заболеваний, как рак.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения заболеваний у людей, включающие введение описанных здесь вариантов, композиций или наборов.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения рака у людей, включающие введение вариантов, композиций или наборов.

“Лечение” означает введение эффективного количества терапевтически активного соединения настоящего изобретения с целью ослабления, облегчения, прекращения или устранения (излечения) симптомов или заболеваний.

“Эффективное количество” или “терапевтически эффективное количество” означает количество, которое при необходимых дозах и продолжительности эффективно для достижения требуемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела может варьироваться в зависимости от таких факторов, как заболевание, возраст, пол и вес индивида и способность антитела вызвать требуемую реакцию у индивида. Терапевтически эффективное количество также означает количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

### **Дозировки**

Предполагается, что описанные ниже воплощения со ссылкой на полипептиды или антитела относятся к полипептидам или антителам, содержащим Fc-область иммуноглобулина и участок связывания антигена, причем полипептиды или антитела

также могут составлять мультиспецифичные полипептиды или антитела, содержащие первую Fc-область иммуноглобулина и первый участок связывания антигена, и второй полипептид или антитело, содержащее вторую Fc-область иммуноглобулина и второй участок связывания антигена.

Эффективные дозы и схемы дозировки для антител зависят от подлежащего лечению заболевания или состояния и могут быть определены специалистами в данной области. Типичный неограничительный диапазон для терапевтически эффективного количества антител настоящего изобретения составляет от 0,1 до 100 мг/кг, как-то от 0,1 до 50 мг/кг, к примеру, от 0,1 до 20 мг/кг, как-то от 0,1 до 10 мг/кг, к примеру, около 0,5, примерно 0,3, примерно 1, примерно 3, примерно 5 или 8 мг/кг.

Полипептиды или антитела настоящего изобретения также можно вводить при комбинированной терапии, то есть в сочетании с другими терапевтическими средствами, подходящими для подлежащего лечению заболевания или состояния. Соответственно, в одном воплощении содержащие антитела лекарственные средства назначаются в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами типа цитотоксических, химиотерапевтических или антиангиогенных средств. Такое комбинированное введение может быть одновременным, отдельным или последовательным.

В следующем воплощении настоящего изобретения предусмотрены способы лечения или профилактики заболеваний типа рака, которые включают введение нуждающимся в этом лицам терапевтически эффективного количества варианта или фармацевтической композиции настоящего изобретения в сочетании с лучевой терапией и/или хирургией.

### **Способы получения**

Предполагается, что описанные ниже воплощения со ссылкой на полипептиды или антитела относятся к полипептидам или антителам, содержащим Fc-область иммуноглобулина и участок связывания антигена, причем полипептиды или антитела также могут составлять мультиспецифичные полипептиды или антитела, содержащие первую Fc-область иммуноглобулина и первый участок связывания антигена, и второй полипептид или антитело, содержащее вторую Fc-область иммуноглобулина и второй участок связывания антигена.

Изобретением также предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты и векторы, кодирующие варианты согласно любому из описанных выше аспектов, а также векторы и системы экспрессии, кодирующие эти варианты. Подходящие конструкции из нуклеиновых кислот, векторы и системы экспрессии антител и их вариантов известны в

данной области и описаны в примерах. В тех воплощениях, в которых варианты содержат не только тяжелую цепь (или её Fc-содержащий фрагмент), но также и легкую цепь, последовательности нуклеотидов, кодирующие части тяжелых и легких цепей, могут находиться в одних и тех же или в разных нуклеиновых кислотах или векторах.

Изобретением также предусмотрен способ получения в клетках-хозяевах полипептидов или антител в соответствии с любым из описанных выше аспектов, причем полипептиды или антитела содержат по меньшей мере Fc-область тяжелой цепи, а данный способ включает следующие стадии:

- a) получение нуклеотидной конструкции, кодирующей Fc-область данного варианта,
- b) экспрессирование данной нуклеотидной конструкции в клетках-хозяевах и
- c) выделение данного варианта антител из клеточной культуры данных клетки-хозяина.

В некоторых воплощениях антитело представляет собой антитело из тяжелой цепи. Однако в большинстве воплощений антитело также содержит и легкую цепь, поэтому данные клетки-хозяева также экспрессируют конструкцию, кодирующую легкую цепь, в том же либо в другом векторе.

Клетки-хозяева, подходящие для рекомбинантной экспрессии антител, хорошо известны в данной области и включают клетки CHO, HEK-293, Expi293, PER-C6, NS/0 и Sp2/0. В одном воплощении такие клетки-хозяева представляют собой клетки, которые способны к Asn-связанному гликозилированию белков, напр., эукариотические клетки типа клеток млекопитающих, напр., клетки человека. В другом воплощении такие клетки-хозяева представляют собой не человеческие клетки, которые подвергнуты генетической инженерии для выработки гликопротеинов с гликозилированием типа человеческого или человеческого. Примеры таких клеток: генетически модифицированные *Pichia pastoris* (Hamilton et al., Science 301 (2003) 1244-1246; Potgieter et al., J. Biotechnology 139 (2009) 318-325) и генетически модифицированные *Lemna minor* (Cox et al., Nature Biotechnology 12 (2006) 1591-1597).

В одном воплощении клетки-хозяева представляют собой такие клетки, которые не способны эффективно удалять С-концевые остатки лизина K447 из тяжелых цепей антител. Например, в табл. 2 из Liu et al. (2008) J Pharm Sci. 97: 2426 (включено сюда путем ссылки) перечислен целый ряд таких систем получения антител, напр., Sp2/0, NS/0 или трансгенные молочные железы (козы), в которых получается только частичное удаление С-концевых лизинов. В одном воплощении клетки-хозяева представляют собой клетки с измененным механизмом гликозилирования. Такие клетки были описаны в

данной области и могут применяться в качестве клетки-хозяина, в которых можно экспрессировать варианты по изобретению и при этом получать антитела с измененным гликозилированием. Например, см. Shields R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1; а также EP 1176195; WO 03/035835; и WO 99/54342. Известны и другие методы получения инженерных гликоформ, включая, без ограничения, методы, описанные в Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng. 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem. 278:3466-3473), US 6602684, WO 00/61739A1; WO 01/292246A1; WO 02/311140A1; WO 02/30954A1; технологию Potelligent™ (Biowa, Inc., Princeton, N.J.); технологию инженерии гликозилирования GlycoMAb™ (GLYCART Biotechnology AG, Zurich, Switzerland); US 2003/0115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49.

Изобретением также предусмотрены антитела, полученные или получаемые описанным выше способом по изобретению.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены клетки-хозяева, способные вырабатывать полипептиды или антитела по изобретению. В одном воплощении клетки-хозяева трансформированы или трансфецированы нуклеотидной конструкцией по изобретению.

Далее настоящее изобретение раскрывается на следующих примерах, которые не следует рассматривать как дополнительные ограничения.

**Таблица 1**

SEQ ID NO:	Название	Последовательность	Клон
SEQ ID NO: 1	VH HDR5-01-G56T CDR1	GFNIKDTF	hDR5-01-G56T
SEQ ID NO: 2	VH HDR5-01-G56T CDR2	IDPANTNT	
SEQ ID NO: 3	VH HDR5-01-G56T CDR3	VRGLYTYFDY	
SEQ ID NO: 4	VH HDR5-01-G56T	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDTFIHWVKQAPG QGLEWIGRIDPANTNTKYDPKFQGGKATITDTSSNTAYMELSSL RSEDTAVYYCVRGLYTYFDYWGQGTLVTVSS	
SEQ ID NO: 5	HC HDR5-01-G56T	EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDTFIHWVKQAPG QGLEWIGRIDPANTNTKYDPKFQGGKATITDTSSNTAYMELSSL RSEDTAVYYCVRGLYTYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGSSFLYSLKLVTKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 6	VL hDR5-01 CDR1	QSIENN	
	VL hDR5-01 CDR2	FAS	
SEQ ID NO: 7	VL hDR5-01 CDR3	QQGNSWPYT	
SEQ ID NO: 8	VL hDR5-01	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIENNHLHWYQQKPGQA PRLLIK <u>FAS</u> QSITGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>GNSWPYTFGQGTKLEIK</u>	
SEQ ID NO: 9	LC hDR5-01	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIENNHLHWYQQKPGQA PRLLIK <u>FAS</u> QSITGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>GNSWPYTFGQGTKLEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 10	VH hDR5-05 CDR1	GFNIKDTH	hDR5-05
SEQ ID NO: 11	VH hDR5-05 CDR2	IDPANGNT	
SEQ ID NO: 12	VH hDR5-05 CDR3	ARWGTNVYFAY	
SEQ ID NO: 13	VH hDR5-05	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTHMHWVRQAP GQRLEWIGRIDPANGNTEYDQKFQGRVTITVDTSASTAYMELS SLRSEDTAVYYC <u>CARWGTNVYFAY</u> WGQGLTIVTSS	
SEQ ID NO: 14	HC hDR5-05	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTHMHWVRQAP GQRLEWIGRIDPANGNTEYDQKFQGRVTITVDTSASTAYMELS SLRSEDTAVYYC <u>CARWGTNVYFAY</u> WGQGLTIVTSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTF PAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 15	VL hDR5-05 CDR1	SSVSY	
	VL hDR5-05 CDR2	RTS	
SEQ ID NO: 16	VL hDR5-05 CDR3	QQYHSPPT	
SEQ ID NO: 17	VL hDR5-05	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMYWYQQKPGKAPK PWIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQ</u> <u>YHSPPTFGGGTKVEIK</u>	
SEQ ID NO: 18	LC hDR5-05	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMYWYQQKPGKAPK PWIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQ</u> <u>YHSPPTFGGGTKVEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 19	VH CONA- C49W-CDR1	GGSISSGDYF	IgG1- CONA- C49W
SEQ ID NO: 20	VH CONA- C49W-CDR2	IHNSTGT	

SEQ ID NO: 21	VH CONA- C49W-CDR3	ARDRGGDYYYYGMDV	
SEQ ID NO: 22	VH CONA- C49W-C49W	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQLP GKGLEWIGHIHNSGTTYNP <del>SL</del> KSRVTISVDTSKKQFSLRLSSVT AADTAVYYC <u>ARDRGGDYYYYGMDV</u> WGQGTTVTVSS	
SEQ ID NO: 23	HC CONA- C49W	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQLP GKGLEWIGHIHNSGTTYNP <del>SL</del> KSRVTISVDTSKKQFSLRLSSVT AADTAVYYC <u>ARDRGGDYYYYGMDV</u> WGQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 24	VL CONA- C49W-CDR1	QGISRSY	
	VL CONA- C49W-CDR2	GAS	
SEQ ID NO: 25	VL CONA- C49W-CDR3	QQFGSSPWT	
SEQ ID NO: 26	VL CONA- C49W	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS <u>QGISRSY</u> LAWYQQKPGQA PSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>Q</u> <u>QFGSSPWT</u> FGQGTKVEIK	
SEQ ID NO:27	LC CONA- C49W	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS <u>QGISRSY</u> LAWYQQKPGQA PSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>Q</u> <u>QFGSSPWT</u> FGQGTKVEIK EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS <u>QGISRSY</u> LAWYQQKPGQA PSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>Q</u> QFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSL STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 28	VH 7D8 CDR1	GFTFHDA	7D8
SEQ ID NO: 29	VH 7D8 CDR2	ISWNSGTI	
SEQ ID NO: 30	VH 7D8 CDR3	AKDIQYGNYYYGMDV	
SEQ ID NO: 31	VH 7D8	EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAASGFTFHDIAMHWVRQAP GKGLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVSS	
SEQ ID NO: 32	HC 7D8	EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAASGFTFHDIAMHWVRQAP GKGLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 33	VL 7D8 CDR1	QSVSSY	
	VL 7D8 CDR2	DAS	
SEQ ID NO: 34	VL 7D8 CDR3	QQRSNWPIT	
SEQ ID NO: 35	VL 7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQ RSNWPITFGQGTRLEIK	
SEQ ID NO: 36	LC 7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQ RSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 37	VH 11B8 CDR1	GFTFSYHA	11B8
SEQ ID NO: 38	VH 11B8CDR2	IGTGGVT	
SEQ ID NO: 39	VH 11B8CDR3	ARDYYGAGSFYDGLYGM DV	
SEQ ID NO: 40	VH 11B8	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCTGSGFTFSYHAMHWVRQAP GKGLEWVSIIGTGGVTYYADSVKGRFTISRDNVKNLSLYQMNSL RAEDMAVYYCARDYYGAGSFYDGLYGM DVWGQGT TTVTVSS	
SEQ ID NO: 41	HC 11B8	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCTGSGFTFSYHAMHWVRQAP GKGLEWVSIIGTGGVTYYADSVKGRFTISRDNVKNLSLYQMNSL RAEDMAVYYCARDYYGAGSFYDGLYGM DVWGQGT TTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 42	VL 11B8CDR1	QSVSSY	
	VL 11B8 CDR2	DAS	
SEQ ID NO: 43	VL 11B8 CDR3	QQRSDWPLT	
SEQ ID NO: 44	VL 11B8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQ RSDWPLT FGGG TKVEIK	
SEQ ID NO: 45	LC 11B8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQ RSDWPLT FGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 46	VH ALEM CDR1	GFTFTDFY	алемтузу маб
SEQ ID NO: 47	VH ALEM CDR2	IRDKAKGYTT	
SEQ ID NO: 48	VH ALEM CDR3	AREGHTAAPFDY	

SEQ ID NO: 49	VH ALEM	QVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFTTDFYMNWVRQPPG RGLIEWIGFIRDKAKGYTTEYNPSVKGRVTMLVDTSKNQFSLRLS SVTAADTAVYYCAREGHTAAPFDYWGGSLVTVSS	
SEQ ID NO: 50	HC ALEM	QVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFTTDFYMNWVRQPPG RGLIEWIGFIRDKAKGYTTEYNPSVKGRVTMLVDTSKNQFSLRLS SVTAADTAVYYCAREGHTAAPFDYWGGSLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 51	VL ALEM CDR1	QNIDKY	
	VL ALEM CDR2	NTN	
SEQ ID NO: 52	VL ALEM CDR3	LQHISRPT	
SEQ ID NO: 53	VL ALEM	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIDKYLWYQQKPGKA PKLLIYNTNQLTGVPSTRFSGSGSDFTFTISLQPEDATYYCL QHISRPTFGQGTKVEIK	
SEQ ID NO: 54	LC ALEM	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIDKYLWYQQKPGKA PKLLIYNTNQLTGVPSTRFSGSGSDFTFTISLQPEDATYYCL QHISRPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 55	VH 2F8 CDR1	GFTFSTYG	2F8
SEQ ID NO: 56	VH 2F8 CDR2	IWDDGSYK	
SEQ ID NO: 57	VH 2F8 CDR3	ARDGITMVRGVMKDYFDY	
SEQ ID NO: 58	VH 2F8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAP GKGLEWVAVIWDGGSYKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGGTLVTVSS	
SEQ ID NO: 59	HC 2F8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAP GKGLEWVAVIWDGGSYKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS SNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 60	VL 2F8 CDR1	QDISSA	
	VL 2F8 CDR2	DAS	
SEQ ID NO: 61	VL 2F8 CDR3	QQFNSYPLT	

SEQ ID NO: 62	VL 2F8	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESQVPSRFSGSESGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQ FNSYPLTFGGGKTKVEIK	
SEQ ID NO: 63	LC 2F8	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESQVPSRFSGSESGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQ FNSYPLTFGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 64	VH b12 CDR1	GYRFSNFV	b12
SEQ ID NO: 65	VH b12 CDR2	INPYNGNK	
SEQ ID NO: 66	VH b12 CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV	
SEQ ID NO: 67	VH b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPG QRFWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVFTADTSANTAYMEL RSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTTVI VSS	
SEQ ID NO: 68	HC b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPG QRFWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVFTADTSANTAYMEL RSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTTVI VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKSCDKHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 69	VL b12 CDR1	HSIRSRR	
	VL b12 CDR2	GVS	
SEQ ID NO: 70	VL b12 CDR3	QVYGASSYT	
SEQ ID NO: 71	VL b12	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHRSIRSRRAVWYQHKPGQA PRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFLTITRVEPEDFALYYC QVYGASSYTFGQGTKLERK	
SEQ ID NO: 72	LC b12	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHRSIRSRRAVWYQHKPGQA PRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFLTITRVEPEDFALYYC QVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO: 73	Fc IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHP SNTKVDKRVKSCDKHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 74	Fc IgG1m(z)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDK <b>K</b> VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 75	Fc IgG1m(a)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDK <b>P</b> VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPS <b>R</b> DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 76	Fc IgG1m(x)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDK <b>P</b> VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHE <b>G</b> LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 77	Fc IgG1m(f)- E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDK <b>R</b> VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMH <b>G</b> ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 78	Fc IgG1m(f)- E345K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDK <b>R</b> VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQ <b>P</b> R <b>K</b> PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 79	Fc IgG1m(f)- K326A/E333A/ P396L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDK <b>R</b> VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN <b>A</b> ALPAPI <b>A</b> KTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTT <b>P</b> LVDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 80	Fc IgG1m(f)- K326A/E333A/ P396L/E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN <u>A</u> ALPAPI <u>A</u> KTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 81	Fc IgG1m(f)- K326A/E333A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN <u>A</u> ALPAPI <u>A</u> KTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 82	Fc IgG1m(f)- K326A/E333A/ E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN <u>A</u> ALPAPI <u>A</u> KTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 83	Fc IgG1m(f)- K326A/P396L/ E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN <u>A</u> ALPAPI <u>E</u> KTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 84	Fc IgG1m(f)- E333A/P396L/ E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN <u>K</u> ALPAPI <u>A</u> KTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 85	Fc IgG1m(f)- I253D/K322A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <u>M</u> D <u>S</u> RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK <u>C</u> <u>A</u> VSNKALPAPI <u>E</u> KTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	

SEQ ID NO: 86	Fc IgG1m(f)- K326W/E333S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK SNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNWALPAPISKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH <del>E</del> ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 87	Fc IgG1m(f)- K326W/E333S /E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK SNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNWALPAPISKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH <del>E</del> ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 88	Fc IgG1m(f)- S267E/H268F/ S324T/E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK SNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDV <del>E</del> EFEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV <del>T</del> NKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH <del>E</del> ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 89	Fc IgG113F [Fc IgG1(f)m- K274Q/N276K/ Y300F/A339T/ N384S/K392N/ V397M/V422I]	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK SNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV <del>Q</del> FKWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNST <del>F</del> RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS K <del>T</del> KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WES <del>S</del> GQPENNY <del>N</del> TT <del>P</del> M <del>L</del> LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG <del>N</del> I FSCSVMH <del>E</del> ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 90	Fc IgG113F- E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK SNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV <del>Q</del> FKWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNST <del>F</del> RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS K <del>T</del> KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WES <del>S</del> GQPENNY <del>N</del> TT <del>P</del> M <del>L</del> LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG <del>N</del> I FSCSVMH <del>E</del> ALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 91	VH BMS- 663513 CDR1	GGSFSGYY	BMS- 663513
SEQ ID NO: 92	VH BMS- 663513 CDR2	INHGGYV	
SEQ ID NO: 93	VH BMS- 663513 CDR3	ARDYGPNGYDWYFDL	
SEQ ID NO: 94	VH BMS- 663513	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPE KGLEWIGEINHGGYV <del>T</del> YNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSVTA ADTAVYYCARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVSS	
SEQ ID NO: 95	VL BMS- 663513 CDR1	QSVSSY	
	VL BMS- 663513 CDR2	DAS	

SEQ ID NO: 96	VL BMS- 663513 CDR3	QQRSNWPPALT	
SEQ ID NO: 97	VL BMS- 663513	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPPALTFGGGKVEIK	
SEQ ID NO: 98	VH CD134-SF2 CDR1	GYTFKDYT	CD134- SF2
SEQ ID NO: 99	VH CD134-SF2 CDR2	IYPNNGGS	
SEQ ID NO: 100	VH CD134-SF2 CDR3	ARMGYHGPHLDFDV	
SEQ ID NO: 101	VH CD134-SF2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFKDYTMHWVRQAP GQGLEWIGGIYPNNGGSTYNQNFKDRVTLTADKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARMGYHGPHLDFDVWGQGT <sup>T</sup> VTVSS	
SEQ ID NO: 102	VL CD134-SF2 CDR1	QDVGAA	
	VL CD134-SF2 CDR2	WAS	
SEQ ID NO: 103	VL CD134-SF2 CDR3	QQYINYPLT	
SEQ ID NO: 104	VL CD134-SF2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVGA <sup>A</sup> VAWYQQKPGK APKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSLQPEDFATYY CQQYINYPLTFGGGKVEIK	
SEQ ID NO: 105	VH CD137- MOR7480 CDR1	GYSFSTYW	CD137- MOR7480
SEQ ID NO: 106	VH CD137- MOR7480 CDR2	IYPGDSYT	
SEQ ID NO: 107	VH CD137- MOR7480 CDR3	ARGYGIFDY	
SEQ ID NO: 108	VH CD137- MOR7480	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTY <sup>WIS</sup> WVRQMPGK GLEWMGKIYPGDSYTN <sup>Y</sup> SPSFQ <sup>Q</sup> VTISADKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGT <sup>L</sup> TVSS	
SEQ ID NO: 109	VL CD137- MOR7480 CDR1	NIGDQY	
	VL CD137- MOR7480 CDR2	QDK	
SEQ ID NO: 110	VL CD137- MOR7480 CDR3	ATYTGFGLAV	
SEQ ID NO: 111	VL CD137- MOR7480	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSP VLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC ATYTGFGLAVFGGK <sup>L</sup> TVL	
SEQ ID NO: 112	VH CD40- CP870893 CDR1	GYTFTGY <sup>Y</sup>	CD40- CP870893
SEQ ID NO: 113	VH CD40- CP870893 CDR2	INPDSGGT	

SEQ ID NO: 114	VH CD40- CP870893 CDR3	ARDQPLGYCTNGVCSYFDY	
SEQ ID NO: 115	VH CD40- CP870893	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHWVRQAP GQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYM ELNRLRSDDTAVYYC <u>ARDQPLGYCTNGVCSYFDY</u> WGQGTLLV VSS	
SEQ ID NO: 116	VL CD40- CP870893 CDR1	QGIYSW	
	VL CD40- CP870893 CDR2	TAS	
SEQ ID NO: 117	VL CD40- CP870893 CDR3	QQANIFPLT	
SEQ ID NO: 118	VL CD40- CP870893	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGK APNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQANIFPLTFGGGTKVEIK</u>	
SEQ ID NO: 119	VH CD40- SGN40 CDR1	GYSFTGY	CD40- SGN40
SEQ ID NO: 120	VH CD40- SGN40 CDR2	VIPNAGGT	
SEQ ID NO: 121	VH CD40- SGN40 CDR3	AREGIYW	
SEQ ID NO: 122	VH CD40- SGN40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYIHWVRQAPGK GLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYC <u>AREGIYWWGQGTLLTVSS</u>	
SEQ ID NO: 123	VL CD40- SGN40 CDR1	QSLVHSNGNTF	
	VL CD40- SGN40 CDR2	TVS	
SEQ ID NO: 124	VL CD40- SGN40 CDR3	SQTTHVPWT	
SEQ ID NO: 125	VL CD40- SGN40	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQ KPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYFCSQTTHVPWT <u>FGQGTKVEIK</u>	
SEQ ID NO: 126	VH CD95- APO1 CDR1	GFTFNTNA	CD95- APO1
SEQ ID NO: 127	VH CD95- APO1 CDR2	IRSKSNNYAT	
SEQ ID NO: 128	VH CD95- APO1 CDR3	VTDGYY	
SEQ ID NO: 129	VH CD95- APO1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTNAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKSNNYATYYAESVKDRFTISRDDSQSMLYLQ MNNLKAEDTAMYYC <u>VTDGYYWGQGTLLTVSS</u>	
SEQ ID NO: 130	VL CD95-APO1 CDR1	ESVEYYGTSL	
	VL CD95-APO1 CDR2	VAS	
SEQ ID NO: 131	VL CD95-APO1 CDR3	QQSTKVPWT	

SEQ ID NO: 132	VL CD95-APO1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASE <u>SVEYYGTS</u> LMQWYQQKP GQPPKLLIYV <u>AS</u> NVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIA MYFCQ <u>QSTKVPWT</u> FGGGTKLEIK	
SEQ ID NO: 133	VH CD95- HFE7A CDR1	GYTFTSYW	CD95- HFE7A
SEQ ID NO: 134	VH CD95- HFE7A CDR2	IDPSDSYT	
SEQ ID NO: 135	VH CD95- HFE7A CDR3	ARNRDYSNNWYFDV	
SEQ ID NO: 136	VH CD95- HFE7A	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRP GQGLEWIGEIDPSDSYTNYNQFKGKATLTVDTSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCARNRDYSNNWYFDVWGTGTTVTVSS	
SEQ ID NO: 137	VL CD95- HFE7A CDR1	QSVDYDGDSY	
	VL CD95- HFE7A CDR2	AAS	
SEQ ID NO: 138	VL CD95- HFE7A CDR3	QQSNEDPRT	
SEQ ID NO: 139	VL CD95- HFE7A	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQ KPGQPPKLLIYA <u>AS</u> NLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDA ATYYCQ <u>QSNEDPRT</u> FGGGTKLEIK	
SEQ ID NO: 140	VH DR4- chCTB007 CDR1	GFNIKDTY	DR4- chCTB007
SEQ ID NO: 141	VH DR4- chCTB007 CDR2	IDPANGNT	
SEQ ID NO: 142	VH DR4- chCTB007 CDR3	AYYYVSNAWFTY	
SEQ ID NO: 143	VH DR4- chCTB007	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPE QGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSL TSEDTAVYYCAYYYVSNAWFTYWGQGTLLVTVSA	
SEQ ID NO: 144	VL DR4- chCTB007 CDR1	ENIYSN	
	VL DR4- chCTB007 CDR2	AAT	
SEQ ID NO: 145	VL DR4- chCTB007 CDR3	QHFWGTWT	
SEQ ID NO: 146	VL DR4- chCTB007	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASE <u>NIYSN</u> LEWYQQKQKQKSP QLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYC <u>QHFWGTWT</u> FGGGTKLEIK	
SEQ ID NO: 147	VH FAS-E09 CDR1	GASISANSYY	FAS-E09
SEQ ID NO: 148	VH FAS-E09 CDR2	IAYRGNNSNGST	
SEQ ID NO: 149	VH FAS-E09 CDR3	ARRQLDDGTGYQWAAFDV	

SEQ ID NO: 150	VH FAS-E09	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGASISANSYGVWVRQSPG KGLEWVGSIA <u>YRGNSNSG</u> STYYPNSLKSRA TVSVDTSKNQVSLR LTSVTAADTALYYCARRQLLDDGTGYQWAAFDVWGQGTMTV VSS	
SEQ ID NO: 151	VL FAS-E09 CDR1	SFNIGRYP	
	VL FAS-E09 CDR2	YNN	
SEQ ID NO: 152	VL FAS-E09 CDR3	STWDDTLKGWV	
SEQ ID NO: 153	VL FAS-E09	QSVLTQPPSVSEAPRQTVTISCSGNSFNIGRYPVNWYQQLPGK APKLLIYYNNLRFSGVSDRFSGSKSGTSASLAIRDLLSEDEADYYC <u>STWDDTLKGWV</u> FGGGTKVTVL	
SEQ ID NO: 154	VH GTR-36E5 CDR1	GFTFSSYA	GTR- 36E5
SEQ ID NO: 155	VH GTR-36E5 CDR2	ISSGGTT	
SEQ ID NO: 156	VH GTR-36E5 CDR3	ARVGGYYDSMDY	
SEQ ID NO: 157	VH GTR-36E5	EVNLVESGGGLVPGGSLKVS CAASGFTFSSYAMSWVRQTPEK RLEWVASISSGGTTYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSLRSE DTAMYCARVGGYYDSMDYWGQGISVTDSS	
SEQ ID NO: 158	VL GTR-36E5 CDR1	ESVDNYGVSF	
	VL GTR-36E5 CDR2	AAS	
SEQ ID NO: 159	VL GTR-36E5 CDR3	QQTKEVTWT	
SEQ ID NO: 160	VL GTR-36E5	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGVSEFMNWFQQK PGQPPKLLIYAASNQGGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDD TAMYFCQQTKEVTWTFGGGKLEIK	
SEQ ID NO: 161	VH GTR- INCAGNO1876 CDR1	GYFTDYA	GTR- INCAGNO 1876
SEQ ID NO: 162	VH GTR- INCAGNO1876 CDR2	IRTYSGDV	
SEQ ID NO: 163	VH GTR- INCAGNO1876 CDR3	AKSGTVRGFAY	
SEQ ID NO: 164	VH GTR- INCAGNO1876	QVQLLQSGTELVPRGVSVKISCKGSGYFTDYAMYVVKQSHA KSLEWIGVIRTYSGDVTYNQKFKDKATMTVDKSSSIAYMELARL SSEDSAIYYCAKSGTVRGFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO: 165	VL GTR- INCAGNO1876 CDR1	QLLNSGNQKNY	
	VL GTR- INCAGNO1876 CDR2	WAS	
SEQ ID NO: 166	VL GTR- INCAGNO1876 CDR3	QNDYSYPYT	

SEQ ID NO: 167	VL G1TR- INCAGN01876	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVMISCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISSVQAE DLAVYHCQNDYSYPYTFGGGKLEIK	
SEQ ID NO: 168	Fc IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVNDHK PSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG2 человека
SEQ ID NO: 169	Fc IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHK PSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEP KSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCPAPPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAK KPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NIFSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	IgG3 человека
SEQ ID NO: 170	Fc IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG4 человека
SEQ ID NO: 171	FcRnECDHis BAP	AESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQYLSYNSLRG EAEPGAWVWENQVSWYWEKETDLRIKEKLFLEAFKALGGK GPYTLQGLLCELGPDNTSVPTAKFALNGEEFMNFDLQGTW GGDWPEALAISQRWQQDKAANKELTFLFSCPHRLREHLER GRGNLEWKEPPSMRLKARPSSPGFSVLTCSAFSFPPELQLRFL RNGLAAGTGQDGFNPNSDGSFHASSLTVKSGDENHYCCIVQ HAGLAQPLRVELESPAKSSPGSSSHHHHHHPGGGLNDIFEAKQ <b>IIEWHE</b>	FcRn человека
SEQ ID NO: 172	B2M	IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGE RIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTKDEYACRVNHVTLISQ PKIVKWDRDM	B2M

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1. Создание, получение и очистка антител

#### Экспрессионные конструкции для антител

Для экспрессии антител получали последовательности вариабельной области тяжелой цепи ( $V_H$ ) и легкой цепи ( $V_L$ ) путем синтеза генов (GeneArt Gene Synthesis; ThermoFisher Scientific, Германия) и клонировали в экспрессирующие векторы pcDNA3.3 (ThermoFisher Scientific, США), содержащие константные области тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) IgG1. Нужные мутации вводили либо при синтезе генов либо методом сайт-направленного мутагенеза. Приведенные в настоящей заявке антитела содержат

последовательности  $V_H$  и  $V_L$ , полученные из описанных ранее антител hDR5-01, hDR5-05 (WO 2014/009358) и конатумумаб (US 7521048 B2 и WO 2010/138725) против DR5, антитела chCTB007 (US 2009/0136503) против DR4, антител E09 (Chodorge, Cell Death Differ. 2012 Jul, 19(7): 1187-1195), APO1 (WO 2014/076292) и HFE7A (US 6972323) против FAS, антитела SF2 (US 2014/0377284) против OX40, антител SGN 40 (US6838261) и CP870893 (US 7338660) против CD40, антител MOR7480 (WO 2012/032433) и BMS-663513 (US 8475790) против 4-1BB, антител HuMab-7D8 и 11B8 (WO 2004/035607) против CD20, антитела алемтузумаб (Crowe et al., Clin Exp Immunol. 1992; 87(1): 105-10) против CD52 и антитела 2F8 (WO 2002/100348) против EGFR. В некоторых примерах в качестве отрицательного контроля использовали специфичное к gp120 антитело b12 типа IgG1 человека (Barbas et al., J Mol Biol. 1993 Apr 5, 230 (3): 812-23).

#### Временная экспрессия

Антитела экспрессировали в виде IgG1,κ. Клетки Expi293 (Life/Thermo Scientific, США) подвергали временной трансфекции смесью плазмидной ДНК, кодирующей и тяжелые, и легкие цепи антител, используя Expifectamine (Invitrogen, US) в основном как описано производителем.

#### Очистка и анализ белков

Антитела очищали методом аффинной хроматографии с белком А. Супернатанты культур фильтровали через тупиковые фильтры на 0,20 мкм и наносили на колонки MabSelect SuRe 5 мл (GE Healthcare), промывали и элюировали с помощью 0,02 М цитрата натрия-NaOH, pH 3. Сразу же после очистки элюаты наносили на колонку для обессоливания HiPrep Desalting (GE Healthcare) и проводили замену буфера антител на буфер 12,6 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 140 мМ NaCl, pH 7,4 (B. Braun или Thermo Fisher). После замены буфера образцы стерилизовали фильтрованием через тупиковые фильтры на 0,2 мкм. Очищенные белки анализировали различными биоаналитическими методами, включая капиллярный электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (CE-SDS) и высокоэффективную эксклюзионную хроматографию (HP-SEC). Концентрацию измеряли по поглощению при 280 нм. Очищенные антитела хранили при 2-8°C.

#### Получение биспецифичных антител

Биспецифичные антитела IgG1 получали путем обмена Fab-плеча в контролируемых восстановительных условиях. Основой этого метода является использование комплементарных доменов  $C_{H3}$ , что способствует образованию гетеродимеров при определенных условиях анализа, как описано в WO 2011/131746. Для получения пар антител с комплементарными доменами  $C_{H3}$  вводили мутации F405L и K409R (нумерация по EU) в антитела IgG1 против DR5. Мутацию F405L вводили в IgG1-

b12-K326A/E333A/P396L/E430G и IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G; а мутацию K409R вводили в IgG1-b12-K326W/E333S/E430G и IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/E430G. Для получения биспецифичных антител два исходных комплементарных антитела, каждое в конечной концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали при 75 мМ 2-меркаптоэтиламина-HCl (2-MEA) в общем объеме 100 мкл PBS при 31°C в течение 5 ч. Восстановительную реакцию останавливали путем удаления восстановительного реагента 2-MEA на центрифужных колонках (центрифужные фильтры Microcon, 30k, Millipore) в соответствии с методикой производителя. Проводили замену буфера на буфер 12,6 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 мМ NaCl, pH 7,4 (B. Braun или Thermo Fisher). При этом получали биспецифичные антитела: IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/K409R/E430G×IgG1-b12-K326A/E333A/P396L/F405L/E430G, именуемое и как BsAb (hDR5-01-G56T-K409R×b12-F405L)-K326A/E333A/P396L/E430G, и IgG1-CONA-C49W-F405L-K326W/E333S/E430G×IgG1-b12-K409R-K326W/E333S/E430G, называемое как BsAb (IgG1-CONA-C49W-F405L×IgG1-b12-K409R)-K326W/E333S/E430G.

**Пример 2. Влияние комбинации E430G и K326A/E333A/P396L на эффективность агонистических антител против DR5**

Для оценки влияния комбинации усиливающей Fc-Fc замены E430G (WO 2013/004842; WO 2014/108198; WO 2014/006217; de Jong et al., 2016) и K326A/E333A/P396L (WO 2016/116635) на агонистическую активность антител против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR-05 проводили анализ жизнеспособности на DR5-положительных клетках VxPC-3 (ATCC, CRL-1687). Клетки собирали после трипсинизации и пропускания через клеточный фильтр. Клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI 1640 с 25 мМ HEPES и L-глутамином (Lonza, кат. № BE12-115F) + 10% инактивированной нагреванием донорской бычьей сыворотки с железом (DBSI; Life Technologies, кат. № 10371-029) + 50 ед./мл пенициллина/стрептомицина (Pen/Strep; Lonza, кат. № DE17-603E) при концентрации  $0,5 \times 10^5$  клеток/мл. По 100 мкл суспензии одиночных клеток высевали (5000 клеток на лунку) в полистироловые 96-луночные плоскодонные планшеты (Greiner Bio-One, кат. № 655182) и оставляли для прикрепления на ночь при 37°C. Затем добавляли 50 мкл серийных разведений препаратов антител (конечные концентрации от 0,0003 до 20000 нг/мл в 4-кратных разведениях) и инкубировали 3 дня при 37°C. В качестве отрицательного и положительного контроля клетки инкубировали без антител либо с 5 мкМ стауроспорина (Sigma Aldrich, кат. № S6942), соответственно. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли люминесцентным методом анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega, кат. № G7571), в котором определяется

наличие АТФ, что является индикатором метаболически активных клеток. Из набора добавляли реагент – раствор люциферина по 20 мкл на лунку и перемешивали встряхиванием планшета в течение 2 мин при 500 об/мин. Затем планшеты инкубировали 1,5 часа при 37°C. По 100 мкл супернатанта переносили в белый OptiPlate-96 (Perkin Elmer, кат. № 6005299) и измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer). Данные анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. На фиг. 1 представлен процент жизнеспособных клеток, который рассчитывали по следующей формуле: % жизнеспособных клеток = [(люминесценция образца с антителом – люминесценция образца со стауроспорином)/(люминесценция образца без антитела – люминесценция образца со стауроспорином)]×100.

Из фиг. 1 видно, что сочетание усиливающей Fc-Fc замены E430G и трех замен K326A/E333A/P396L приводило к индукции уничтожающего действия у антител против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T (фиг. 1A) и IgG1-hDR5-05 (фиг. 1B) при тестировании в виде отдельного средства при анализе жизнеспособности *in vitro* на адгезированных раковых клетках VxPC-3 поджелудочной железы человека. Напротив, эти антитела не проявляли эффективного уничтожения таких адгезированных клеток VxPC-3 при наличии только E430G или K326A/E333A/P396L. Также для комбинации не перекрестно-блокирующих антител IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 введение комбинации замен K326A/E333A/P396L/E430G приводило к наиболее эффективному уничтожению адгезированных клеток VxPC-3 (фиг. 1C).

Эти данные показывают, что замены K326A/E333A/P396L/E430G индуцируют сильную агонистическую активность у антител против DR5 на адгезированных клетках VxPC-3.

### **Пример 3. Эффективность моновалентного антитела против DR5, содержащего K326A/E333A/P396L/E430G**

Для изучения эффективности моновалентного антитела против DR5, содержащего K326A/E333A/P396L/E430G, проводили анализ жизнеспособности на раковых клетках VxPC-3 поджелудочной железы и COLO 205 толстой кишки человека. Моновалентное антитело к DR5 получали путем контролируемого обмена Fab-плеча между IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/K409R/E430G и IgG1-b12-K326A/E333A/P396L/F405L/E430G, как описано в Примере 1. Полученное биспецифичное антитело, именуемое BsAb (hDR5-01-G56T-K409Rxb12-F405L)-K326A/E333A/P396L/E430G, содержит одно плечо, специфичное к DR5, и одно

неспецифичное плечо против гликопротеина gp120 ВИЧ, что приводит к моновалентному связыванию DR5 на DR5-положительных раковых клетках человека. Клетки ВхРС-3 получали, как описано в Примере 2. Клетки COLO 205 (ATCC, CCL-222) получали, объединяя супернатанты культур, содержащих неадгезированные клетки и трип синизованные адгезированные клетки COLO 205. Клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI 1640 с 25 мМ Перес и L-глутамином + 10% инактивированной нагреванием DBSI + 50 ед./мл Pen/Strep) в концентрации  $0,5 \times 10^5$  клеток/мл. По 100 мкл суспензии одиночных клеток высевали (5000 клеток на лунку) в полистироловые 96-луночные плоскодонные планшеты и оставляли для прикрепления на ночь при 37°C. Затем добавляли 50 мкл серийных разведений препаратов антител (конечные концентрации от 0,0024 до 10000 нг/мл в 4-кратных разведениях) и инкубировали 3 дня при 37°C. В качестве отрицательного и положительного контроля клетки инкубировали без антител либо с 5 мкМ стауроспорина, соответственно. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли люминесцентным методом анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в Примере 2.

Из фиг. 2 видно, что в присутствии мутаций K326A/E333A/P396L/E430G моновалентный вариант IgG1-hDR5-01-G56T все еще может вызывать гибель раковых клеток ВхРС-3 поджелудочной железы и COLO 205 толстой кишки человека.

#### **Пример 4. Влияние комбинации E430G и K326A/E333A, K326A/P396L или E333A/P396L на связывание C1q и эффективность агонистических антител против DR5**

Для изучения влияния комбинации усиливающей Fc-Fc замены E430G с двумя из трех замен K326A/E333A/P396L на агонистическую активность антитела против DR5a IgG1-hDR5-01-G56T проводили анализ жизнеспособности на DR5-положительных клетках ВхРС-3 и COLO 205. В качестве контроля включали в эксперимент сочетание E430G со всеми тремя заменами K326A/E333A/P396L, как описано в Примере 2. Анализ жизнеспособности проводили, как описано в Примере 3. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли люминесцентным методом анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в Примере 2.

Из фиг. 3 видно, что сочетание усиливающей Fc-Fc замены E430G и двух из замен K326A/E333A/P396L (E333A/P396L, K326A/E333A или K326A/P396L) приводило к индукции уничтожающего действия у антитела против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T при тестировании в виде отдельного средства при анализе жизнеспособности *in vitro* на адгезированных раковых клетках ВхРС-3 поджелудочной железы (фиг. 3А) и COLO 205 толстой кишки человека (фиг. 3В). Напротив, никакого уничтожения этих адгезированных

раковых клеток не наблюдалось при наличии только E430G. Наиболее эффективное уничтожение наблюдалось при сочетании E430G со всеми тремя мутациями K326A/E333A/P396L.

Для оценки влияния различных замен на связывание C1q проводили анализ связывания по ELISA. Тестировали очищенные образцы вариантов антитела IgG-hDR5-01-G56T, содержащих замену E430G в сочетании с заменами K326A/E333A, K326A/P396L, E333A/P396L или K326A/E333A/P396L, и сравнивали с IgG-hDR5-01-G56T дикого типа (WT) и IgG-hDR5-01-G56T-E430G. В качестве отрицательного контроля на связывание C1q использовали IgG-2F8-I253D/K322A. В 96-луночных планшетах для ELISA Microton (Greiner, кат. № 655092) фиксировали образцы антител при 1 мкг/мл путем инкубации в течение ночи при 4°C в 100 мкл PBS. Планшеты промывали и блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре в 0,5×PBS по 200 мкл на лунку с добавлением 0,025% Tween 20 и 0,1% желатина со встряхиванием. С промывкой между инкубациями планшеты последовательно инкубировали с серийными разведениями очищенного C1q (Quidel, кат. № A400; конечные концентрации C1q от 30 до 0,010 мкг/мл в 3-кратных разведениях) по 100 мкл на лунку в течение 1 ч при 37°C, с кроличьим антителом против C1q человека (DAKO, кат. № A0136, 1/4000) по 100 мкл на лунку в течение 1 ч при комнатной температуре и с антителом свиньи против кроличьего IgG-HRP (DAKO, P0399, 1:10,000) по 100 мкл на лунку в качестве детектирующего антитела в течение 1 ч при комнатной температуре и, наконец, с субстратом 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислотой) при 1 мг/мл (ABTS; Roche, кат. № 11112 597001) по 100 мкл на лунку в течение примерно 15 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2% щавелевой кислоты. Измеряли поглощение при 405 нм на считывающем устройстве BioTek EL808 (BioSPX). Данные после логарифмического преобразования анализировали путем построения сигмоидальных кривых доза-эффект с переменным наклоном с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Из фиг. 3С видно, что введение усиливающей Fc-Fc замены E430G не влияло на кажущееся сродство связывания C1q с фиксированным при 1 мкг/мл антителом IgG1-hDR5-01-G56T, тогда как варианты антител, содержащие комбинации замены E430G и замен K326A/E333A, K326A/P396L, E333A/P396L или K326A/E333A/P396L, проявляли усиление связывания C1q по сравнению с IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-01-G56T-E430G (табл. 2).

**Таблица 2.** Значения  $EC_{50}$  по связыванию C1q с вариантами антитела IgG1-hDR5-01-G56T (ELISA)

Вариант антитела IgG1-hDR5-01-G56T (1 мкг/мл)	$EC_{50}$ по связыванию C1q (мкг/мл)	SD	n	Вариант антитела по сравн. с WT <sup>1</sup>	Вариант антитела по сравн. с E430G <sup>1</sup>
WT	18,8	9,9	6	не применимо	не значимо
E430G	20,7	12,6	6	не значимо	не применимо
K326A/E333A/P396L/E430G	1,3	0,2	3	$p < 0,05$	$p < 0,05$
K326A/E333A/E430G	0,8	0,1	3	$p < 0,05$	$p < 0,05$
K326A/P396L/E430G	0,6	0,1	3	$p < 0,05$	$p < 0,05$
E333A/P396L/E430G	1,9	0,8	3	$p < 0,05$	$p < 0,05$

<sup>1</sup> Односторонний метод ANOVA,  $p = 0,0022$ ; критерий Бонферрони post hoc, Ab против WT:  $p < 0,05$ , как указано.

В целом эти данные показывают, что сочетание усиливающей Fc-Fc замены E430G с заменой K326A/E333A, K326A/P396L, E333A/P396L или K326A/E333A/P396L приводит к усилению связывания C1q и повышению агонистической активности антитела против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G только с усиливающей Fc-Fc мутацией E430G.

#### **Пример 5. Влияние комбинации E430G и K326W/E333S на связывание C1q и эффективность агонистических антител против DR5**

Для оценки влияния K326A/E333A и K326W/E333S на связывание C1q с антителом, содержащим усиливающую Fc-Fc мутацию E430G, проводили анализ связывания по ELISA. Тестировали очищенные образцы вариантов антитела IgG1-CONA-C49W, содержащих замену E430G в сочетании с мутациями K326A/E333A или K326W/E333S, и сравнивали с IgG1-CONA-C49W дикого типа (WT) и IgG1-CONA-C49W-E430G. Также тестировали IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S без замены E430G. В качестве отрицательного контроля на связывание C1q использовали IgG-2F8-I253D/K322A. ELISA по связыванию C1q проводили в планшетах для ELISA, покрытых антителом при 1 мкг/мл, как описано в Примере 4.

При введении замены K326W/E333S отмечалось сильное усиление связывания C1q по сравнению с антителом WT (фиг. 4A). Напротив, введение усиливающей Fc-Fc мутации E430G не влияло на кажущееся средство связывания C1q с фиксированным при 1 мкг/мл антителом IgG1-CONA-C49W. Варианты антитела, содержащие комбинацию замены E430G и замен K326A/E333A или K326W/E333S, проявляли сильное усиление связывания C1q по сравнению с IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-01-G56T-E430G (табл. 3).

**Таблица 3.** Значения  $EC_{50}$  по связыванию C1q с вариантами антитела IgG1-CONA-C49W (ELISA)

Вариант антитела IgG1-CONA-C49W (1 мкг/мл)	$EC_{50}$ по связыванию C1q (мкг/мл)	SD	n	Вариант антитела по сравн. с WT <sup>1</sup>	Вариант антитела по сравн. с E430G <sup>1</sup>
WT	15,2	12,2	3	не применимо	не значимо
E430G	15,4	6,1	3	не значимо	не применимо
K326W/E333S	0,3	0,1	3	$p < 0,05$	$p < 0,05$
K326A/E333A/E430G	0,8	0,3	3	$p < 0,05$	$p < 0,05$
K326W/E333S/E430G	0,5	0,1	3	$p < 0,05$	$p < 0,05$

<sup>1</sup> Односторонний метод ANOVA,  $p = 0,0013$ ; критерий Бонферрони post hoc, Ab против WT:  $p < 0,05$ , как указано.

Для изучения влияния комбинации усиливающей Fc-Fc мутации E430G с заменами по связыванию C1q K326A/E333A или K326W/E333S на агонистическую активность антитела против DR5a IgG1-hDR5-01-G56T проводили анализ жизнеспособности на DR5-положительных клетках VxPC-3 и COLO 205. Анализ жизнеспособности проводили, как описано в Примере 3. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли люминесцентным методом анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в Примере 2.

Из фиг. 4B/C видно, что сочетание усиливающей Fc-Fc замены E430G и двух мутаций K326W/E333S приводило к индукции сильного уничтожающего действия у антитела против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T при тестировании в виде отдельного средства при анализе жизнеспособности *in vitro* на адгезированных раковых клетках VxPC-3 поджелудочной железы (фиг. 4B) и COLO 205 толстой кишки человека (фиг. 4C). Напротив, антитело WT и IgG1-hDR5-01-G56T-E430G не проявляли эффективности. Уничтожающее действие IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G было сильнее, чем у IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/E430G и на раковых клетках VxPC-3, и на COLO 205.

В целом эти данные показывают, что сочетание усиливающей Fc-Fc замены E430G с заменами K326A/E333A или K326W/E333S приводит к усилению связывания C1q и повышению агонистической активности антитела против DR5 IgG1-CONA-C49W-E430G только с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G.

#### **Пример 6. Влияние комбинации E430G с другими вариантами Fc на связывание C1q и эффективность агонистических антител против DR5**

Для изучения влияния замен по связыванию C1q S267E/H268F/S324T или варианта 113F IgG1 химерного изотипа IgG1/IgG3 на связывание C1q с антителом, содержащим усиливающую Fc-Fc мутацию E430G (Tammen et al., J Immunol. 2017), проводили анализ связывания C1q по ELISA. Тестировали очищенные образцы вариантов антитела IgG1-

hDR5-01-G56T с этими заменами и без них и сравнивали с IgG1-hDR5-01-G56T дикого типа (WT) и IgG1-hDR5-01-G56T-E430G. В качестве отрицательного контроля на связывание C1q использовали IgG-2F8-I253D/K322A. ELISA по связыванию C1q проводили в планшетах для ELISA, покрытых антителом при 1 мкг/мл, как описано в Примере 4.

Из фиг. 5А видно, что введение усиливающей Fc-Fc замены E430G не влияло на кажущееся сродство связывания C1q с фиксированным при 1 мкг/мл антителом IgG1-hDR5-01-G56T. Напротив, вариант антитела, содержащий комбинацию замены E430G и замен S267E/H268F/S324T, проявлял сильное усиление связывания C1q по сравнению с IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-01-G56T-E430G, тогда как введение замены E430G у варианта в формате IgG113F-hDR5-01-G56T приводило к небольшому усилению связывания C1q по сравнению с IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-01-G56T-E430G (табл. 4).

**Таблица 4.** Значения EC<sub>50</sub> по связыванию C1q с вариантами антитела IgG1-hDR5-01-G56T (ELISA)

Вариант антитела IgG1-hDR5-01-G56T (1 мкг/мл)	EC <sub>50</sub> по связыванию C1q (мкг/мл)	SD	n	Вариант антитела по сравн. с WT <sup>1</sup>	Вариант антитела по сравн. с E430G <sup>1</sup>
WT	15,2	12,2	3	не применимо	не значимо
E430G	15,4	6,1	3	не значимо	не применимо
S267E/H268F/S324T/ E430G	0,5	0,1	3	p<0,05	p<0,05
IgG113F-E430G	11,4	3,9	3	не значимо	не значимо

<sup>1</sup> Односторонний метод ANOVA,  $p = 0,0013$ ; критерий Бонферрони post hoc, Ab против WT:  $p < 0,05$ , как указано.

Для изучения влияния комбинации усиливающей Fc-Fc замены E430G с заменами по связыванию C1q S267E/H268F/S324T (Moore et al., MAbs 2010) или с вариантом 113F химерного изоформа IgF1/IgG3 (Natsume et al., Cancer Res. 2008) на агонистическую активность антитела против DR5а IgG1-hDR5-01-G56T проводили анализ жизнеспособности на DR5-положительных клетках VxPC-3 и COLO 205. Анализ жизнеспособности проводили, как описано в Примере 3. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли люминесцентным методом анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в Примере 2.

Из фиг. 5B/C видно, что сочетание усиливающей Fc-Fc замены E430G с заменами по связыванию C1q S267E/H268F/S324T приводило к индукции уничтожающего действия у антитела против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T при тестировании в виде отдельного средства при анализе жизнеспособности in vitro на адгезированных раковых клетках VxPC-3

поджелудочной железы (фиг. 5B) и COLO 205 толстой кишки человека (фиг. 5C). При включении E430G в IgG1 варианта 113F IgG1-hDR5-01-G56T химерного изотипа IgG1/IgG3 наблюдалась индукция уничтожающего действия на COLO 205 (фиг. 5C) и немного на VxPC-3, где агонистическая активность наблюдалась только при самой высокой концентрации антитела (фиг. 5B). Однако эффективность этих вариантов IgG1-hDR5-01-G56T-S267E/H268F/S324T/E430G и IgG113F-hDR5-01-G56T-E430G была значительно ниже, чем у IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G и IgG1-hDR5-01-G56T-K326A/E333A/P396L/E430G на обеих клеточных линиях. Как и в предыдущих примерах, антитело WT и IgG1-hDR5-01-G56T-E430G не проявляли эффективности.

В целом эти данные показывают, что сочетание усиливающей Fc-Fc замены E430G с заменами S267E/H268F/S324T приводит к сильному повышению связывания C1q и агонистической активности антитела против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G только с усиливающей Fc-Fc заменой E430G. У варианта в формате IgG113F-hDR5-01-G56T введение замены E430G приводило к небольшому повышению связывания C1q и агонистической активности антитела.

#### **Пример 7. Сводка по влиянию комбинации E430G с другими мутациями и вариантами Fc на эффективность агонистических антител против DR5**

В предыдущих примерах были описаны анализы жизнеспособности, в которых тестировали влияние на агонистическую активность антитела против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T при комбинировании усиливающей Fc-Fc замены E430G с другими заменами или вариантами Fc-области, влияющими на агонизм DR5 либо на связывание C1q. В данном примере представлена сводка по всем анализам жизнеспособности на адгезированных раковых клетках VxPC-3 поджелудочной железы человека путем представления и ранжирования процента жизнеспособных клеток после инкубации в течение 3 дней с указанными антителами при 10 мкг/мл относительно IgG1-hDR5-01-G56T дикого типа (WT), который, как было показано в примерах 2, 4, 5 и 6, не оказывает влияния. Подробности анализа жизнеспособности на адгезированных клетках VxPC-3 и люминесцентного метода CellTiter-Glo описаны в Примере 2.

Из фиг. 6 видно, что сочетание усиливающей Fc-Fc замены E430G с двойной заменой K326W/E333S по связыванию C1q проявляло наиболее значительный эффект при сравнении с антителом IgG1-hDR5-01-G56T дикого типа (WT) после 3-дневной инкубации раковых клеток VxPC-3 поджелудочной железы человека с антителом при 10 мкг/мл в полной культуральной среде, содержащей инактивированную нагреванием фетальную телячью сыворотку. Также комбинации E430G с K326A/E333A/P396L, E333A/P396L и K326A/E333A давали значительно меньший процент жизнеспособных клеток, чем

антитело WT. Другие варианты Fc, которые ранее усиливали связывание C1q, такие как S267E/H268F/S324T и химерный IgG-113F типа IgG1/IgG3, не проявляли значительной индукции уничтожающего действия в сочетании с E430G у IgG1-hDR5-01-G56T при постановке эксперимента с 10 мкг/мл антител на адгезированных клетках VxPC-3, при которой также IgG1-hDR5-01-G56T-E430G не вызывало уничтожающего действия при тестировании в виде отдельного средства.

**Пример 8. Влияние C1q на активность *in vitro* агонистических антител против DR5 с усиливающей Fc-Fc заменой в сочетании с заменами по связыванию C1q**

Предыдущие примеры свидетельствуют, что усиление связывания C1q способствует лучшей агонистической активности исследуемых антител против DR5, содержащих усиливающую Fc-Fc мутацию E430G. Для проверки влияния C1q проводили анализ жизнеспособности с IgG1-CONA-K326A/E333A/P396L/E430G и IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G на клетках WIL2-S SF в бессывороточной среде в присутствии или в отсутствие очищенного C1q человека. Клетки WIL2-S SF происходят из В-лимфоцитов WIL2-S (ATCC, CRL-8885) и адаптированы для роста в бессывороточных условиях в культуральной среде по рецептуре HyQ-ADCF-Mab (Perbio, кат. № SH30349), содержащей 50 ед./мл Pen/Strep и 1 мМ пируват натрия. Суспензии клеток WIL2-S SF пропускали через клеточный фильтр, осаждали центрифугированием 5 мин при 300×g и ресуспендировали в бессывороточной культуральной среде в концентрации  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл. По 100 мкл суспензии одиночных клеток (50000 клеток на лунку) высевали в полистироловые 96-луночные плоскодонные планшеты (Greiner Bio-One, кат. № 655182). Добавляли по 25 мкл серийных разведений препаратов антител (конечные концентрации от 0,0003 до 20000 нг/мл в 4-кратных разведениях) и 25 мкл очищенного C1q (Quidel, кат. № A400; конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и инкубировали 1 день при 37°C. В качестве отрицательного и положительного контроля клетки инкубировали в среде без антител или с 5 мкМ стауроспорина (Sigma Aldrich, кат. № S6942), соответственно. Жизнеспособность клеток определяли по окрашиванию TO-PRO-3. TO-PRO-3 – не проникающий в клетки мономерный карбоцианиновый краситель, который связывается с двухцепочечной ДНК. Поэтому TO-PRO-3 может применяться в качестве индикатора мертвых клеток. Все образцы переносили в полистироловые 96-луночные планшеты с U-образным дном (Greiner Bio-One, кат. № 650261), центрифугировали 3 мин при 300×g и отбирали 70 мкл супернатанта. Добавляли 10 мкл смеси TO-PRO-3 (Invitrogen, кат. № T3605, 20 мкл TO-PRO-3 + 1980 мкл PBS) и ресуспендировали клетки пропусканием через пипетку. Определяли количество TO-PRO-3-положительных клеток методом проточной цитометрии на клеточном анализаторе BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences).

Из фиг. 7 видно, что добавление очищенного C1q в бессывороточную среду значительно усиливает действие IgG1-CONA-K326A/E333A/P396L/E430G (фиг. 7A) и IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G (фиг. 7B) на клетки WIL2-S SF. Эти данные означают, что связывание C1q способствует улучшению агонистической активности агонистических антител против DR5, содержащих усиливающую Fc-Fc замену E430G в сочетании с K326A/E333A/P396L или с заменами по связыванию C1q K326W/E333S.

**Пример 9. Влияние C1q на агонистическую активность *in vitro* агонистических антител против DR5 с усиливающей Fc-Fc заменой в сочетании с заменами по связыванию C1q**

В примере 8 проверяли влияние C1q на эффективность агонистических антител против DR5 при анализе жизнеспособности клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде с рядом концентраций антител при фиксированной концентрации C1q. А в этом примере проверяли влияние ряда концентраций C1q на эффективность вариантов агонистического антитела IgG1-hDR5-01-G56T с усиливающей Fc-Fc заменой (E430G) в сочетании с заменами по связыванию C1q (K326A/E333S/P396L, K326W/E333S или K326A/E333A) при анализе жизнеспособности клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде. Анализ жизнеспособности в основном проводили, как описано в Примере 8, при фиксированной концентрации антител 2,5 мкг/мл и с рядом концентраций очищенного C1q при конечных концентрациях от 0,0002 до 2,5 мкг/мл в 4-кратных разведениях.

Из фиг. 8 видно, что добавление очищенного C1q в бессывороточную среду повышает активность антител против DR5, содержащих усиливающую Fc-Fc замену E430G. Все исследованные варианты антитела IgG1-hDR5-01-G56T-E430G, содержащие усиливающие связывание C1q замены (K326A/E333S/P396L, K326W/E333S или K326A/E333A), проявляли действие на клетки WIL2-S SF зависимым от дозы C1q образом (фиг. 8A). Из всех исследованных антител наибольшую эффективность проявляло IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G, достигая максимального уровня при концентрациях C1q, начиная с 0,16 мкг/мл. Эти данные означают, что связывание C1q способствует улучшению активности агонистических антител против DR5, содержащих усиливающую Fc-Fc замену E430G в сочетании с заменами по связыванию C1q K326A/E333A/P396L, K326W/E333S или K326A/E333A. Также комбинация антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, нацеленная на два эпитопа, проявляла зависимое от дозы C1q повышение эффективности C1q в уничтожении клеток WIL2S-SF в бессывороточной среде, достигая максимального уровня при 0,16 мкг/мл C1q (фиг. 8B).

**Пример 10. Влияние нейтрализации C1q на агонистическую активность *in vitro* агонистических антител против DR5 с усиливающей Fc-Fc заменой в сочетании**

**с заменами по связыванию C1q**

Проверяли потребность в C1q для эффективности агонистического антитела против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G, содержащего усиливающую Fc-Fc замену E430G в сочетании с заменой K326W/E333S по связыванию C1q, используя нейтрализующее C1q антитело, направленное против глобулярной области головки C1q, методом анализа жизнеспособности клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде, содержащей очищенный C1q. Также проверяли эффект нейтрализации C1q в тех же условиях для нацеленной на два эпитопа комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G. Анализ жизнеспособности в основном проводили так, как описано в Примере 8. Вкратце, клетки WIL2-S SF ресуспендировали в бессывороточной культуральной среде при концентрации  $0,67 \times 10^6$  клеток/мл. По 75 мкл суспензии одиночных клеток (50 000 клеток на лунку) высевали в бессывороточную культуральную среду в полистироловых 96-луночных плоскодонных планшетах. Затем добавляли 25 мкл образца антител против DR5 (конечная концентрация 2,5 мкг/мл), 25 мкл очищенного C1q (конечная концентрация 0,01 мкг/мл) и 25 мкл образца антитела против C1q (Sanquin, CLB/C1q-85, кат. № MW1828; конечная концентрация 10 мкг/мл) и инкубировали 1 день при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли по окрашиванию TO-PRO-3, как описано в Примере 8.

Эффект добавления очищенного C1q в бессывороточную среду для усиления активности антитела против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-K326W/E333S/E430G, как описано в примере 9, подтвердился в этом эксперименте (фиг. 9A). Более того, эта активность уменьшалась при нейтрализации связывания добавленного C1q с антителом против DR5 в присутствии избытка антитела против C1q (фиг. 9A). Эти данные показывают, что связывание C1q необходимо для оптимальной активности агонистических антител против DR5, содержащих усиливающую Fc-Fc замену E430G в сочетании с заменой по связыванию C1q K326W/E333S. Также подтвердилась C1q-зависимая эффективность в уничтожении клеток WIL2S-SF для нацеленной на два эпитопа комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, проявляющей повышение эффективности при добавлении C1q в бессывороточную среду и нейтрализацию этого эффекта в присутствии избытка антитела против C1q (фиг. 9B).

**Пример 11. Анализ активации комплемента в фазе раствора для антител с усиливающей Fc-Fc заменой в сочетании с заменами по связыванию C1q**

Определяли независимую от связывания мишени активацию комплемента вариантами антител по определению C4d, маркера классического пути активации комплемента, после инкубации антител в нормальной сыворотке человека (NHS).

Применяли 3-стадийную методику ELISA, используя набор для иммуноферментного анализа MicroVue C4d (Quidel, кат. № A0008), содержащий (1) микропланшет для анализа, покрытый моноклональным антителом мыши, специфически связывающимся с содержащими C4d активационными фрагментами C4 человека, (2) конъюгированное с HRP козье антитело против C4d человека и (3) хромогенный субстрат. Вместе с набором поставляются внутренние контроли и стандарты, которые использовали, как описано в инструкциях производителя. В качестве положительного контроля готовили агрегированный нагреванием  $\gamma$ -глобулин следующим образом. Аликвоты по 1 мл во флаконах на 1,5 мл раствора IVIG (60 мг/мл; Sanquin, кат. № 04H04H443A) нагревали 20 мин при 63°C. Флаконы объединяли, разбавляли PBS до 20 мг/мл и фильтровали через шприц-фильтр, содержащий мембрану из ацетата целлюлозы без сурфактанта (SFCA) с порами 0,22 мкм (Corning, кат. № 431219). Аликвоты ~ 0,2 мл хранили при 4°C. Для образцов антител по 50 мкл образцов препаратов антител по 100 мкг/мл в 90% нормальной человеческой сыворотке (NHS, Sanquin M0008AC) инкубировали в полипропиленовых 96-луночных планшетах с U-образным дном (Greiner Bio-One; кат. № 650261) 1 час при 37°C. Затем по 5 мкл этих образцов разводили в 90 раз разбавителем образцов и разведенные образцы по 100 мкл на лунку инкубировали 30 мин при комнатной температуре со встряхиванием в Coated Strips, которые перед этим трижды промывали 250 мкл промывочного раствора. Затем лунки 5 раз промывали 250 мкл промывочного раствора и инкубировали с конъюгатом C4d по 50 мкл на лунку в течение 30 мин при комнатной температуре со встряхиванием. Лунки 5 раз промывали 250 мкл отмывочного раствора, а затем инкубировали с субстратом по 100 мкл на лунку в течение 30 мин при комнатной температуре со встряхиванием. Реакции останавливали добавлением стоп-раствора по 50 мкл на лунку и измеряли интенсивность окраски спектрофотометрически при 405 нм на считывающем устройстве BioTek EL808 (BioSPX).

Образцы положительного контроля проявляли четкое повышение уровня C4d по сравнению с образцами отрицательного контроля (фиг. 10). Напротив, не наблюдалось четкого повышения уровней C4d у всех исследованных вариантов антитела IgG1-hDR5-01-G56T, содержащих усиливающую Fc-Fc замену E430G в сочетании с заменами по связыванию C1q K326W/E333S, K326A/E333A или K326A/E333A/P396L, при инкубации в NHS в отсутствие клеток мишени (фиг. 10), тогда как C4d вырабатывался при инкубации в NHS положительных контролей HAGG, представляющих случайные иммунные комплексы, и IgG1-CONA-RGY, представляющих гексамеры IgG1 в жидкой фазе. Эти данные указывают на то, что варианты антитела IgG1-hDR5-01-G56T, содержащие усиливающую Fc-Fc замену E430G в сочетании с заменами по связыванию C1q

K326W/E333S, K326A/E333A или K326A/E333A/P396L, не проявляют независимой от мишени гексамеризации и активации комплемента в фазе раствора.

**Пример 12. Влияние комбинации E430G и K326W, E333S или K326W/E333S на связывание C1q и эффективность агонистических антител против DR5**

Для оценки эффекта введения замен K326W, E333S или K326W/E333S на связывание C1q с вариантами IgG-CONA-C49W с заменой E430G или без нее проводили анализ связывания C1q по ELISA. В качестве отрицательного контроля на связывание C1q использовали IgG-2F8-I253D/K322A. Эксперимент по ELISA проводили в 96-луночных планшетах, покрытых антителами при 1 мкг/мл, которые тестировали на связывание при различных концентрациях очищенного C1q (от 0,010 до 30 мкг/мл в 3-кратных разведениях), как описано в примере 4. Измеряли поглощение при 405 нм и анализировали данные после логарифмического преобразования путем построения сигмоидальных кривых доза-эффект с переменным наклоном с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 11А,В видно, что введение замен K326W, E333S или K326W/E333S приводило к усилению связывания C1q с иммобилизованным наугад антителом как у антитела против DR5 IgG1-CONA-C49W, так и у его варианта IgG1-CONA-C49W-E430G с усиливающей взаимодействием Fc-Fc мутацией E430G и с усиливающей гексамеризацию мутацией. Из всех исследованных вариантов антител IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G проявляло самое высокое кажущееся сродство связывания C1q.

Связывание очищенных вариантов антител с суспензиями клеток WIL2-S SF анализировали методом проточной цитометрии. Клетки собирали, подсчитывали, промывали в PBS и ресуспендировали при  $3,33 \times 10^6$  клеток/мл в культуральной среде. По 30 мкл клеток ( $1 \times 10^5$  клеток на лунку) вносили пипеткой в 96-луночные планшеты. Добавляли 50 мкл образцов серийных разведений антител (конечные концентрации антител от 0,001 до 2,5 мкг/мл в 3-кратных разведениях) и инкубировали 15 мин при 37°C. После этого добавляли 20 мкл очищенного C1q (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и инкубировали 45 мин при 4°C. Затем добавляли 100 мкл буфера FACS (PBS + 0,1% масс. бычьего сывороточного альбумина (BSA) + 0,02% масс. азида натрия), после чего дважды промывали клетки 150 мкл буфера FACS. Отмытые клетки инкубировали 30 мин при 4°C с 50 мкл помеченного FITC кроличьего антитела против C1q человека (конечная концентрация 20 мкг/мл; ДАКО, кат. № F0254). Добавляли 100 мкл буфера FACS и дважды отмывали клетки буфером FACS. Клетки ресуспендировали в 30 мкл буфера FACS и измеряли флуоресценцию на проточном цитометре iQue Screener (IntelliCyt). Кривые связывания после логарифмического преобразования по оси концентрации C1q

анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 11C,D видно, что введение только замены E333S или E430G в антитело против DR5 IgG1-CONA-C49W антитела не влияло на связывание C1q с антителом, связанным с DR5-положительными клетками WIL2-S SF (фиг. 11C). Введение мутации K326W в антитело против DR5 IgG1-CONA-C49W или IgG1-CONA-C49W-E430G приводило к усилению связывания C1q с опсонизированными антителами против DR5 клетками WIL2-S SF, что согласуется с усилением связывания C1q, наблюдавшимся для клеток, опсонизированных IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G (фиг. 11C,D). Введение E333S в антитело против DR5 IgG1-CONA-C49W-E430G приводило к умеренному повышению связывания C1q с опсонизированными антителами клетками WIL2-S SF (фиг. 11D). Эти данные проточной цитометрии указывают на то, что связанное с клетками IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G проявляет самое сильное связывание C1q.

Для оценки эффекта введения K326W, E333S или K326W/E333S в варианты антитела против DR5 IgG1-CONA-C49W с заменой E430G или без нее на активность агонистов DR5 проводили анализ жизнеспособности на клетках WIL2-S SF. Проводили 1-дневный анализ жизнеспособности, в основном как описано в Примере 8. Вкратце, в 96-луночные планшеты вносили пипеткой по 100 мкл клеток в бессывороточной среде (50 000 клеток на лунку). Добавляли 25 мкл очищенного C1q (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и 25 мкл образцов серийных разведений антител (конечные концентрации от 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали при 37°C в течение 1 дня. Жизнеспособность клеток определяли методом CellTiterGlo, как описано в Примере 2. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные по концентрации C1q после логарифмического преобразования анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 11E-G видно, что введение только мутации K326W, E333S или E430G в антитело против DR5 IgG1-CONA-C49W не вызывало индукции активности агониста DR5 в клетках WIL2-S SF, тогда как двойная мутация K326W/E333S в IgG1-CONA-C49W вызывала индукцию активности агониста DR5 и частичное уничтожение клеток WIL2-S SF (фиг. 11E). Комбинирование мутации K326W, E333S или двойной мутации K326W/E333S с усиливающей Fc-Fc мутацией E430G у антитела против DR5 IgG1-CONA-C49W приводит к индукции активности агониста DR5, при этом K326W/E333S/E430G вызывает наибольшую максимальную гибель клеток WIL2-S SF (фиг. 11F).

**Пример 13. Влияние комбинации E430G и K326W, E333S или K326W/E333S на**

### **C1q-зависимую эффективность агонистических антител против DR5**

Проверяли влияние введения замен K326W, E333S или K326W/E333S у вариантов антитела против DR5 IgG-CONA-C49W с мутацией E430G или без нее на C1q-зависимую агонистическую активность. Проводили 1-дневный анализ жизнеспособности *in vitro* на клетках WIL2-S SF в бессывороточной среде при различных концентрациях C1q, в основном как описано в примере 8. Вкратце, в 96-луночные планшеты вносили пипеткой по 100 мкл клеток в бессывороточной среде (50 000 клеток на лунку). Добавляли по 25 мкл образцов антител (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и 25 мкл серийных разведений очищенного C1q (конечные концентрации от 42 пг/мл до 2,5 мкг/мл в 3-кратных разведениях) и инкубировали при 37°C в течение 1 дня. Жизнеспособность клеток определяли методом CellTiterGlo, как описано в Примере 2. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные по концентрации C1q после логарифмического преобразования анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 12 видно, что введение усиливающей Fc-Fc замены E430G или усиливающих связывание C1q замен K326W или E333S в виде единичной мутации в антитело против DR5 IgG1-CONA-C49W приводит к индукции зависимо от дозы C1q уничтожения клеток WIL2-S SF, а по сравнению с этим введение двойной мутации K326W/E333S приводит к более эффективной индукции зависимо от дозы C1q уничтожения клеток WIL2-S SF. Комбинирование усиливающей Fc-Fc замены E430G и исследованных замен по связыванию C1q приводит к более эффективному уничтожению, причем IgG-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G наиболее эффективно вызывает зависимо от дозы C1q уничтожение клеток WIL2-S SF (фиг. 12).

**Пример 14. Влияние нейтрализации C1q на агонистическую активность *in vitro* антител против DR5 с мутацией E430G в сочетании с мутацией K326W, E333S или K326W/E333S**

Для проверки вклада C1q в эффективность агонистических антител против DR5, содержащих усиливающую Fc-Fc мутацию E430G, добавляли нейтрализующее C1q антитело при анализе жизнеспособности на клетках WIL2-S SF, опсонизированных вариантами IgG1-CONA-C49W, в бессывороточной среде, содержащей очищенный C1q человека. Эксперимент проводили в основном, как описано в Примере 8. Вкратце, по 75 мкл суспензии клеток (50 000 клеток на лунку) высевали в бессывороточную культуральную среду в полистироловых 96-луночных плоскодонных планшетах. К клеткам WIL2-S SF добавляли по 25 мкл вариантов антитела IgG1-CONA-C49W (конечная

концентрация 2,5 мкг/мл), 25 мкл очищенного C1q (при конечных концентрациях C1q, близких к концентрации EC<sub>90</sub> для каждого отдельного антитела согласно табл. 5) и 25 мкл (конечная концентрация 10 мкг/мл) нейтрализующего C1q антитела (CLB-C1q-85; Sanquin, кат. № MW1828) или контрольного изотипного антитела (очищенный IgG1κ мыши, клон MOPC-21; BD Biosciences, кат. № 555746) и инкубировали 1 день при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли методом CellTiter-Glo, как описано в Примере 2. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные анализировали и строили графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 13 видно, что в присутствии нейтрализующего C1q антитела полностью ингибировалась активность агониста DR5 у вариантов IgG1-CONA-C49W с заменами K326W/E430G, E333S/E430G или K326W/E333S. Для IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G нейтрализация C1q приводила к частичному ингибированию активности агониста DR5.

**Таблица 5.** Значения EC<sub>90</sub> для C1q при 2,5 мкг/мл указанных антител при анализе жизнеспособности клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде с добавлением серийных разведений очищенного C1q, как описано в Примере 13 (данные не приводятся)

<b>Антитело</b>	<b>EC<sub>90</sub> для C1q (мкг/мл)</b>	<b>Концентрация C1q на фиг. 13 (мкг/мл)</b>
IgG1-b12	>2,5	2,5
IgG1-CONA-C49W	>2,5	2,5
<b>IgG1-CONA-C49W-K326W/E430G</b>	1,0	1,0
<b>IgG1-CONA-C49W-E333S/E430G</b>	>2,5	2,5
IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S	0,3	0,3
<b>IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G</b>	0,1	0,1

**Пример 15.** Влияние ингибирования взаимодействия Fc-Fc на агонистическую активность *in vitro* антител против DR5 с мутацией E430G в сочетании с K326W, E333S или K326W/E333S

Для проверки участия опосредованной Fc-Fc гексамеризации антител в индукции клеточной смерти вариантами антитела IgG1-CONA воспользовались пептидом из 13 остатков DCAWHLGELVWCT (DeLano et al., Science 2000 Feb 18, 287(5456): 1279-83), который связывает Fc в участке, содержащем базовые аминокислоты в районе гидрофобных ручек, участвующих во взаимодействиях Fc-Fc (Diebold et al., Science 2014 Mar 14, 343 (6176): 1260-3). Жизнеспособность клеток WIL2-S SF определяли в присутствии или в отсутствие пептида DCAWHLGELVWCT, в основном как описано в примере 14. Вкратце, по 75 мкл суспензии клеток WIL2-S SF (50 000 клеток на лунку)

высеивали в бессывороточную культуральную среду в полистироловых 96-луночных плоскодонных планшетах. Добавляли по 25 мкл антител (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 25 мкл ингибирующего Fc-Fc пептида DCAWHLGELVWCT или разупорядоченного контрольного пептида WCDLEGVTWHACL (80 мкг/мл) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 25 мкл очищенного C1q (при конечных концентрациях C1q, близких к концентрации EC<sub>90</sub> для каждого отдельного антитела, как указано в примере 14, табл. 1) и инкубировали 1 день при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли методом CellTiter-Glo, как описано в Примере 2. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные анализировали и строили графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 14 видно, что в присутствии ингибирующего Fc-Fc пептида DCAWHLGELVWCT активность агониста DR5 у вариантов IgG1-CONA-C49W с заменами K326W/E430G, E333S/E430G, K326W/E333S или K326W/E333S/E4G частично ингибировалась. Ингибирующий Fc-Fc пептид ингибировал агонистическую активность IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G с усиливающей Fc-Fc мутацией E430G сильнее, чем IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S без мутации E430G.

**Пример 16. Влияние комбинации K326W/E333S с усиливающей Fc-Fc мутацией E345K, E345R или S440Y на агонистическую активность антитела против DR5**

Для изучения влияния комбинации замен по связыванию C1q K326W/E333S с усиливающими Fc-Fc мутациями E345K, E345R или S440Y на агонистическую активность антитела против DR5 IgG1-CONA-C49W, опсонизированного на клетках VxPC-3, проводили анализ жизнеспособности. Вкратце, по 100 мкл суспензии одиночных клеток VxPC-3 высеивали в полную культуральную среду (RPMI, содержащую 10% DBSI) в полистироловых 96-луночных плоскодонных планшетах (5000 клеток на лунку) и оставляли для прикрепления на ночь при 37°C. Затем добавляли 50 мкл серийных разведений препаратов антител (конечные концентрации от 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали 3 дня при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли методом CellTiter-Glo. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer). Данные после логарифмического преобразования по оси концентраций анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 15А видно, что при введении мутации E345R антитело IgG1-CONA-C49W вызывало сильную гибель клеток

ВхРС-3, легкую гибель при мутации E430G или E345K, а S440Y не давала эффекта. Из фиг. 15B видно, что уничтожение клеток ВхРС-3 вариантами IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S повышалось при мутации E430G, E345K или E345R, а при введении мутации S440Y оно больше не повышалось. В целом эти данные показывают, что усиливающая связывание C1q мутация K326W/E333S может усиливать эффективность агонистических антител IgG1 против DR5 с различными усиливающими Fc-Fc мутациями типа E430G, E345K или E345R.

**Пример 17. Влияние комбинации E430G с другими модификациями Fc на эффективность агонистических антител против DR5**

Для изучения влияния комбинации усиливающей Fc-Fc замены E430G с заменами по связыванию C1q S267E/H268F/S324T или с вариантом 113F химерного изотипа IgG1/IgG3 на агонистическую активность антитела против DR5 IgG1-CONA-C49W, опсонизированного на DR5-положительных клетках ВхРС-3, проводили анализ жизнеспособности. Вкратце, по 100 мкл суспензии одиночных клеток ВхРС-3 высевали в культуральную среду (RPMI, содержащую 10% инактивированной нагреванием DBSI) в полистироловых 96-луночных плоскодонных планшетах (5000 клеток на лунку) и оставляли для прикрепления на ночь при 37°C. Добавляли 25 мкл очищенного C1q (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и 25 мкл образцов антител в серийных разведениях (конечные концентрации от 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали 3 дня при 37°C. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли методом CellTiter-Glo, как описано в Примере 2. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные после логарифмического преобразования по оси концентраций анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) и строили графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 16 видно, что комбинирование усиливающей Fc-Fc замены E430G с усиливающими связывание C1q форматами S267E/H268F/S324T (фиг. 16A) или IgG113F (фиг. 16B) приводило к индукции агонистической активности у антитела против DR5 IgG1-CONA-C49W на адгезированных раковых клетках ВхРС-3 поджелудочной железы человека. Комбинирование замены E430G с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S приводило к усилению активности агониста DR5 у IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G по сравнению с IgG1-CONA-C49W-S267E/H268F/S324T/E430G и IgG113F-CONA-C49W-E430G.

**Пример 18. Эффективность моновалентного антитела против DR5, содержащего замены K326W/E333S/E430G**

Для изучения влияния на агонистическую активность моновалентного антитела

против DR5, содержащего замены K326W/E333S/E430G, опсонизированного на раковых клетках ВхРС-3 поджелудочной железы, проводили анализ жизнеспособности. Моновалентное антитело DR5 получали путем контролируемого обмена Fab-плеча между IgG1-CONA-C49W-F405L-K326W/E333S/E430G и IgG1-b12-K409R-K326W/E333S/E430G, как описано в Примере 1. Полученное антитело, именуемое как BsAb (IgG1-CONA-C49W-F405L×IgG1-b12-K409R)-K326W/E333S/E430G, содержит одно плечо, специфичное для DR5, и одно неспецифичное плечо против гликопротеина gp120 ВИЧ, что приводит к моновалентному связыванию DR5 с DR5-положительными клетками человека. Проводили 1-дневный анализ жизнеспособности на клетках WIL2-S SF, в основном как описано в Примере 8. Вкратце, по 100 мкл клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде вносили пипеткой в 96-луночные планшеты (50 000 клеток на лунку). К клеткам добавляли 25 мкл очищенного C1q (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и по 25 мкл серийных разведений образцов антител (конечные концентрации от 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали 1 день при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли методом CellTiter-Glo, как описано в Примере 2. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные после логарифмического преобразования по оси концентраций анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) и строили графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 17 видно, что в присутствии мутаций K326W/E333S/E430G моновалентный вариант IgG1-CONA-C49W все-таки может вызывать гибель клеток WIL2-S SF.

**Пример 19. Влияние комбинации E430G и K326W/E333S на агонистическую активность вариантов антитела против DR5 различных изотипов**

Для проверки того, может ли введение замен K326W/E333S/E430G индуцировать агонистическую активность антител против DR5 не в остоле IgG1, получали варианты IgG3-CONA-C49W изотипа IgG3 с константными доменами IgG3 человека известными в данной области методами, получая IgG3-CONA-C49W. Остол IgG3 также содержал мутацию R345H для усиления связывания FcRn (Stapleton et al., 2011, Nat. Commun.). Вводили замены K326W/E333S/E430G в варианты обоих изотипов IgG1 и IgG3 и тестировали агонистическую активность различных антител методом анализа жизнеспособности *in vitro* на клетках различных линий: клетках В-лимфоцитов WIL2-S SF человека, раковых клетках ВхРС-3 и HPAF-II (ATCC, CRL-1997) поджелудочной железы и раковых клетках HT-29 (ATCC, HTB-38) толстой кишки. Анализ жизнеспособности на суспензиях клеток WIL2-S SF в основном проводили, как описано в Примере 8. Вкратце, по 100 мкл клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде вносили

пипеткой в 96-луночные планшеты (50 000 клеток на лунку). Затем к клеткам добавляли по 25 мкл очищенного C1q (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и 25 мкл серийных разведений образцов антител (конечные концентрации от 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали 1 день при 37°C. Для адгезированных клеток VxPC-3, HPAF-II и HT-29 проводили 3-дневный анализ жизнеспособности в основном, как описано в Примере 3. Вкратце, по 100 мкл клеток в культуральной среде (RPMI 1640 с 25 mM Нерес и L-глутамином + 10% инактивированной нагреванием DBSI + 50 ед./мл Pen/Strep) вносили пипеткой в 96-луночные планшеты (5 000 клеток на лунку) и оставляли для прикрепления на ночь при 37°C. Затем к клеткам добавляли по 25 мкл очищенного C1q (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и 25 мкл серийных разведений образцов антител (конечные концентрации от 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали 3 дня при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли методом CellTiter-Glo, как описано в Примере 2. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные после логарифмического преобразования по оси концентраций анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) и строили графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 18 видно, что введение замен K326W/E333S/E430G в IgG3-вариант антитела против DR5 (IgG3-DR5-CONA-C49W-R435H-K326W/E333S/E430G) приводило к индукции активности агониста на всех исследованных линиях клеток: WIL2S-SF (фиг. 18A), VxPC-3 (фиг. 18B), HPAF-II (фиг. 18C) и HT29 (фиг. 18D). IgG1-вариант IgG1-DR5-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G оказался более сильным, чем IgG3-вариант IgG3-DR5-CONA-C49W-R435H-K326W/E333S/E430G на всех исследованных линиях клеток.

**Пример 20. Влияние комбинации E430G и K326W/E333T на агонистическую активность антител против DR5**

Для оценки влияния комбинации усиливающей Fc-Fc замены E430G и K326W/E333T по сравнению с K326W/E333S на агонистическую активность антитела против DR5 IgG1-CONA-C49W проводили анализ жизнеспособности на DR5-положительных клетках WIL2-S. Анализ жизнеспособности *in vitro* в основном проводили, как описано в Примере 8. Вкратце, по 100 мкл клеток WIL2-S SF в культуральной среде (RPMI 1640 с 25 mM Нерес и L-глутамином (Lonza, кат. № BE12-115F) + 10% инактивированной нагреванием DBSI + 1 mM пирувата натрия (Lonza, кат. № BE13-115E) + 50 ед./мл Pen/Strep) вносили пипеткой в 96-луночные планшеты (50 000 клеток на лунку). Затем к клеткам добавляли по 50 мкл серийных разведений образцов антител (конечные концентрации от 0,001 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и 10 мкл очищенного C1q (конечная концентрация 2,5

мкг/мл) и инкубировали 1 день при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли методом CellTiterGlo, как описано в Примере 2. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные после логарифмического преобразования по оси концентраций анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 19 видно, что введение K326W/E333T/E430G в IgG1-CONA-C49W приводило к индукции активности агониста DR5 у данного агента с такой же эффективностью уничтожения при анализе жизнеспособности *in vitro* на клетках WIL2-S, как при введении K326W/E333S/E430G.

**Пример 21. Фармакокинетический (ФК) анализ вариантов антитела IgG1-CONA-C49W, содержащих усиливающую Fc-Fc мутацию и/или мутации Fc по связыванию C1q**

Изучали влияние усиливающей Fc-Fc мутации E430G и усиливающих связывание C1q мутаций на скорость клиренса IgG1-CONA-C49W в эксперименте по ФК на мышах SCID. Все исследованные варианты антител перечислены в табл. 6. Эксперименты на животных проводились в соответствии с голландским законом о защите животных (WoD), переведенным из директив (2010/63/EU) и, если применимо, Кодекса практики “эксперименты на животных при исследовании рака” (Inspection V&W, Zutphen, The Netherlands, 1999) и были одобрены Этическим комитетом Утрехта. Животных содержали и обрабатывали в соответствии с хорошей практикой в отношении животных, определенной FELASA, в аккредитованном AAALAC и ISO 9001:2000 виварии (GDL). 11-12-недельным самкам мышей SCID (C.B-17/IcrHan<sup>®</sup>Hsd-Prkdc<sup>scid</sup>, мыши SCID Envigo) вводили внутривенно 450 мкг антитела (22,5 мг/кг) в объеме 200 мкл (3 мыши на группу). Брали пробы крови по 50 мкл из подкожной вены ноги через 10 мин, 4 часа, 1 день, 2 дня, 7 дней, 14 дней и 20 дней после введения антитела. Кровь собирали в содержащие гепарин флаконы и центрифугировали 10 мин при 14000 g. По 20 мкл образцов плазмы разбавляли 380 мкл PBS (1:20) и хранили при -20°C до определения концентрации антител. Общие концентрации IgG человека определяли методом сэндвич-ELISA. В качестве захватывающего антитела использовали мышинное mAb клона MH16 против IgG-к человека (CLB Sanquin, кат. № M1268), которое фиксировали по 100 мкл в течение ночи при 4°C в 96-луночных планшетах Microlon ELISA (Greiner, Германия) в концентрации 2 мкг/мл в PBS. Планшеты блокировали путем инкубации на качалке 1 час при комнатной температуре в PBS с добавлением 0,2% бычьего сывороточного альбумина (BSA). После отмывки добавляли 100 мкл разведенных образцов плазмы и инкубировали на качалке 1 час при комнатной температуре. Планшеты трижды отмывали 300 мкл PBST (PBS с

добавлением 0,05% Tween 20), а затем инкубировали на качалке 1 час при комнатной температуре со 100 мкл помеченного пероксидазой козьего иммуноглобулина против IgG человека (#109-035-098, Jackson, West Grace, PA; 1:10000 в PBST с добавлением 0,2% BSA). Планшеты опять 3 трижды отмывали 300 мкл PBST, а затем инкубировали 15 мин при комнатной температуре со 100 мкл субстрата 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) [ABTS; Roche, кат. № 11112 422001; 1 таблетка в 50 мл буфера ABTS (Roche, кат. № 11112 597001)], защищенными от света. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2% щавелевой кислоты с инкубацией 10 мин при комнатной температуре. Измеряли поглощение при 405 нм на считывающем устройстве (Biotek, Winooski, VT). Рассчитывали концентрации, используя введенный материал для калибровочной кривой. В качестве контроля в планшеты включали белок миеломы человека, содержащий IgG (The Binding Site, кат. № BP078). Концентрации IgG человека (в мкг/мл) наносили на графики (фиг. 20А) и рассчитывали площадь под кривой (AUC) с помощью GraphPad Prism. Показатели клиренса до последнего дня забора крови (21 день) определяли по формуле  $D \times 1000 / AUC$ , где D означает вводимую дозу 22,5 мг/кг (фиг. 20В). Все исследованные варианты IgG1-CONA-C-49W, содержащие усиливающую Fc-Fc мутацию E430G и/или усиливающие связывание C1q мутации, проявляли скорость клиренса, сравнимую с IgG1 дикого типа (WT) (фиг. 20А,В). Итак, введение усиливающих связывание C1q мутаций типа K326W/E333S или K326A/E333A не оказывает значительного влияния на скорость клиренса таких антител IgG1, содержащих усиливающую Fc-Fc мутацию E430G, как IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G и IgG1-CONA-C49W-K326A/E333A/E430G.

**Таблица 6.** Варианты антитела IgG1-CONA-C49W при анализе ФК на мышах Scid

<b>Вариант антитела</b>	<b>Усиливающая Fc-Fc мутация</b>	<b>Усиливающая связывание C1q мутация</b>
IgG1-CONA-C49W	-	-
IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S	-	K326W/E333S
IgG1-CONA-C49W-K326W/E430G	E430G	K326W
IgG1-CONA-C49W-E333S/E430G	E430G	E333S
IgG1-CONA-C49W-K326W/E333S/E430G	E430G	K326W/E333S
IgG1-CONA-C49W-K326A/E333A/E430G	E430G	K326A/E333A

**Пример 22.** Влияние комбинации усиливающей Fc-Fc мутации E430G и усиливающих связывание C1q мутаций K326A/E333A или K326W/E333S на

### связывание с FcRn у антитела IgG1

Неонатальный Fc-рецептор (FcRn) отвечает за длительный период полужизни IgG в плазме, защищая IgG от деградации. После интернализации антител FcRn связывается с Fc-областями антител в эндосомах, где взаимодействие стабильно в слабокислой среде (pH 6,0). При возвращении на плазматическую мембрану, где среда является нейтральной (pH 7,4), взаимодействие исчезает и антитело опять попадает в кровоток. Это влияет на период полужизни IgG в плазме.

Для оценки эффекта введения комбинации усиливающей Fc-Fc мутации и усиливающих связывание C1q мутаций K326A/E333A или K326W/E333S на связывание FcRn человека с вариантами антитела IgG1-7D8 проводили анализ связывания FcRn по ELISA. В качестве отрицательного контроля на связывание FcRn использовали IgG1-7D8-I235A/H310A/H435A (нокаут FcRn; Shields et al., J. Biol. Chem. 2001, 276: 6591); а в качестве контроля на усиление связывания FcRn использовали IgG1-7D8-M252Y/S254T/T256E (Dall'Acqua et al., J Biol Chem. 2006 Aug 18, 281(33): 23514-24). Все инкубации проводили при комнатной температуре. 96-луночные планшеты Streptawell (Roche, кат. № 17347760 01) в течение 1 часа покрывали полученным рекомбинантно биотинилированным внеклеточным доменом FcRn человека (FcRnECDHis-B2M-BIO, то есть внеклеточным доменом FcRn человека с C-концевым His и меткой VAP в виде димера с  $\beta_2$ -микроглобулином) при 5 мкг/мл (100 мкл на лунку), разведенным в PBST с 0,2% BSA. Планшеты трижды отмывали PBST. Добавляли серийные разведения образцов антител (конечные концентрации от 0,003 до 10 мкг/мл в 3-кратных разведениях в PBST/0,2% BSA, pH 6,0) и инкубировали 1 час. Планшеты отмывали PBST/0,2% BSA, pH 6,0. Добавляли конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) поликлональное козье антитело против IgG человека (1:10000; Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-035-097), разведенное в PBST/0,2% BSA, pH 6,0 или 7,4, и инкубировали планшеты в течение 1 часа. После отмывки добавляли 100 мкл ABTS (1 мг/мл) в качестве субстрата и инкубировали планшеты 30 мин защищенными от света. Реакцию останавливали с помощью 100 мкл 2% щавелевой кислоты и измеряли поглощение при 405 нм на считывающем устройстве ELx808 (BioТек). Данные после логарифмического преобразования анализировали и строили сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Отрицательный контроль (IgG1-7D8-I235A/H310A/H435A) проявлял полную потерю связывания FcRn человека при pH 6,0 (фиг. 21A), тогда как положительный контроль (IgG1-7D8-M252Y/S254T/T256E) проявлял усиленное связывание с FcRn человека по сравнению с IgG1-7D8 дикого типа (WT) при pH 6,0 и потерю связывания при pH 7,4 (фиг. 21B). Все исследованные варианты IgG1-7D8

с усиливающей Fc-Fc мутацией и с усиливающими связывание C1q мутациями или без них проявляли эффективное связывание с FcRn человека при pH 6,0 и потерю связывания при pH 7,4. Однако по сравнению с IgG1-7D8 WT введение одной лишь усиливающей Fc-Fc мутации E430G приводило к небольшому снижению связывания с FcRn человека при pH 6,0, которое еще больше снижалось в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326A/E333A или K326W/E333S.

**Пример 23. Влияние C1q на активность ADCC у вариантов антитела против CD20 IgG1-7D8, содержащих замены K326W/E333S/E430G**

Проверяли влияние C1q на активность ADCC у вариантов антитела против CD20 IgG1-7D8, содержащих усиливающую Fc-Fc мутацию E430G и усиливающие связывание C1q замены K326W/E333S/E430G, методом высвобождения хрома на клетках WIL2-S SF в бессывороточной среде. Клетки WIL2-S SF собирали ( $5 \times 10^6$  клеток/мл), промывали (два раза в PBS, 1200 об/мин, 5 мин) и собирали в 1 мл бессывороточной среды (среда NuQ ADCF-Mab с добавлением 10% пирувата натрия). Добавляли 200 мкКи  $^{51}\text{Cr}$  (Chromium-51; Amersham Biosciences Europe GmbH) и инкубировали на качалке с водяной баней 1 час при 37°C. После промывки клеток (дважды в PBS, 1200 об/мин, 5 мин) их ресуспендировали в бессывороточной среде. Подсчитывали меченные хромом клетки по исключению трипанового синего и разбавляли до концентрации  $1 \times 10^5$  клеток/мл. Выделяли мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) из свежих лейкоцитных пленок от здоровых доноров (Sanquin) стандартным методом центрифугирования через фиколл в соответствии с инструкциями производителя (среда для разделения лимфоцитов; Lonza). PBMCs ресуспендировали в бессывороточной среде, подсчитывали по исключению трипанового синего и концентрировали до  $1 \times 10^7$  клеток/мл. Для эксперимента по ADCC в 96-луночные планшеты вносили пипеткой по 50 мкл меченных хромом клеток WIL2-S SF (5000 клеток на лунку). Добавляли 25 мкл серийных разведений образцов антител (конечные концентрации от 0,003 до 10 мкг/мл в 3-кратных разведениях) и 25 мкл очищенного C1q человека (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) или среды и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 50 мкл PBMCs (500 000 клеток на лунку), что дает соотношение эффектора и мишени 100:1, и инкубировали 4 часа при 37°C. Максимальный лизис клеток определяли путем инкубации 50 мкл меченных хромом клеток WIL2-S SF (5000 клеток на лунку) с 100 мкл 5% Triton-X100 (Sigma-Aldrich). Спонтанный лизис определяли путем инкубации меченных хромом клеток WIL2-S SF (5000 клеток на лунку) в 150 мкл среды без антител и эффекторных клеток. Независимый от антител лизис клеток определяли путем инкубации меченных хромом клеток WIL2-S SF (5000 клеток на лунку) с PBMCs (500 000 клеток на

лунку) в общем объеме 150 мкл в отсутствие антител. Степень лизиса клеток определяли на сцинтилляционном счетчике. Клетки центрифугировали (1200 об/мин, 3 мин) и переносили по 25 мкл супернатанта в 96-луночные белые планшеты Optiplate, заполненные 100 мкл раствора Microscint-40. Высвобождаемый  $^{51}\text{Cr}$  в супернатантах определяли на сцинтилляционном счетчике. Для расчета степени опосредованного антителами лизиса использовали измеренные значения импульсов в минуту (cpm) по следующей формуле:  $(\text{cpm образца} - \text{cpm при независимом от антител лизисе}) / (\text{cpm при максимальном лизисе} - \text{cpm при спонтанном лизисе}) \times 100\%$ . В качестве отрицательного контроля использовали неспецифическое антитело IgG1-b12 и вариант IgG1-7D8 с заменами L234A/L235A/P329G, которые, как известно, устраняют связывание и активацию комплемента, а также связывание Fc $\gamma$ R и индукцию ADCC (Lo et al., JBC 2017). Как и ожидалось, активность ADCC не наблюдалась у неспецифического антитела IgG1-b12 ни в отсутствие, ни в присутствии C1q (фиг. 22). Для антитела IgG1-7D8-F405L-K326W/E333S/E430G добавление 2,5 мкг/мл очищенного C1q человека приводило к ингибированию активности ADCC на клетках WIL2-S SF в бессывороточной среде. Напротив, C1q не влиял на активность ADCC у IgG1-7D8 WT и IgG1-7D8-E430G.

**Пример 24. Влияние K326W/E333S/E430G на агонистическую активность антител против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T K326W/E333S/E430G и IgG1-hDR5-05**

Для проверки эффекта введения комбинации усиливающей Fc-Fc мутации E430G и усиливающих связывание C1q мутаций K326W/E333S на агонистическую активность антител против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-05 проводили анализ жизнеспособности *in vitro* на клетках WIL2-S SF. Проводили 1-дневный анализ жизнеспособности в основном, как описано в Примере 8. Вкратце, по 100 мкл клеток в бессывороточной среде вносили пипеткой в 96-луночные планшеты (50 000 клеток на лунку). Добавляли по 25 мкл серийных разведений образцов антител (конечные концентрации от 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и 25 мкл очищенного C1q (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и инкубировали 1 день при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли методом CellTiterGlo, как описано в Примере 2. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Введение усиливающей Fc-Fc мутации E430G вместе с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S приводило к индукции активности агониста DR5 у обоих исследованных антител IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-05, тогда как эти антитела не

вызывали гибели клеток при введении одной лишь усиливающей Fc-Fc мутации E430G (фиг. 23).

**Пример 25. Совместимость K326W/E333S/E430G с комплементарной парой мутаций Fc K439E и S440K у комбинации агонистических антител против DR5**

Проверяли совместимость мутаций K326W/E333S/E430G с другими инженерными мутациями Fc вроде комплементарной пары мутаций Fc K439E и S440K, которая может контролировать межмолекулярные взаимодействия Fc-Fc между различными антителами, связанными с мишенями на поверхности клетки, используя комбинацию агонистических антител против DR5 IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G методом анализа жизнеспособности *in vitro* на клетках WIL2-S SF. Проводили 1-дневный анализ жизнеспособности в основном, как описано в Примере 8. Вкратце, по 100 мкл клеток в бессывороточной среде вносили пипеткой в 96-луночные планшеты (50 000 клеток на лунку). Добавляли по 25 мкл серийных разведений образцов антител (конечные концентрации от 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и 25 мкл очищенного C1q (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и инкубировали 1 день при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли методом CellTiterGlo, как описано в Примере 2. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 24 видно, что само антитело IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G-K439E, содержащее ингибирующую Fc-Fc мутацию K439E, практически не вызывало гибели клеток. IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G-S440K, содержащее ингибирующую Fc-Fc мутацию S440K, вызывало некоторую гибель клеток, хотя максимальная гибель не достигала 100%. Напротив, комбинация обоих IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G-K439E + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G-S440K, объединяющая две комплементарные контролирующие Fc-Fc мутации K439E и S440K, проявляла эффективное уничтожение клеток, близкое тому, что у комбинации без комплементарных контролирующих Fc-Fc мутаций K439E и S440K. Уничтожение клеток комбинациями антител, содержащих мутации K326W/E333S/E430G (с комплементарными мутациями K439E и S440K и без них), было гораздо более эффективным, чем у комбинации антител, содержащих только усиливающую Fc-Fc мутацию E430G (IgG1-hDR5-01-K326W/E333S/E430G-K439E + IgG1-hDR5-05-K326W/E333S/E430G-S440K).

**Пример 26. Влияние комбинации усиливающих связывание C1q замен K326W/E333S с K248E/T437R на эффективность CDC у антитела против CD52**

Проверяли влияние комбинации мутаций K326W/E333S, усиливающих связывание

C1q, с заменами K248E/T437R, способствующими мультимеризации антител на клеточной поверхности (Zhang et al., 2017, MAbs (9)7: 1129-42), на эффективность CDC у вариантов антитела против CD52 IgG1-Campath (на основе алемтузумаба) на CD52-положительных клетках В-клеточной лимфомы Wien 133. Клетки Wien 133 (любезно предоставленные Dr. Geoff Hale, BioAnaLab Limited, Oxford, UK) собирали и ресуспендировали в среде RPMI (Lonza, кат. № BE12-115F) с 0,2% бычьего сывороточного альбумина (BSA; Roche, кат. № 10735086001). По 40 мкл клеток вносили пипеткой в круглодонные 96-луночные планшеты ( $0,1 \times 10^6$  клеток на лунку). Добавляли 40 мкл серийных разведений образцов антител (конечные концентрации от 0,002 до 40 мкг/мл в 4-кратных разведениях) и инкубировали 15 мин при комнатной температуре со встряхиванием. Затем добавляли 20 мкл NHS (конечная концентрация 20%) в качестве источника комплемента человека и инкубировали 45 мин при 37°C. Реакцию останавливали, помещая образцы на лед. Охлажденные клетки осаждали и ресуспендировали в 30 мкл пропидия йодида 2 мкг/мл (PI; Sigma Aldrich). Образцы анализировали методом проточной цитометрии на Intellicyt iQue Screener Plus и определяли степень лизиса по следующей формуле: % лизиса = (число PI-положительных клеток/общее число клеток)  $\times$  100%. Из фиг. 25 видно, что введение усиливающей гексамеризацию одиночной мутации E430G или усиливающей мультимеризацию двойной мутации K248E/T437R в IgG1-Campath дикого типа (WT) приводило к повышению эффективности CDC на клетках Wien 133. Эффективность CDC еще больше повышалась при комбинировании мутаций K248E/T437R, способствующих мультимеризации на клеточной поверхности, и мутаций K326W/E333S, усиливающих связывание C1q, в IgG1-Campath-K248E/K326W/E333S/T437R.

**Пример 27. Влияние комбинации E430G и K326W/E333S на эффективность агонистических антител против DR4 в присутствии C1q**

Для изучения влияния комбинации усиливающей гексамеризацию мутации E430G и K326W/E333S на агонистическую активность антитела против DR4 chCTB007 проводили анализ жизнеспособности на DR4-положительных клетках VxPC-3. Анализ жизнеспособности проводили в основном, как описано в Примере 2. По 100 мкл суспензий одиночных клеток VxPC-3 в культуральной среде (RPMI с 10% инактивированной нагреванием DBSI) высевали в полистироловые 96-луночные плоскодонные планшеты (5 000 клеток на лунку) и оставляли для прикрепления на ночь при 37°C. Добавляли 25 мкл очищенных образцов C1q (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и 25 мкл серийных разведений образцов антител (конечные концентрации от 0,00001 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали 3 дня при 37°C. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли люминесцентным методом

анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в Примере 2. Люминесценцию измеряли на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer), а данные анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Из фиг. 26 видно, что комбинирование усиливающей гексамеризацию мутации E430G и двух мутаций K326W/E333S приводило к индукции сильного уничтожающего действия у антитела против DR4 IgG1-DR4-chCTB007, так же, как у тройного мутанта E345R/E430G/S440Y при тестировании в качестве единственных агентов при анализе жизнеспособности *in vitro* на адгезированных раковых клетках VxPC-3 поджелудочной железы человека в присутствии инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки с добавлением 2,5 мкг/мл очищенного C1q. Напротив, эти антитела не проявляли эффективного уничтожения этих адгезированных клеток VxPC-3 при тестировании в виде антитела IgG1-DR4-chCTB007 дикого типа или при наличии одной лишь мутации E430G. Эти данные показывают, что мутации K326W/E333S/E430G индуцируют сильную агонистическую активность у антител против DR4 на адгезированных клетках VxPC-3 при добавлении C1q.

**Пример 28. Введение усиливающей гексамеризацию мутации E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S улучшает эффективность комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) и индукцию гибели клеток у антител против FAS**

FAS-рецептор – это рецептор смерти на поверхности клеток, который приводит к запрограммированной гибели клеток (апоптозу) при сшивании рецептора лигандом Fas (Wajant et al., 2002, Science 296 (5573): 1635-6). FAS также известен как апоптозный антиген-1 (APO-1 или APT), кластер дифференцировки 95 (CD95) или представитель 6 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF6). Проводили анализ CDC у антител против FAS, содержащих тройную мутацию K326W/E333S/E430G, методом CDC *in vitro* на FAS-положительных В-лимфоцитах WIL2-S. Введение усиливающей гексамеризацию мутации E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S в различные антитела против FAS IgG1-FAS-E09, IgG1-CD95-APO1 и IgG1-CD95-HFE7A изучали при анализе CDC на клетках WIL2-S SF в основном, как описано в Примере 26. Вкратце, по 40 мкл клеток WIL2-S SF в среде RPMI-1640 ( $3,33 \times 10^6$  клеток/мл) преинкубировали в круглодонных 96-луночных планшетах ( $0,1 \times 10^6$  клеток на лунку) с 50 мкл серийных разведений антител (конечные концентрации от 0,003 до 10,0 мкг/мл в 3-кратных разведениях) 15 мин на качалке при комнатной температуре. Затем добавляли 20 мкл нормальной человеческой сыворотки в качестве

источника комплемента (конечная концентрация 20%) и инкубировали 45 мин при 37°C. Реакцию останавливали, помещая планшеты на лед. Лизис клеток определяли по окрашиванию йодидом пропидия. Образцы анализировали методом проточной цитометрии на iQue Screener. Данные после логарифмического преобразования по оси концентраций анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Все три антитела дикого типа против FAS: IgG1-FAS-E09 (фиг. 27A), IgG1-CD95-AP01 (фиг. 27B) и IgG1-CD95-HFE7A (фиг. 27C) не индуцировали CDC, как и антитело отрицательного контроля IgG1-b12. IgG1-FAS-E09 с усиливающей Fc-Fc мутацией (E430G) или с усиливающими связывание C1q мутациями (K326W/E333S) индуцировали CDC. Комбинация E430G с K326W/E333S в IgG1-FAS-E09 приводила к максимальному уровню CDC, аналогично IgG1-FAS-E09-E345R/E430G/S440Y. Такая же картина наблюдалась с IgG1-CD95-AP01, при этом IgG1-CD95-AP01-E430G индуцировало CDC, а IgG1-FAS-E09-K326W/E333S/E430G еще больше усиливало CDC. У антитела IgG1-CD95-HFE7A добавление мутации E430G не влияло на CDC, однако IgG1-CD95-HFE7A с тройной мутацией K326W/E333S/E430G полностью восстанавливало CDC до максимального уровня.

Для проверки того, что гибель клеток, наблюдавшаяся при описанном выше анализе CDC, была вызвана опосредованным компонентом лизисом, проводили анализ жизнеспособности на клетках WIL2-S SF в бессывороточной среде, в которую в качестве сшивающего агента добавляли очищенный C1q (Quidel). Анализ жизнеспособности проводили в основном, как описано в Примере 8. Вкратце, по 100 мкл клеток WIL2-S SF в бессывороточной среде вносили пипеткой в 96-луночные планшеты (50 000 клеток на лунку). Затем к клеткам добавляли по 50 мкл серийных разведений образцов антител (конечные концентрации от 0,0003 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и 10 мкл очищенного C1q (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и инкубировали 45 мин или 24 часа при 37°C. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли методом CellTiterGlo, как описано в Примере 2. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Данные после логарифмического преобразования по оси концентраций анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. На фиг. 28 представлены значения RLU (необработанные данные) у клеток после 45-минутной инкубации с антителами в присутствии 2,5 мкг/мл C1q. Ни одно из антител не влияло на жизнеспособность клеток после такого короткого периода инкубации.

Из фиг. 29А видно, что при 24-часовом анализе жизнеспособности введение одной лишь усиливающей гексамеризацию мутации E430G либо усиливающих связывание C1q мутаций K326W/E333S в антитело против FAS IgG1-FAS-E09 способно индуцировать зависимую от дозы гибель клеток WIL2-S SF в присутствии C1q, тогда как антитело дикого типа было неспособно вызвать гибель при исследованных концентрациях антитела. При объединении усиливающей Fc-Fc мутации E430G с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S в IgG1-FAS-E09 антитело становилось столь же эффективным, как с E345R/E430G/S440Y при 24-часовом анализе жизнеспособности в присутствии C1q. А из фиг. 29В видно, что и введение E430G или K326W/E333S/E430G в антитело IgG1-CD95-AP01 приводило к зависимой от дозы гибели клеток WIL2-S SF в присутствии C1q, причем тройной мутант K326W/E333S/E430G оказался самым эффективным. Из фиг. 29С видно, что для индукции ингибирования пролиферации в присутствии C1q у IgG1-CD95-HFA7E требуется сочетание усиления связывания C1q и усиления Fc-Fc (K326W/E333S/E430G).

В качестве контрольного эксперимента также проводили 24-часовой анализ жизнеспособности на клетках WIL2-S SF без C1q. Из фиг. 30А видно, что введение усиливающих гексамеризацию мутаций E345R/E430G/S440Y в антитело против FAS IgG1-FAS-E09 способно индуцировать зависимую от дозы гибель клеток WIL2-S SF независимо от C1q, тогда как антитело дикого типа и варианты антитела только с усиливающей Fc-Fc мутацией E430G либо с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S были неспособны вызвать гибель при исследованных концентрациях антитела в отсутствие C1q. Однако введение усиливающих Fc-Fc мутаций вместе с усиливающими связывание C1q мутациями (IgG1-FAS-E09-K326W/E333S/E430G) приводило к потере жизнеспособности клеток до 25% в отсутствие C1q. В отсутствие C1q введение K326W/E333S/E430G давало такой же эффект для IgG1-CD95-AP01 (фиг. 30В), но не влияло на IgG1-CD95-HFA7E (фиг. 30С).

Итак, комбинирование усиливающей Fc-Fc мутации E430G с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S в антителах против FAS может индуцировать CDC у клеток WIL2-S SF через 45 мин. Этот процесс полностью зависел от сыворотки, так как C1q сам по себе не вызывал гибели клеток через 45 мин. Однако через 24 часа инкубация антител против FAS с мутацией K326W/E333S/E430G в присутствии C1q действительно вызывала гибель, которая превосходила эффективность уничтожения у мутантов E430G и K326W/E333S.

**Пример 29. Влияние комбинации усиливающей Fc-Fc мутации E430G с мутациями K326W/E333S на активацию OX40 на клетках Jurkat антителами против**

**OX40**

Перекрестное сшивание рецепторов OX40 (CD134) под действием лиганда OX40 (OX40L) может индуцировать пролиферацию Т-клеток, экспрессирующих OX40 (Gramaglia et al., 1998, J. Immunol. 161, 6510-6517). Проверляли влияние мутаций K326W/E333S на сигнализацию OX40, используя различные варианты антитела против OX40 IgG1-SF2 с помощью набора для биоанализа OX40 Bioassay Kit (Promega, кат. № CS197704), в основном в соответствии с инструкциями от производителя. Клетки Jurkat Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/OX40 (Promega, кат. № CS197704), которые стабильно экспрессируют OX40 человека и репортерный ген люциферазы по нисходящей от элемента ответа NFAT, экспрессируют люциферазу после активации OX40. По 25 мкл свежееоттаявших клеток инкубировали в течение ночи в белых 96-луночных планшетах с F-образным дном Optiplate (Perkin Elmer, кат. № 6005299) в 25 мкл среды RPMI 1640 (Promega, кат. № G708A) в присутствии 8% фетальной телячьей сыворотки (FBS; Promega, кат. № J121A). На следующий день к клеткам в среде добавляли серийные разведения антител (конечные концентрации от 19,5 до 5000 нг/мл в 4-кратных разведениях) до конечного объема 80 мкл. Клетки инкубировали еще 5 часов, а затем добавляли реагент Bio-Glo (Promega, кат. № CS197704). После инкубации 5-10 мин при окружающей температуре регистрировали люминесценцию на считывающем устройстве Envision MultiLabel Plate reader. Из фиг. 31 видно, что антитело дикого типа против OX40 IgG1-CD134-SF2 не вызывало ответа OX40. Введение усиливающей Fc-Fc мутации E345R приводило к сильной индукции, а E430G – к слабой индукции ответа OX40. Комбинирование усиливающей Fc-Fc мутации E430G с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S приводило к сильной агонистической активности IgG1-SF2.

**Пример 30. Влияние мутаций K326W/E333S/E430G на активацию CD40 на клетках U20S антителами против CD40 в присутствии фетальной телячьей сыворотки**

Перекрестное сшивание рецепторов CD40, находящихся на антигенпрезентирующих клетках, под действием лиганда CD40 на ТН-клетках может вызывать различные нисходящие эффекты (Chatzigeorgiou et al., 2009, BioFactors (Oxford, England) 35(6): 474-83). Проверляли влияние мутаций K326W/E333S/E430G на сигнализацию CD40, используя различные варианты антител против CD40 SGN40 и CP870893 с помощью набора для биоанализа CD40 Bioassay Kit (Promega, кат. № CS1979A06), в основном в соответствии с инструкциями от производителя. Клетки Jurkat Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2P/U20S, которые стабильно экспрессируют CD40

человека и репортерный ген люциферазы по нисходящей от элемента ответа NFAT, экспрессируют люциферазу после активации CD40. По 25 мкл свежееоттаявших клеток инкубировали в течение ночи в 96-луночных белых планшетах с F-образным дном Optiplate (Perkin Elmer, кат. № 6005299) в 25 мкл среды RPMI 1640 (Promega, кат. № G708A) в присутствии 8% фетальной телячьей сыворотки (J121A). На следующий день к клеткам в среде добавляли серийные разведения антител или очищенного рекомбинантного лиганда CD40 (R&D Systems, кат. № 6420-CL-025/CF) до конечного объема 80 мкл. Клетки инкубировали еще 5 часов, а затем добавляли реагент Bio-Glo (Promega, кат. № CS197704). После инкубации 5-10 мин при окружающей температуре регистрировали люминесценцию на считывающем устройстве Envision MultiLabel Plate reader. В качестве источника сыворотки использовали фетальную телячью сыворотку (FBS; Promega, кат. № J121A). Антитела тестировали в серийных разведениях в диапазоне от 0,1 до 25 000 нг/мл. Рекомбинантный лиганд CD40 (серийные разведения от 0,04 до 10 000 нг/мл), который использовался в качестве положительного контроля при анализе ответа CD40, индуцировал четкие сигналы ответа относительно не связывающегося антитела отрицательного контроля IgG1-b12 (фиг. 32). Антитело против CD40 IgG1-SGN40 дикого типа индуцировало ответы CD40 на уровне, в основном близком антителу отрицательного контроля IgG1-b12. Напротив, вариант IgG1-CD40-SGN40, содержащий только мутацию E430G, которая индуцирует взаимодействия Fc-Fc между антителами после связывания на клеточной поверхности, индуцировал ответы CD40 ( $EC_{50} = 336,4 \pm 15,3$  нг/мл). Вариант IgG1-CD40-SGN40 с усиливающей Fc-Fc мутацией E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S еще больше повышал эффективность IgG1-SGN40 ( $EC_{50} = 18,0 \pm 1,1$  нг/мл). Антитело IgG1-CD40-CP870893 дикого типа тоже способно индуцировать ответ CD40 ( $EC_{50} = 187,4 \pm 9,2$  нг/мл), который еще усиливается при K326W/E333S/E430G ( $EC_{50} = 45,9 \pm 3,3$  нг/мл) до уровня, близкого лиганду CD40.

Итак, мутации K326W/E333S/E430G усиливают активацию CD40 на клетках U20S антителами против CD40 в присутствии фетальной телячьей сыворотки.

**Таблица 7.** Значения  $EC_{50}$  и SD у лиганда CD40 и антител IgG1-CD40 и их вариантов

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

**Пример 31. Влияние мутаций K326W/E333S/E430G на активацию 4-1BB (CD137) на клетках Jurkat антителами против 4-1BB в присутствии фетальной телячьей сыворотки**

4-1BB или CD137 или представитель 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF9) является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR) и индуцируется при активации лимфоцитов (ILA) (Schwarz et al., 1993, Gene 134(2): 295-8). Перекрестное сшивание 4-1BB усиливает пролиферацию, секрецию IL-2, выживаемость и цитолитическую активность Т-клеток (Sica et al., 2000, Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 47(5): 275-9). Проверяли влияние мутаций K326W/E333S/E430G на сигнализацию 4-1BB, используя различные варианты антител против 4-1BB MOR7480 и BMS-663513 с помощью набора для биоанализа 4-1BB Bioassay Kit (Promega, кат. № CS196005), в основном в соответствии с инструкциями от производителя. Клетки Jurkat Thaw-and-Use GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB, которые стабильно экспрессируют 4-1BB человека и репортерный ген люциферазы по нисходящей от элемента ответа NFAT, экспрессируют люциферазу после активации 4-1BB. По 25 мкл свежееоттаявших клеток инкубировали в течение ночи в 96-луночных белых планшетах с F-образным дном Optiplate (Perkin Elmer, кат. № 6005299) в 25 мкл среды RPMI 1640 (Promega, кат. № G708A) в присутствии 1% фетальной телячьей сыворотки (J121A). На следующий день к клеткам в среде добавляли серийные разведения антител или очищенного рекомбинантного лиганда 4-1BB с His-меткой (R&D Systems, 2295-4L-025/CF) для антитела против His-метки (клон J099B12) до конечного объема 80 мкл. Клетки инкубировали еще 5 часов, а затем добавляли реагент Bio-Glo (Promega, кат. № CS197704). После инкубации 5-10 мин при окружающей температуре регистрировали люминесценцию на считывающем устройстве Envision MultiLabel Plate reader. В качестве источника сыворотки использовали фетальную телячью сыворотку (FBS; Promega, кат. № J121A). Рекомбинантный лиганд 4-1BB и Ab против His, которые использовались в качестве положительного контроля при анализе ответа 4-1BB, индуцировали четкие сигналы ответа относительно не связывающегося антитела отрицательного контроля IgG1-b12-WSG (фиг. 33). Исследуемые антитела, содержащие усиливающую Fc-Fc мутацию E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S, индуцировали дозозависимую активацию сигнализации 4-1BB на клетках Jurkat в присутствии фетальной телячьей сыворотки ( $EC_{50} = 16,9$  нг/мл для IgG1-CD137-MOR7480-K326W/E333S/E430G и  $EC_{50} = 32,9$  нг/мл для IgG1-BMS-663513-K326W/E333S/E430G).

**Пример 32. Влияние мутаций K326W/E333S/E430G на активацию G1TR на**

### **клетках Jurkat антителами против GITR в присутствии фетальной телячьей сыворотки**

GITR (индуцируемый глюкокортикоидами родственный TNFR белок) или представитель 18 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF18) является членом суперсемейства TNFR. GITR активируется лигандом GITR (GITRL), который в основном экспрессируется на APC. Взаимодействие GITR в Т-клетках с агонистическими антителами, рекомбинантным GITRL или трансфектантами GITRL после субоптимальной стимуляции TCR усиливает активацию Т-клеток посредством повышающей регуляции CD25, индукции экспрессии IL-2 и IFN $\gamma$  и усиления пролиферации (см. обзор Knee et al. в Eur. J. Cancer, 2016 Nov, 67: 1-10).

Проверяли влияние мутаций K326W/E333S/E430G на сигнализацию GITR, используя различные варианты антитела против GITR INCAGN01876 с помощью набора для биоанализа GITR Bioassay Kit (Promega, кат. № CS184006), в основном в соответствии с инструкциями от производителя. Клетки Jurkat Thaw-and-Use GloResponse NF $\kappa$ B-luc2P/GITR, которые стабильно экспрессируют GITR человека и репортерный ген люциферазы по нисходящей от элемента ответа NFAT, экспрессируют люциферазу после активации GITR. По 25 мкл свежееоттаявших клеток инкубировали в течение ночи в 96-луночных белых планшетах с F-образным дном Optiplate (Perkin Elmer, кат. № 6005299) в 25 мкл среды RPMI 1640 (Promega, кат. № G708A) в присутствии 8% фетальной телячьей сыворотки (J1211). На следующий день к клеткам в среде добавляли серийные разведения антител до конечного объема 80 мкл. Клетки инкубировали еще 5 часов, а затем добавляли реагент Bio-Glo (Promega, кат. № CS197704). После инкубации 5-10 мин при окружающей температуре регистрировали люминесценцию на считывающем устройстве Envision MultiLabel Plate reader. В качестве источника сыворотки использовали фетальную телячью сыворотку (FBS; Promega, кат. № J121A). Несвязывающееся антитело отрицательного контроля IgG1-b12 определяет фоновый сигнал. Антитело дикого типа против GITR IgG1-GITR-INCAGN01876 индуцировало ответы GITR на уровне чуть выше антитела отрицательного контроля IgG1-b12 (фиг. 34). Напротив, вариант IgG1-GITR-INCAGN01876, содержащий только усиливающую Fc-Fc мутацию E430G, вызывал более сильный ответ GITR. IgG1-GITR-INCAGN01876 с усиливающей Fc-Fc мутацией E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S еще больше усиливал активность IgG1-GITR-INCAGN01876.

Итак, мутации K326W/E333S/E430G усиливают активацию GITR на клетках Jurkat антителом против GITR в присутствии фетальной телячьей сыворотки.

**Пример 33. Влияние мутаций K326W/E333S/E430G на активацию GITR на**

**клетках Jurkat антителами против GITR различных подклассов IgG в присутствии фетальной телячьей сыворотки**

Проверяли влияние мутаций K326W/E333S/E430G на сигнализацию GITR, используя различные варианты антитела против GITR 36E5 подклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 с помощью набора для биоанализа GITR Bioassay Kit, как описано в примере 32, в присутствии фетальной телячьей сыворотки. Антитела тестировали при конечной концентрации 111 нг/мл. Антитело IgG1 дикого типа против GITR IgG1-GITR-36E5 индуцировало слабый ответ агониста GITR по сравнению с несвязывающимся контрольным IgG1-b12 (фиг. 35). Введение усиливающей Fc-Fc мутации E430G, приводило к умеренному повышению ответа агониста GITR. Вариант IgG1-GITR-36E5 с усиливающей Fc-Fc мутацией E430G в сочетании с усиливающими связывание C1q мутациями K326W/E333S еще больше усиливал активность антитела до максимального уровня. Введение K326W/E333S/E430G в IgG2-GITR-36E5 подкласса IgG2 приводило к умеренной реакции агониста GITR. Введение мутаций K326W/E333S/E430G в IgG3-GITR-36E5 и IgG4-GITR-36E5 приводило к слабым ответам агониста GITR на уровне, близком антителу IgG1 дикого типа (WT).

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина и антигенсвязывающий участок, причем Fc-область включает:
  - a. замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и
  - b. замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем эти положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.
2. Полипептид по п. 1, при этом полипептид содержит замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.
3. Полипептид по п. 1 или 2, при этом полипептид включает:
  - i) замену в двух или трех положениях, выбранных из группы, состоящей из K326, E333 и P396, или
  - ii) замены в трех положениях S267, H268 и S324.
4. Полипептид по п. 1 или 2 при условии, что замена в положении G236 не представлена G236F, G236R, G236Y.
5. Полипептид по п. 1 или 2 при условии, что замена в положении S267 не представлена S267H, S267I, S267K, S267G.
6. Полипептид по п. 1 или 2 при условии, что замена в положении H268 не представлена H268K, H268D, H268E.
7. Полипептид по п. 1, содержащий по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W.
8. Полипептид по п. 1 или 7, содержащий по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T.
9. Полипептид по п. 1 или 7, содержащий по меньшей мере одну замену, выбранную из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y.
10. Полипептид по любому из п.п. 1, 7-8, содержащий по меньшей мере замену E430G.
11. Полипептид по любому из п.п. 1, 7, 9, содержащий по меньшей мере замену E345K.
12. Полипептид по любому из п.п. 1, 7, содержащий по меньшей мере замену S440Y.
13. Полипептид по любому из п.п. 1-7, 8, 10, при этом по меньшей мере одна

замена выбрана из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T, и полипептид содержит замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

14. Полипептид по любому из п.п. 1-7, 9, 11, при этом по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y, и полипептид содержит замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

15. Полипептид по любому из п.п. 1-7, 12, при этом по меньшей мере одна замена выбрана из группы, состоящей из S440Y и S440W, и полипептид содержит замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

16. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 13-15, содержащий замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из K326, E333 и P396.

17. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 13-16, содержащий замену в одном или нескольких положениях типа двух или трех положений, выбранных из группы, состоящей из K326, E333 и P396.

18. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 13-17, содержащий замены в положениях K326 и E333.

19. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 13-18, содержащий замены в положениях K326, E333 и P396.

20. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 13-19, содержащий одну или несколько типа двух или трех замен, выбранных из группы, состоящей из K326W, K326A, E333S, E333T, E333A и P396L.

21. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 13-20, содержащий замены K326W и E333S.

22. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 13-20, содержащий замены K326W и E333T.

23. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 13-20, содержащий замены K326A и E333A.

24. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 13-20, содержащий замены K326A, E333A и P396L.

25. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 13-20, содержащий замены K326W, E333S и P396L.

26. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 13-20, содержащий замены K326W, E333T и P396L.

27. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 5-6, 13-15, содержащий замену в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из S267, H268 и S324.

28. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 5-6, 13-15, 27, содержащий одну или

несколько типа двух или трех замен, выбранных из группы, состоящей из S267E, H268F и S324T.

29. Полипептид по любому из п.п. 1-3, 5-6, 13-15, 27-28, содержащий замены S267E, H268F и S324T.

30. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, содержащий Fc-область иммуноглобулина человека и антигенсвязывающий участок, причем Fc-область включает:

a. замену в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замену S440Y или S440W, и

b. замену, выбранную из одной из следующей группы, состоящей из:

- i. K326W,
- ii. K326A,
- iii. E333S,
- iv. E333T,
- v. E333A,
- vi. P396L,
- vii. K326W, E333S,
- viii. K326W, E333T,
- ix. K326W, E333S, P396L,
- x. K326A, E333A,
- xi. K326A, K333A, P396L,
- xii. K326A, K333T, P396L,
- xiii. S267E, H268F,
- xiv. S267E, S324T,
- xv. H268F, S324T,
- xvi. S267E, H268F, S324T,
- xvii. G236A, S267E, H268F, S324T.

31. Полипептид по п. 30, дополнительно содержащий одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из G236A, S239D и I332E.

32. Полипептид по п. 30 или 31, дополнительно содержащий по меньшей мере две замены, выбранные из группы, состоящей из:

- a. G236A, I332E,
- b. S239D, I332E.

33. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, содержащий одну или несколько дополнительных замен в Fc-области.

34. Полипептид по п. 33, содержащий дополнительную замену в Fc-области,

соответствующую положению K439 или S440, при условии, что мутация в S440 не представлена S440Y или S440W.

35. Полипептид по п. 33 или 34, при этом дополнительная замена представлена K439E или S440K.

36. Полипептид по п. 33 или 34, содержащий дополнительную замену в Fc-области, соответствующую положению F405 или K409.

37. Полипептид по п. 31 - 35, при этом дополнительная замена представлена F405L или K409R.

38. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, при этом полипептид представляет собой антитело, моноспецифичное антитело, биспецифичное антитело или мультиспецифичное антитело.

39. Полипептид по п. 38, при этом полипептид представляет собой биспецифичное антитело, содержащее Fc-область, содержащую первую тяжелую цепь и первый участок связывания антигена, вторую тяжелую цепь и второй участок связывания антигена, причем:

а. первая тяжелая цепь содержит дополнительную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из K409, F405, T366, L368, K370, D399, Y407,

б. вторая тяжелая цепь содержит дополнительную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из K409, F405, T366, L368, K370, D399, Y407,

с. причем дополнительные замены в первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи находятся не в одном и том же положении.

40. Полипептид по п. 39, при этом первая тяжелая цепь содержит замену в положении, выбранном из числа K409 и F405, и вторая тяжелая цепь содержит замену в положении, выбранном из числа K409 и F405, причем замены в первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи находятся не в одном и том же положении.

41. Полипептид по любому из п.п. 38-40, при этом первая тяжелая цепь содержит замену K409R или F405L и вторая тяжелая цепь содержит замену K409R или F405L, причем замены в первой Fc-области и второй Fc-области не одинаковы.

42. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, при этом Fc-область представлена изотипом IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM, IgA человека или смешанным изотипом.

43. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, при этом Fc-область представлена изотипом IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека или смешанным изотипом.

44. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, при этом Fc-область представлена изотипом IgG1 человека.

45. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, при этом полипептид представляет собой человеческое антитело, гуманизованное антитело или химерное антитело.

46. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок связывается с представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR-SF) или суперсемейства связанных с G-белком рецепторов (GPCR).

47. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок связывается с представителем TNFR-SF, выбранным из группы, состоящей из FAS, DR4, DR5, TNFR1, DR6, DR3, EDAR, NGFR, OX40, CD40, CD30, CD27, 4-1BB, RANK, TACI, BlySR, BCMA, RELT и GITR.

48. Способ повышения агонистической активности полипептида, содержащего Fc-область IgG человека и антигенсвязывающий участок, который включает:

a. введение замены в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замены S440Y или S440W, и

b. введение замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

49. Способ повышения активности CDC у полипептида, содержащего Fc-область IgG человека и антигенсвязывающий участок, который включает:

a. введение замены в положении, выбранном из группы, состоящей из E430, E345, либо замены S440Y или S440W, и

b. введение замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396, причем положения соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

50. Способ по п. 48 или 49 при условии, что замена в положении G236 не представлена G236F, G236R, G236Y.

51. Способ по п. 48 или 49 при условии, что замена в положении S267 не представлена S267H, S267I, S267K, S267G.

52. Способ по п. 48 или 49 при условии, что замена в положении H268 не представлена H268K, H268D, H268E.

53. Способ по любому из п.п. 48-52, при этом способ включает введение одной замены, выбранной из группы, состоящей из E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y.

54. Способ по любому из п.п. 48-53, при этом способ включает введение одной

замены, выбранной из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T.

55. Способ по любому из п.п. 48-53, при этом способ включает введение одной замены, выбранной из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y.

56. Способ по любому из п.п. 48-54, при этом способ включает введение одной замены E430G.

57. Способ по любому из п.п. 48-53 и 55, при этом способ включает введение одной замены E345K.

58. Способ по любому из п.п. 48-52, при этом способ включает введение одной замены S440Y.

59. Способ по любому из п.п. 48-54 и 56, при этом способ включает введение замены, выбранной из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T, и замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

60. Способ по любому из п.п. 48-53, 55 и 57, при этом способ включает введение замены, выбранной из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R, E345Y, и замены в одном или нескольких положениях, выбранных из числа G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

61. Способ по любому из п.п. 48-52 и 58, при этом способ включает введение замены, выбранной из группы, состоящей из S440Y и S440W, и замены в одном или нескольких положениях, выбранных из числа G236, S239, S267, H268, S324, K326, I332, E333 и P396.

62. Способ по любому из п.п. 48-61, при этом способ включает введение замены в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из K326, E333 и P396.

63. Способ по любому из п.п. 48-62, при этом способ включает введение замены в двух или трех положениях, выбранных из группы, состоящей из K326, E333 и P396.

64. Способ по любому из п.п. 48-63, при этом способ включает введение замены в положениях K326 и E333.

65. Способ по любому из п.п. 48-64, при этом способ включает введение замены в положениях K326, E333 и P396.

66. Способ по любому из п.п. 48-65, при этом способ включает введение одной или нескольких замен типа двух или трех замен, выбранных из группы, состоящей из K326A, K326W, E333S, E333T, E333A и P396L.

67. Способ по любому из п.п. 48-66, при этом способ включает введение замен K326W и E333S.

68. Способ по любому из п.п. 48-66, при этом способ включает введение замен K326W и E333T.

69. Способ по любому из п.п. 48-66, при этом способ включает введение замен K326A и E333A.

70. Способ по любому из п.п. 48-66, при этом способ включает введение замен K326A, E333A и P396L.

71. Способ по любому из п.п. 48-66, при этом способ включает введение замен K326W, E333S и P396L или K326W, E333T и P396L.

72. Способ по любому из п.п. 48-61, при этом способ включает введение одной или нескольких замен в положении, выбранном из группы, состоящей из S267, H268 и S324.

73. Способ по любому из п.п. 48-61 и 72, при этом способ включает введение одной или нескольких замен, выбранных из группы, состоящей из S267E, H268F и S324T.

74. Способ по любому из п.п. 48-61 и 72-73, при этом способ включает введение замен S267E, H268F и S324T.

75. Способ по любому из п.п. 48-74, при этом способ включает введение одной или нескольких дополнительных замен в Fc-области.

76. Способ по любому из п.п. 48-75, при этом способ включает введение дополнительной замены в Fc-области, которая представлена K439E или S440K.

77. Способ по любому из п.п. 48-76, при этом способ включает введение дополнительной замены в Fc-области, соответствующей положению F405 или K409.

78. Способ по любому из п.п. 48-77, при этом способ включает введение дополнительной замены в Fc-области, которая представлена F405L или K409R.

79. Композиция, содержащая по меньшей мере один полипептид по любому из п.п. 1-78.

80. Композиция по п. 79, содержащая одно или несколько антител по любому из п.п. 1-45.

81. Композиция по п. 79 или 80, которая содержит первый полипептид и второй полипептид по любому из п.п. 1-47.

82. Композиция по любому из п.п. 79-81, при этом первый полипептид и второй полипептид связываются с разными эпитопами.

83. Композиция по любому из п.п. 79-82, при этом первый полипептид и второй полипептид связываются с разными антигенами.

84. Композиция по любому из п.п. 79-83, при этом первый полипептид и второй полипептид присутствуют в композиции в молярном соотношении от примерно 1:50 до примерно 50:1, как-то в молярном соотношении примерно 1:1, примерно 1:2, примерно

1:3, примерно 1:4, примерно 1:5, примерно 1:6, примерно 1:7, примерно 1:8, примерно 1:9, примерно 1:10, примерно 1:15, примерно 1:20, примерно 1:25, примерно 1:30, примерно 1:35, примерно 1:40, примерно 1:45, примерно 1:50, в соотношении примерно 50:1, примерно 45:1, примерно 40:1, примерно 35:1, примерно 30:1, примерно 25:1, примерно 20:1, примерно 15:1, примерно 10:1, примерно 9:1, примерно 8:1, примерно 7:1, примерно 6:1, примерно 5:1, примерно 4:1, примерно 3:1, примерно 2:1.

85. Композиция по любому из п.п. 79-84, при этом первый полипептид и второй полипептид и/или любой дополнительный полипептид присутствуют в композиции в эквимолярном соотношении.

86. Композиция по любому из п.п. 79-85, при этом композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

87. Полипептид по любому из п.п. 1-47 или композиция по любому из п.п. 79-86 для применения в качестве лекарственного средства.

88. Полипептид по любому из п.п. 1-47 или композиция по любому из п.п. 79-86 для применения при лечении рака, аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний или инфекционных заболеваний.

89. Способ лечения индивида с заболеваниями, включающий введение данному индивиду эффективного количества полипептида или композиции по любому из предыдущих пунктов.

90. Способ по любому из п.п. 48-78, при этом заболевание выбрано из группы раковых, аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и инфекционных заболеваний.

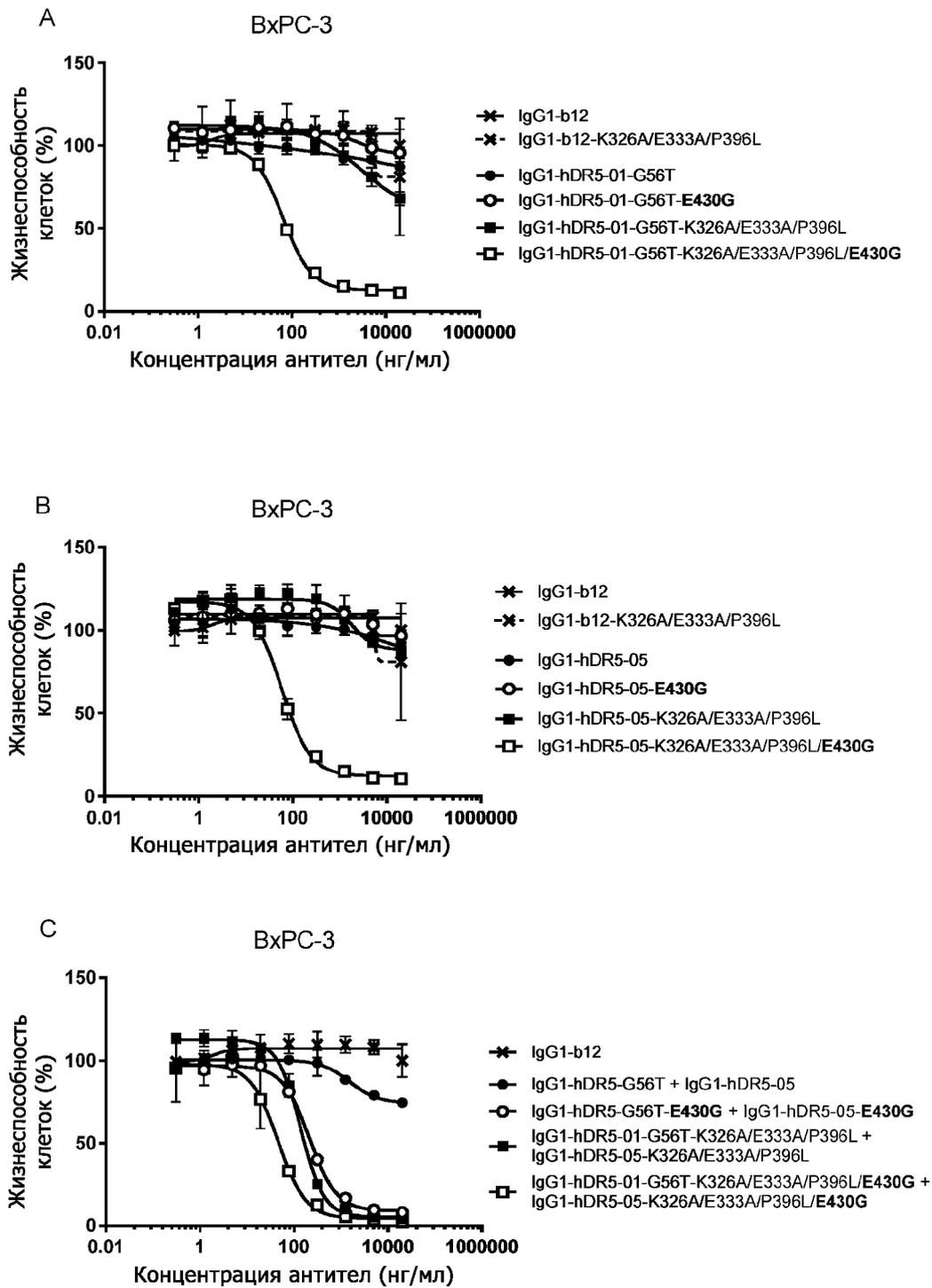
91. Способ по любому из п.п. 48-78, также включающий введение дополнительного терапевтического средства.

92. Набор, содержащий полипептид или композицию по любому из предыдущих пунктов, причем данный полипептид или композиция находится в одном или нескольких контейнерах типа флаконов.

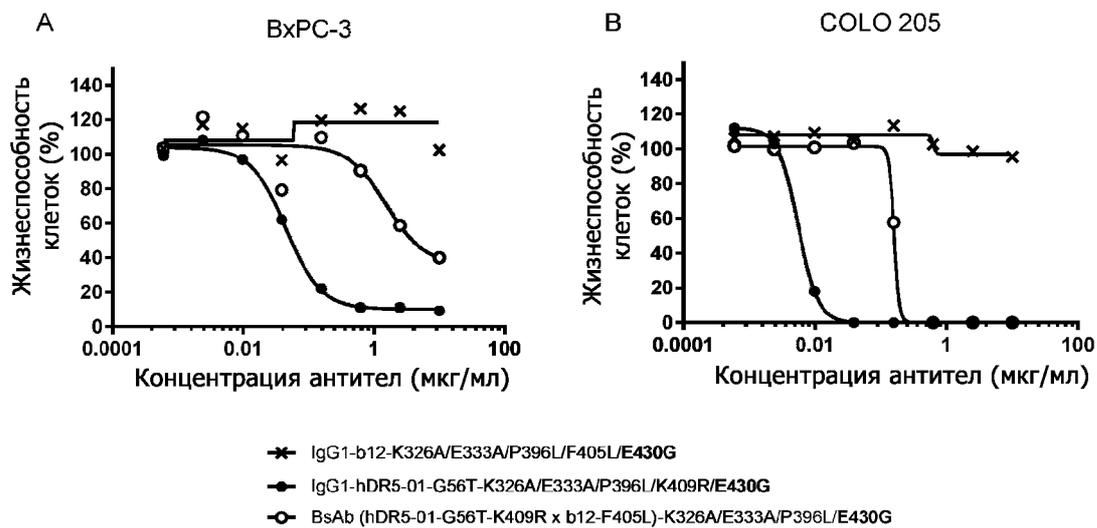
93. Набор по п. 92, при этом полипептид или композиция по любому из предыдущих пунктов предназначена для одновременного, раздельного или последовательного применения в терапии.

94. Применение полипептида или композиции по любому из предыдущих пунктов 1-47 или 79-86 для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания.

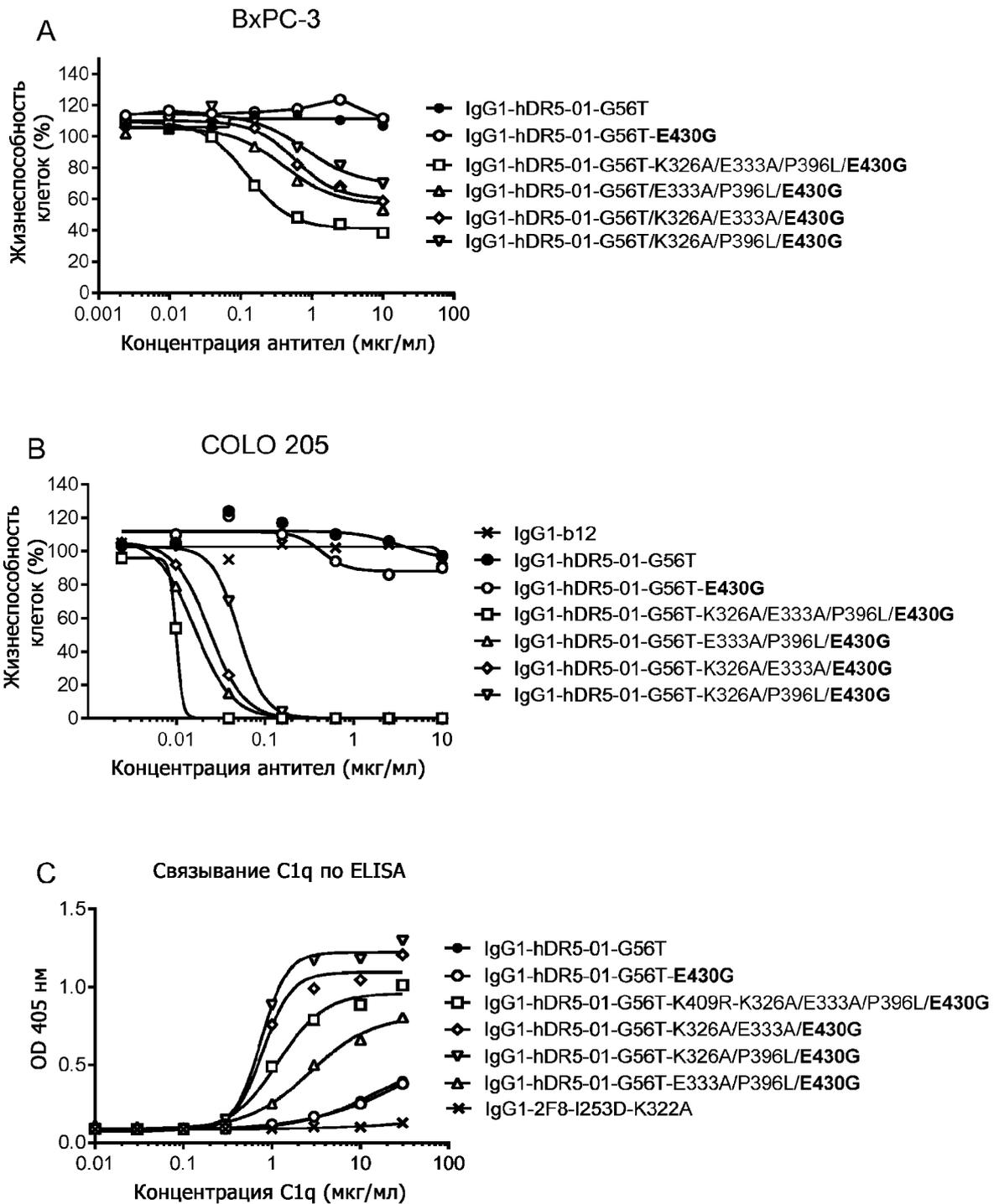
95. Применение по п. 94, при этом заболевание представляет собой раковое, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.



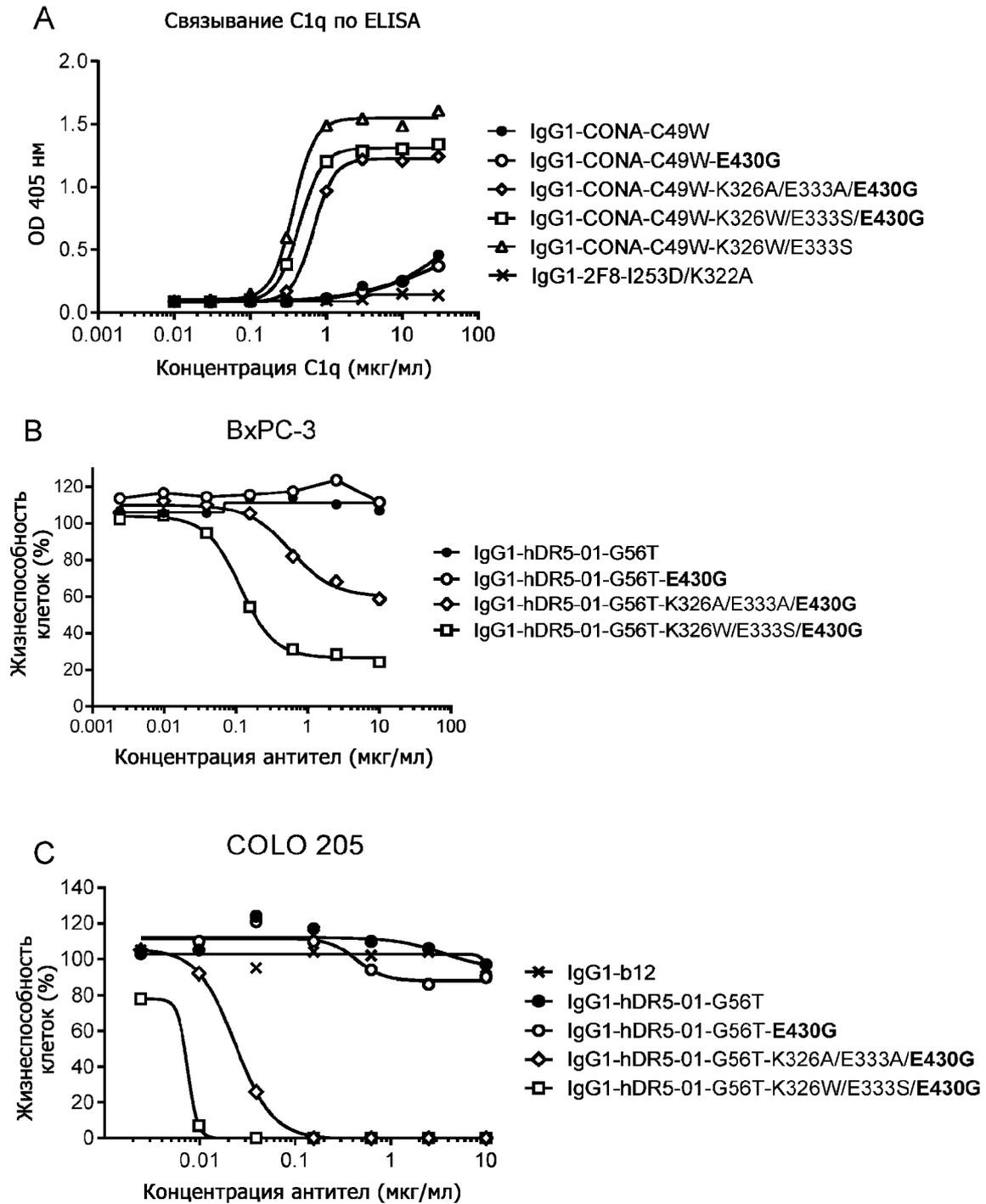
Фиг. 1



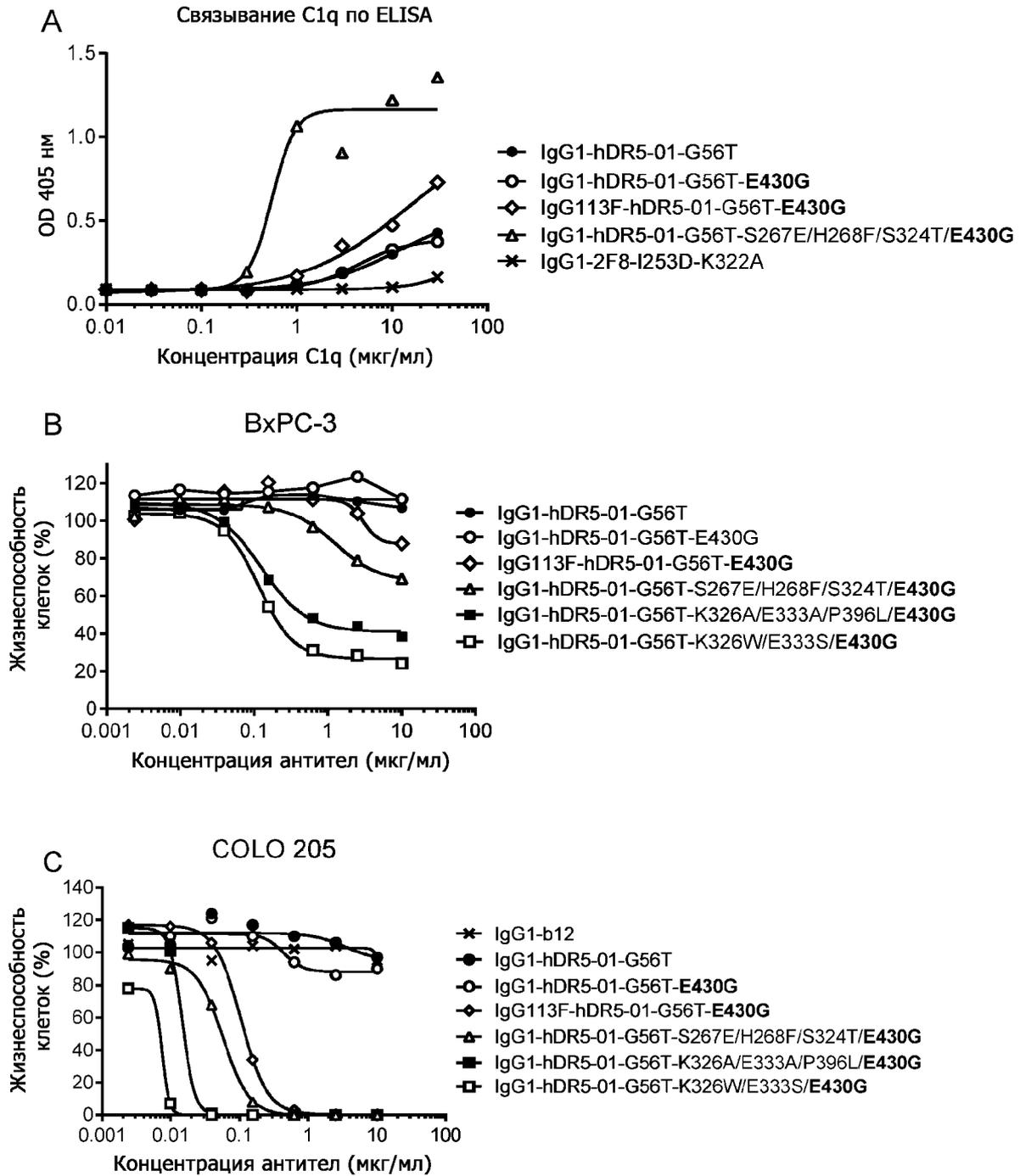
Фиг. 2



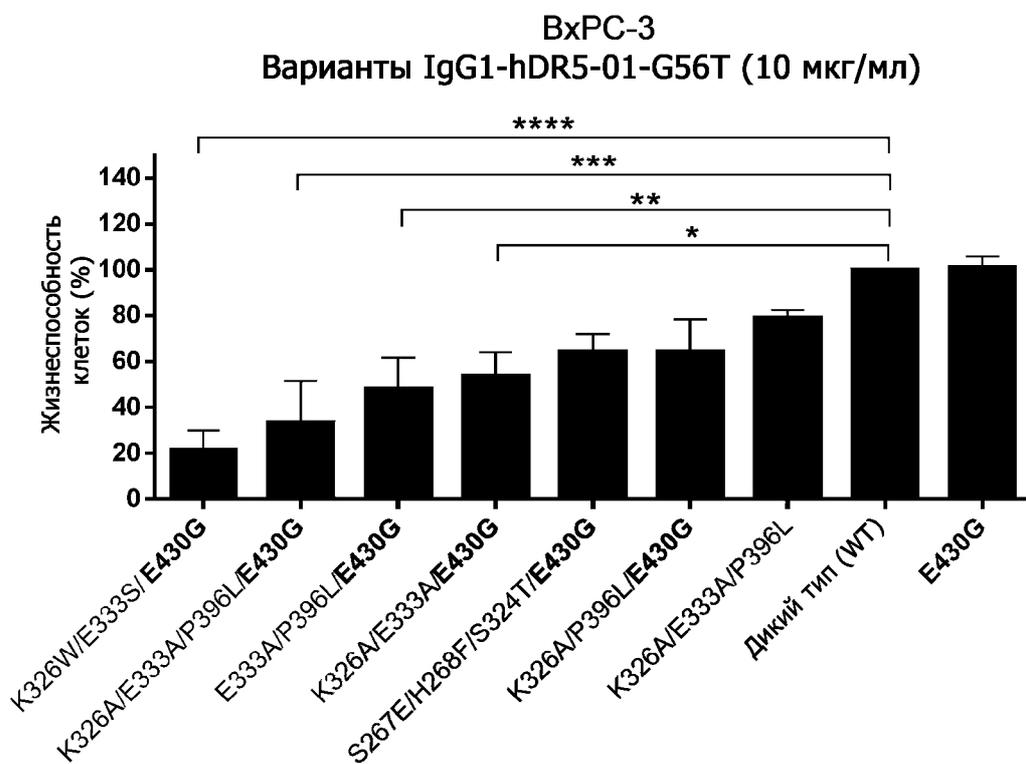
ФИГ. 3

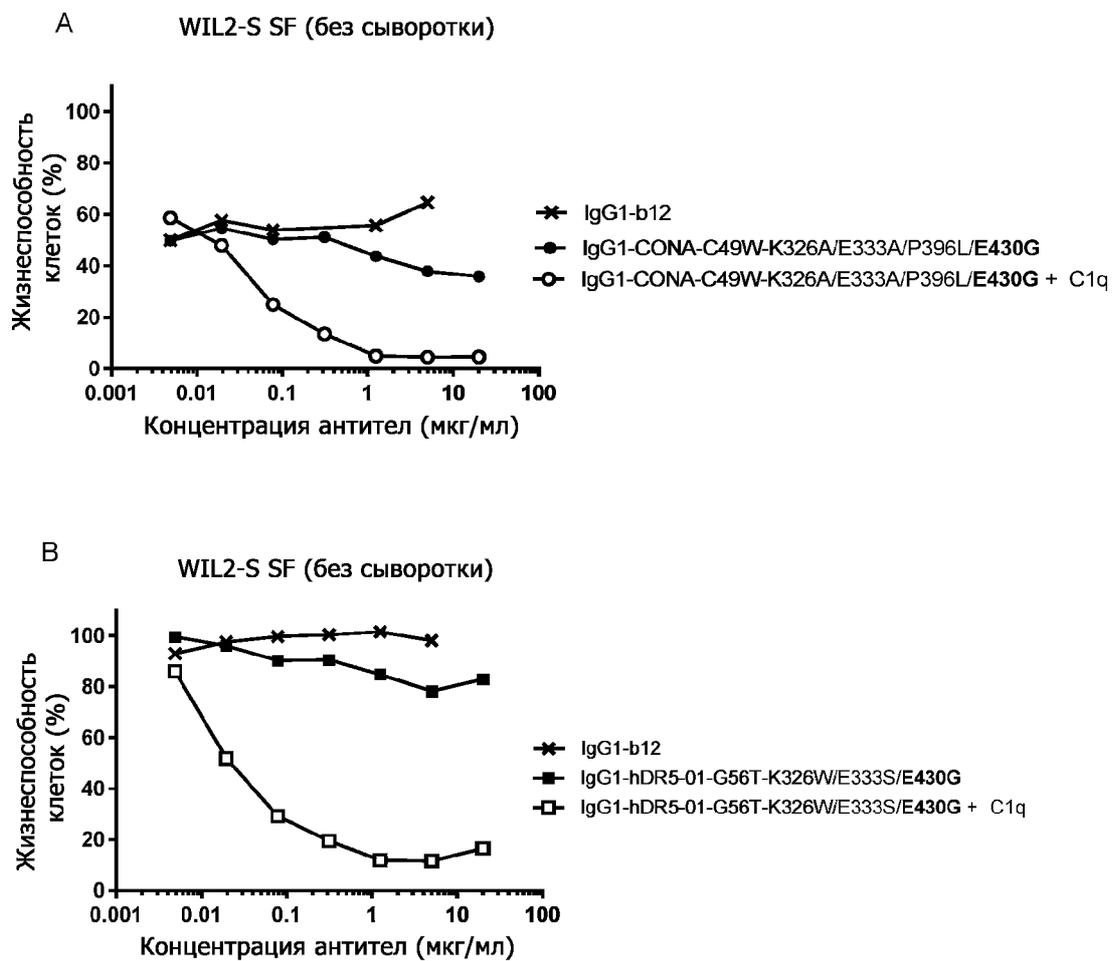


Фиг. 4

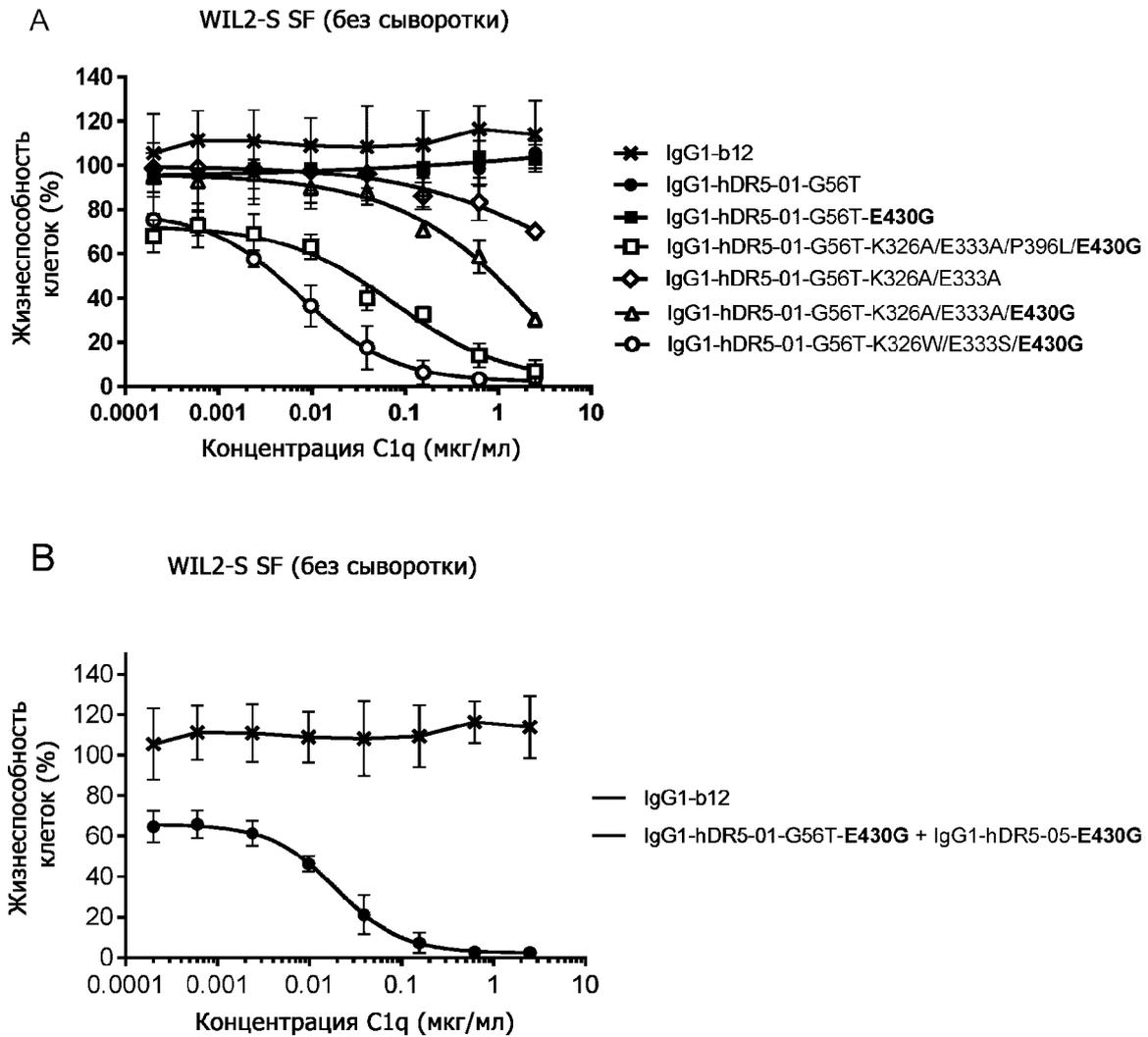


Фиг. 5

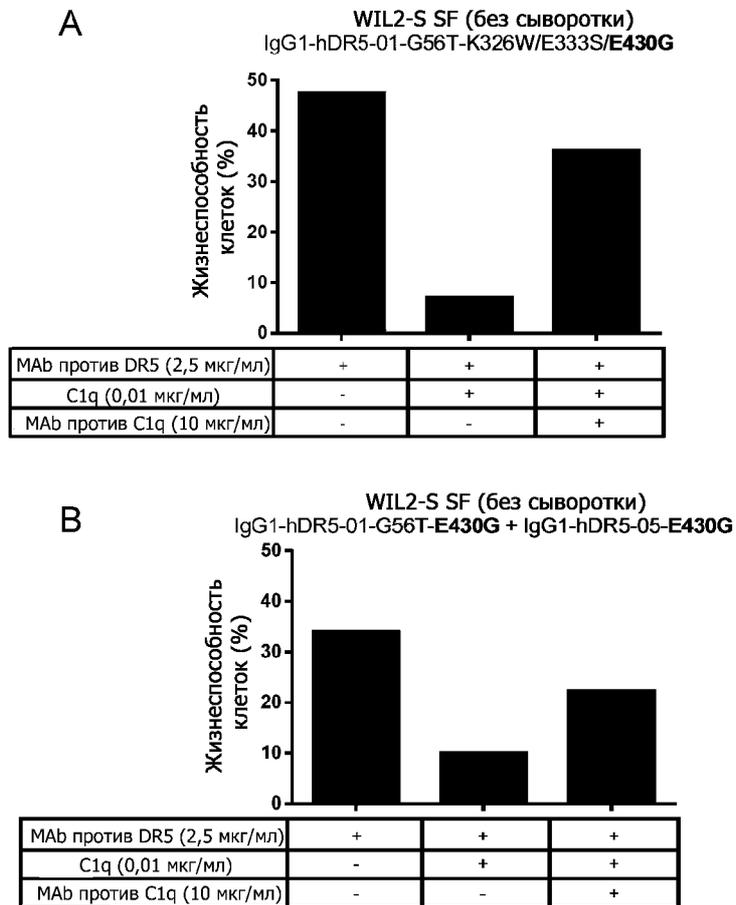
**Фиг. 6**



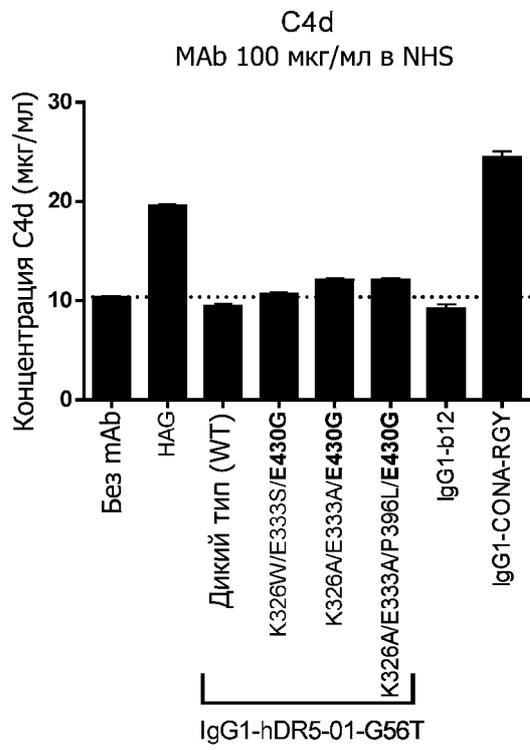
Фиг. 7



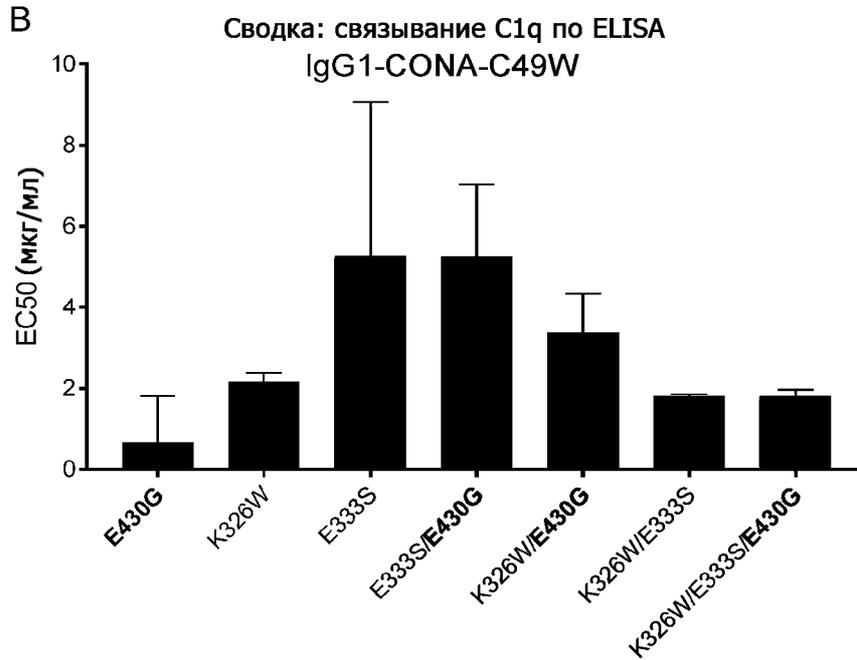
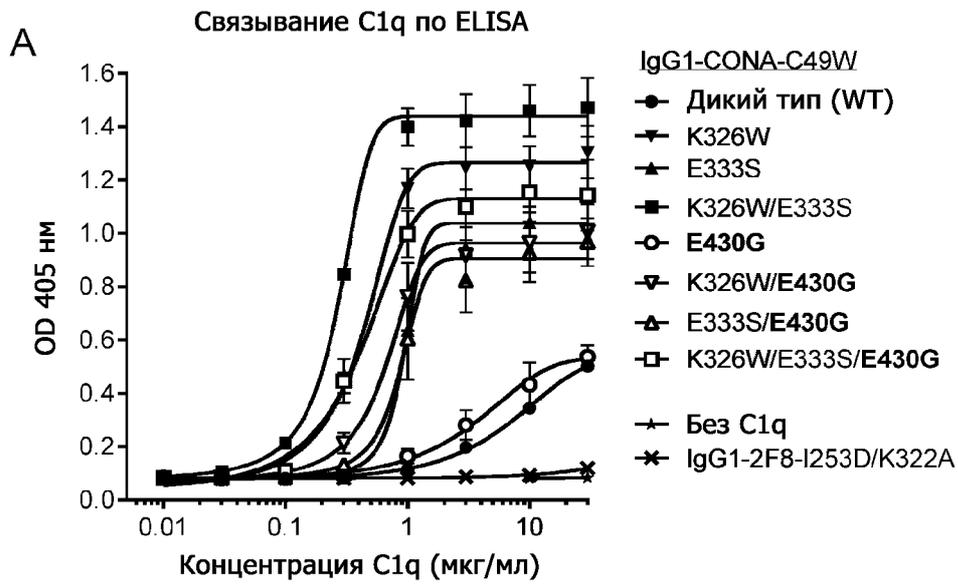
Фиг. 8



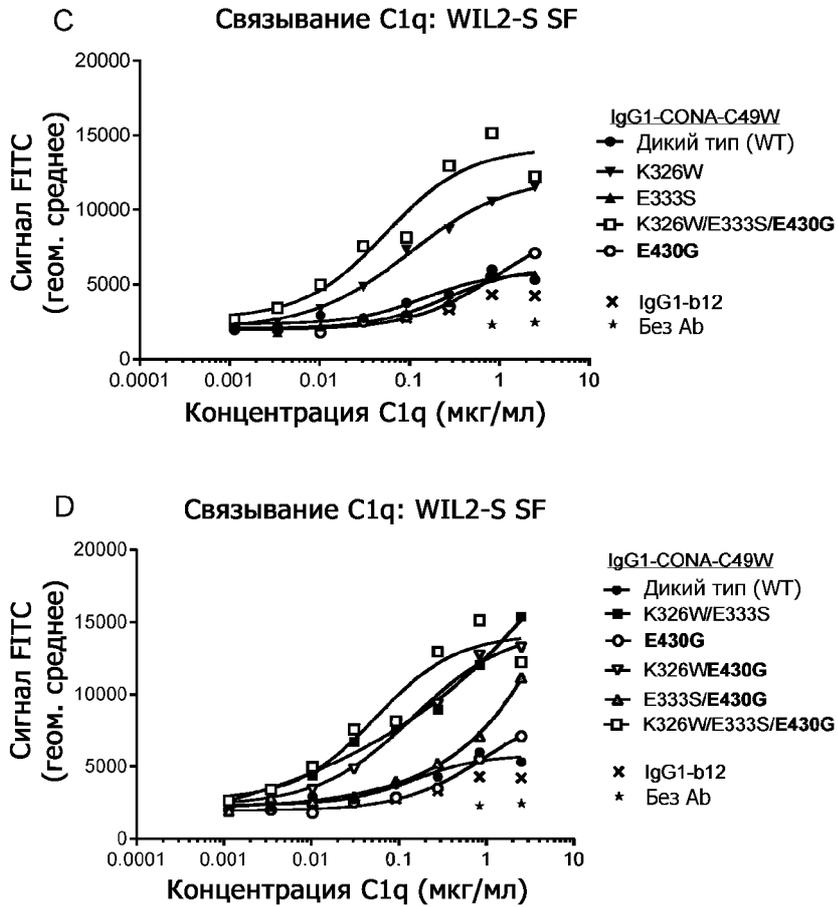
Фиг. 9



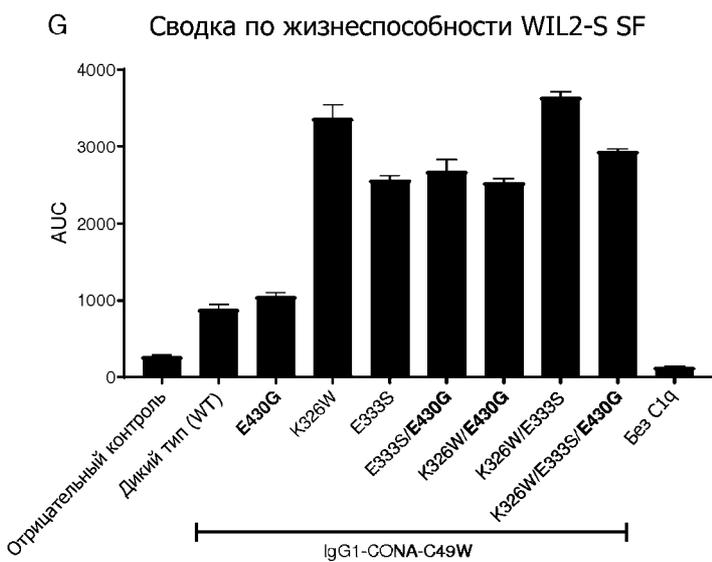
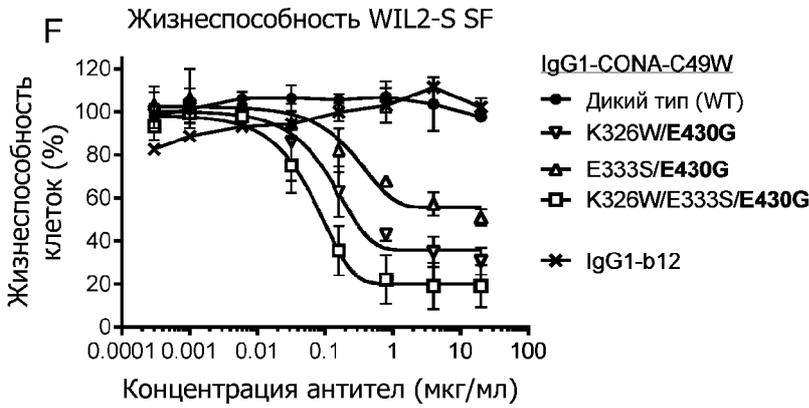
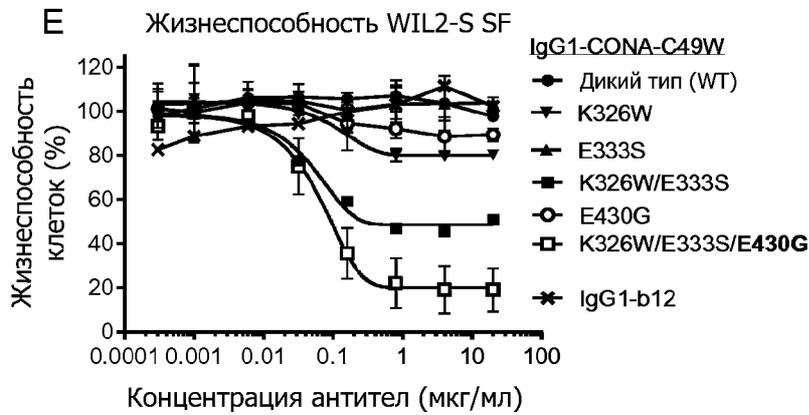
Фиг. 10



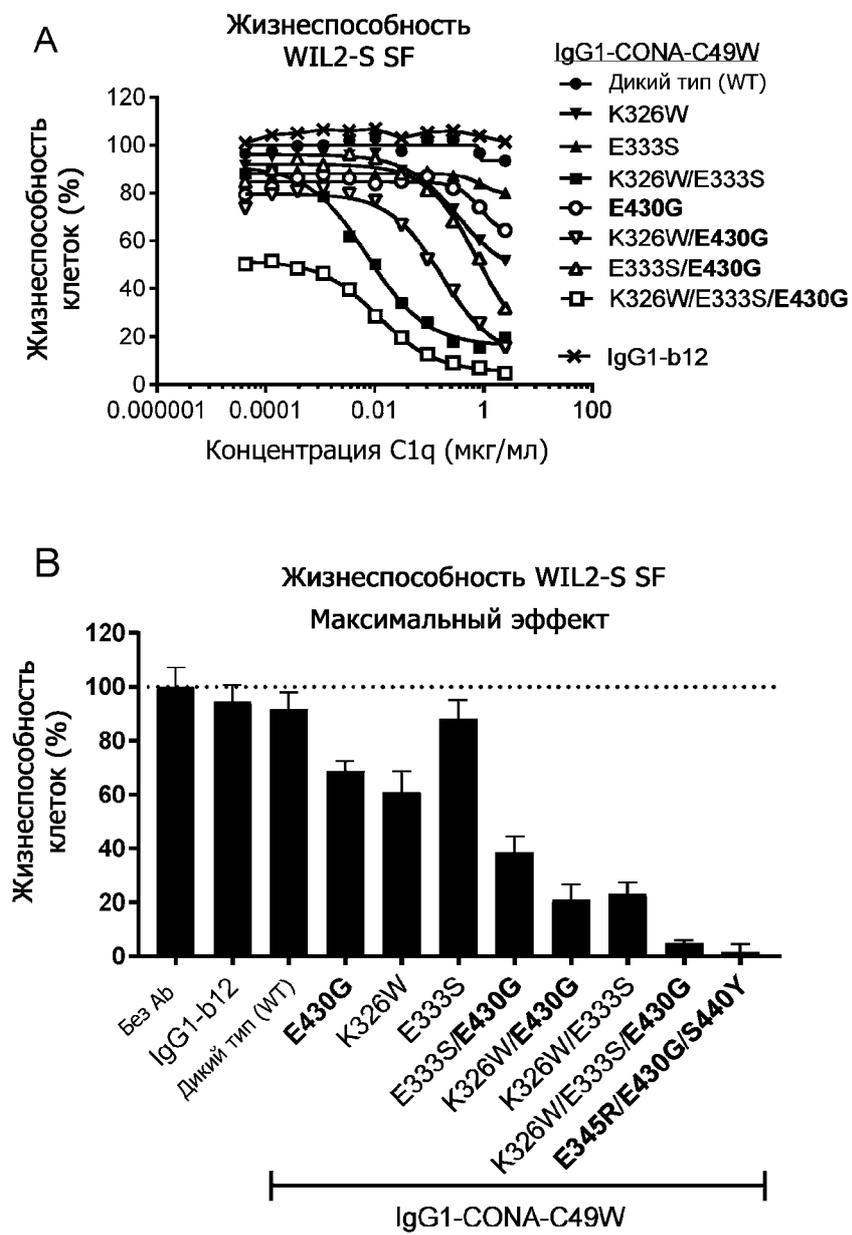
Фиг. 11



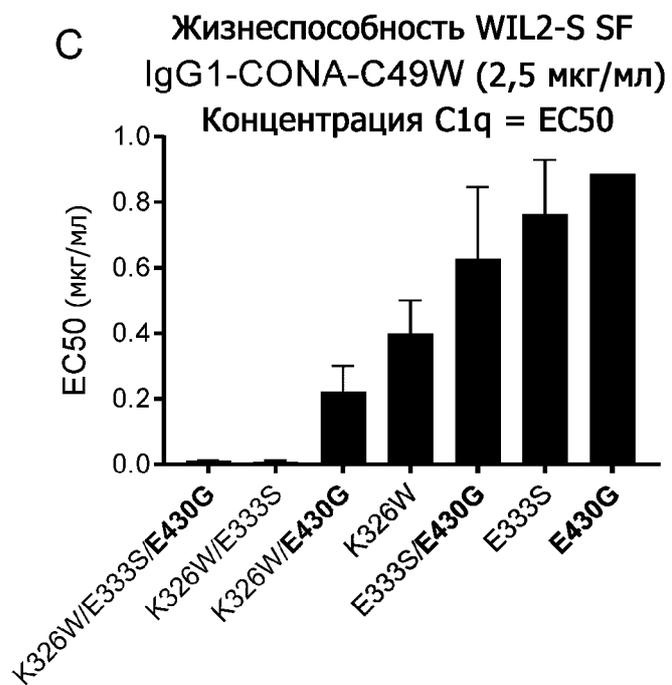
**Фиг. 11**  
продолжение



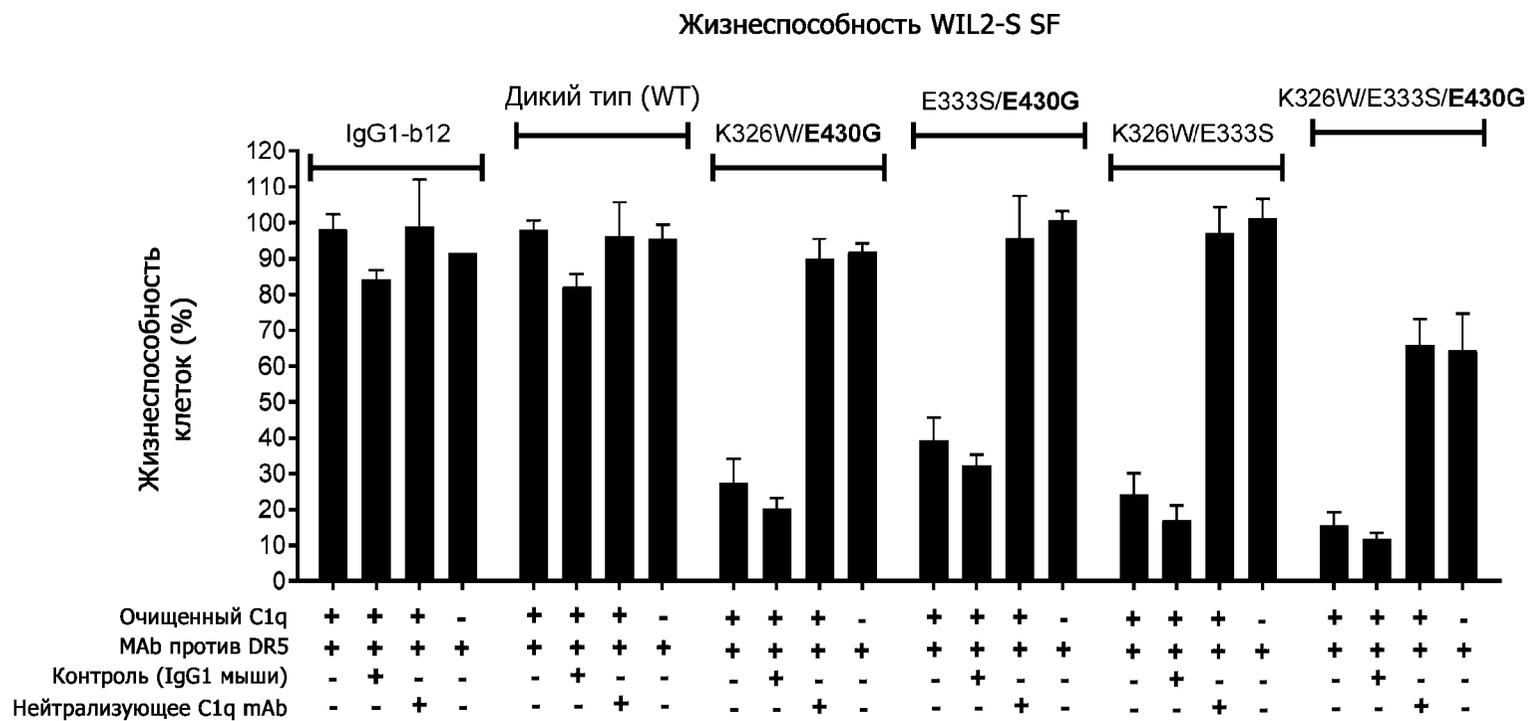
**Фиг. 11**  
продолжение



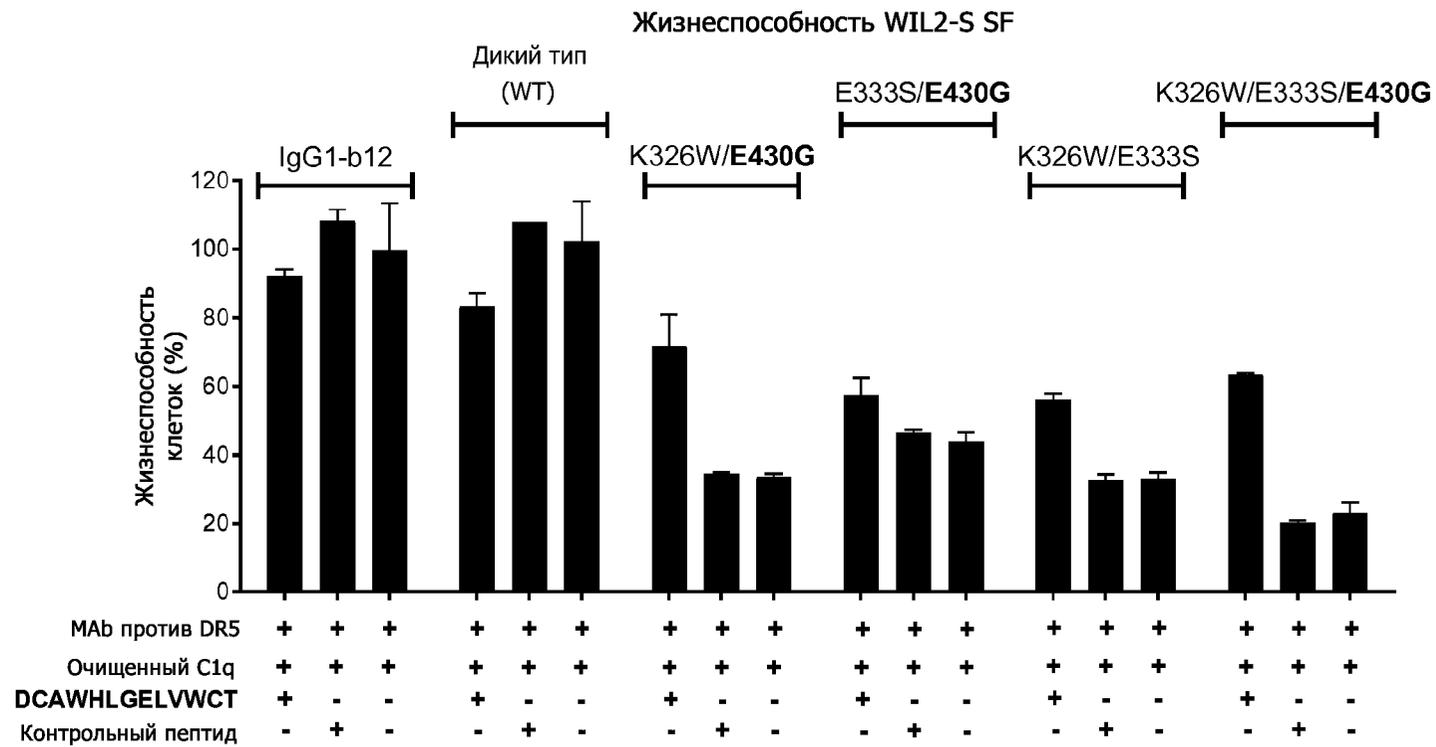
Фиг. 12



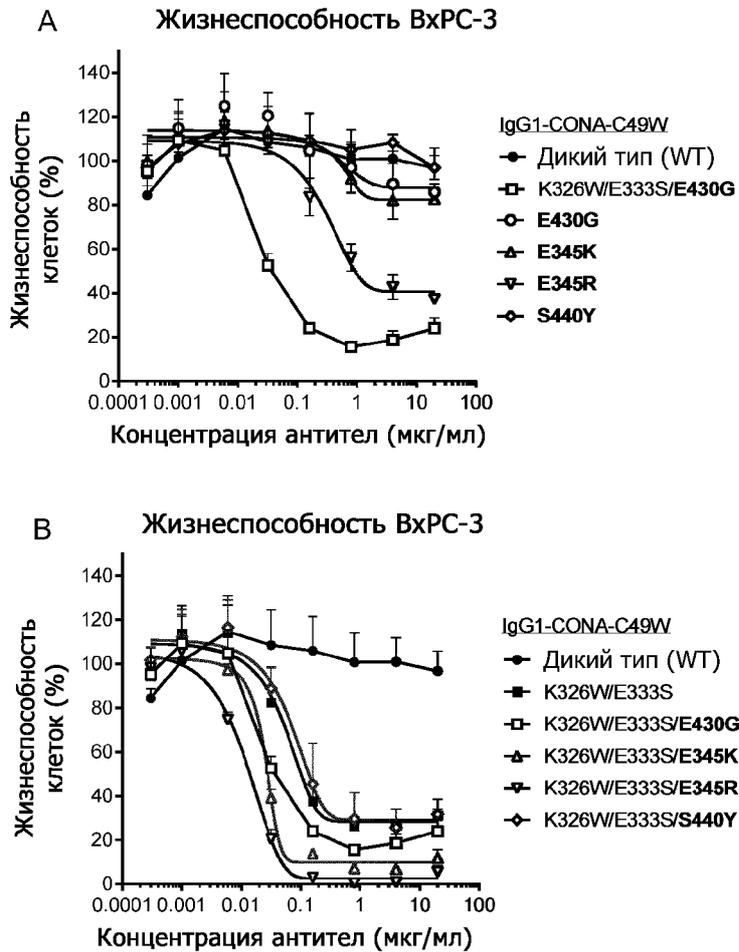
**Фиг. 12**  
продолжение



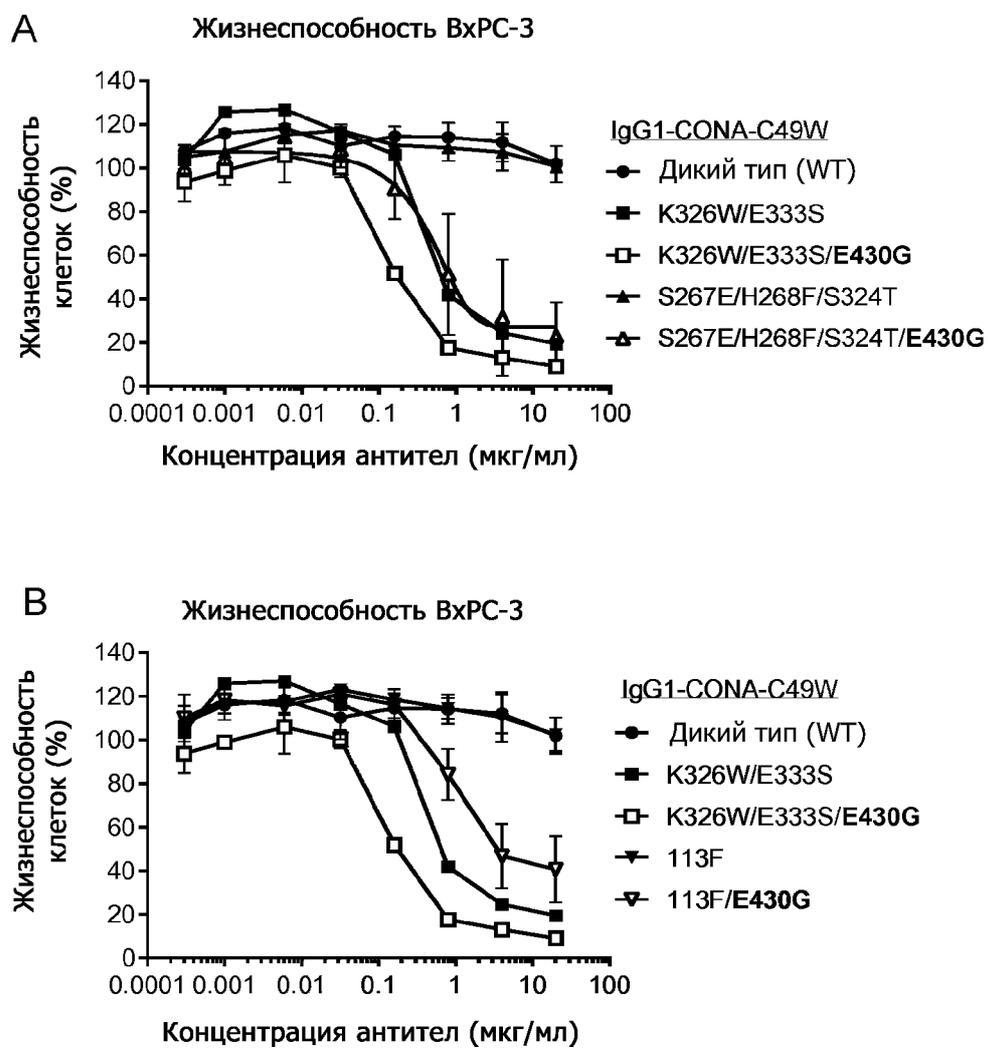
**Фиг. 13**



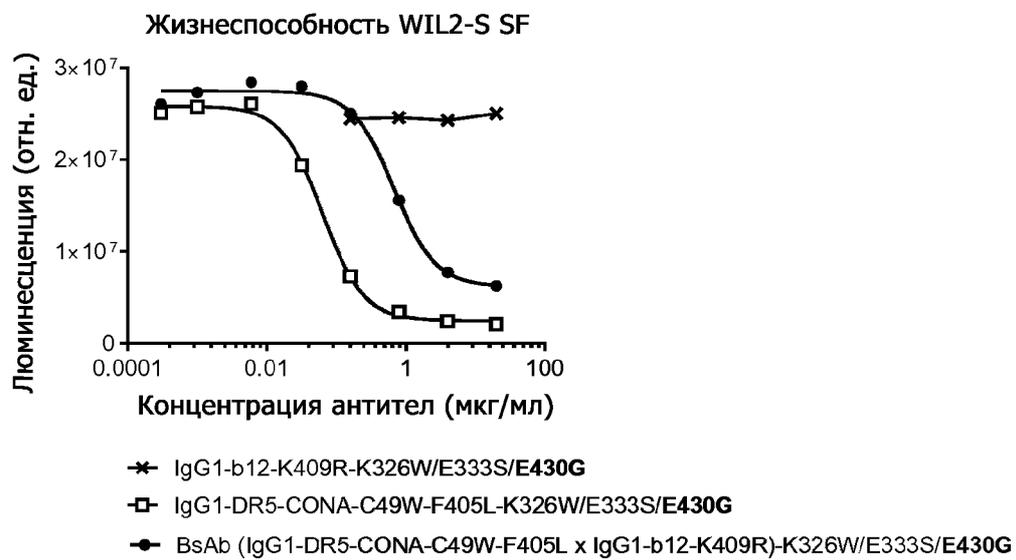
**Фиг. 14**



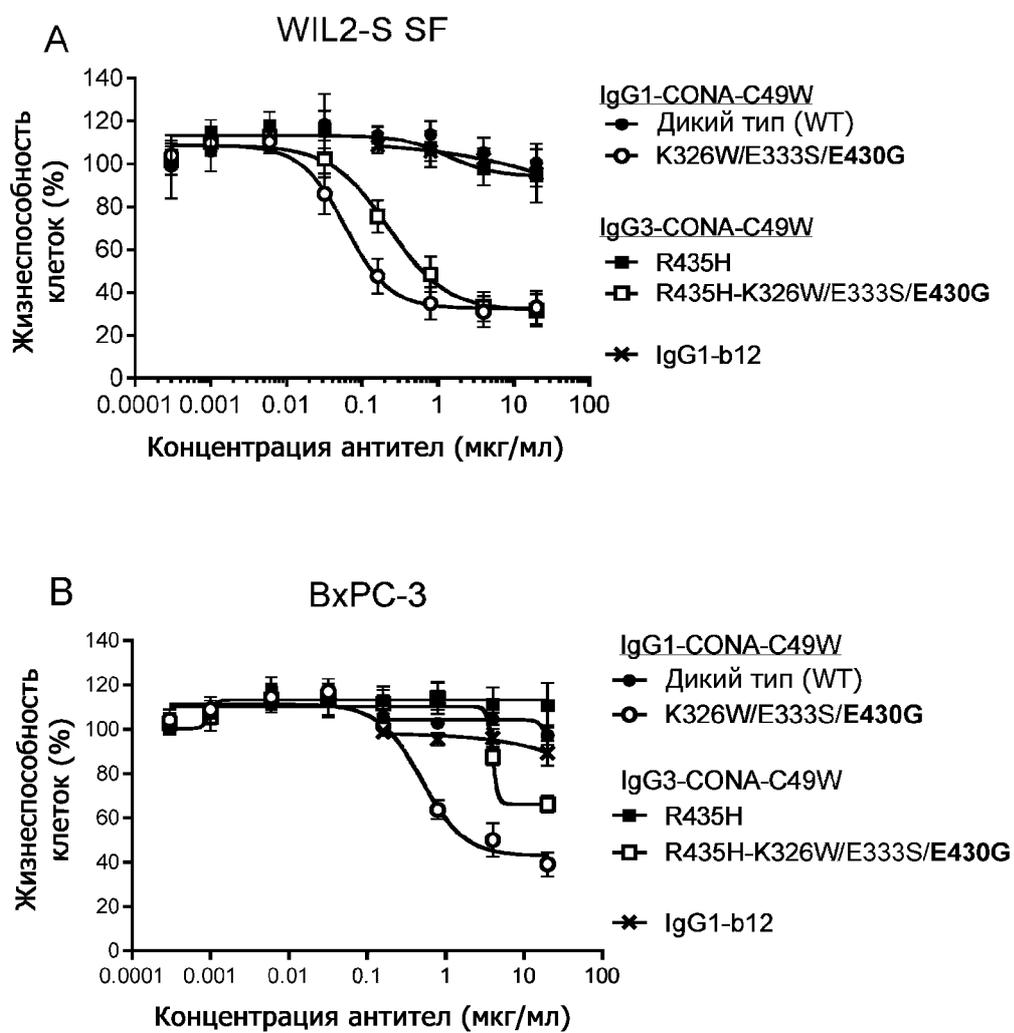
Фиг. 15



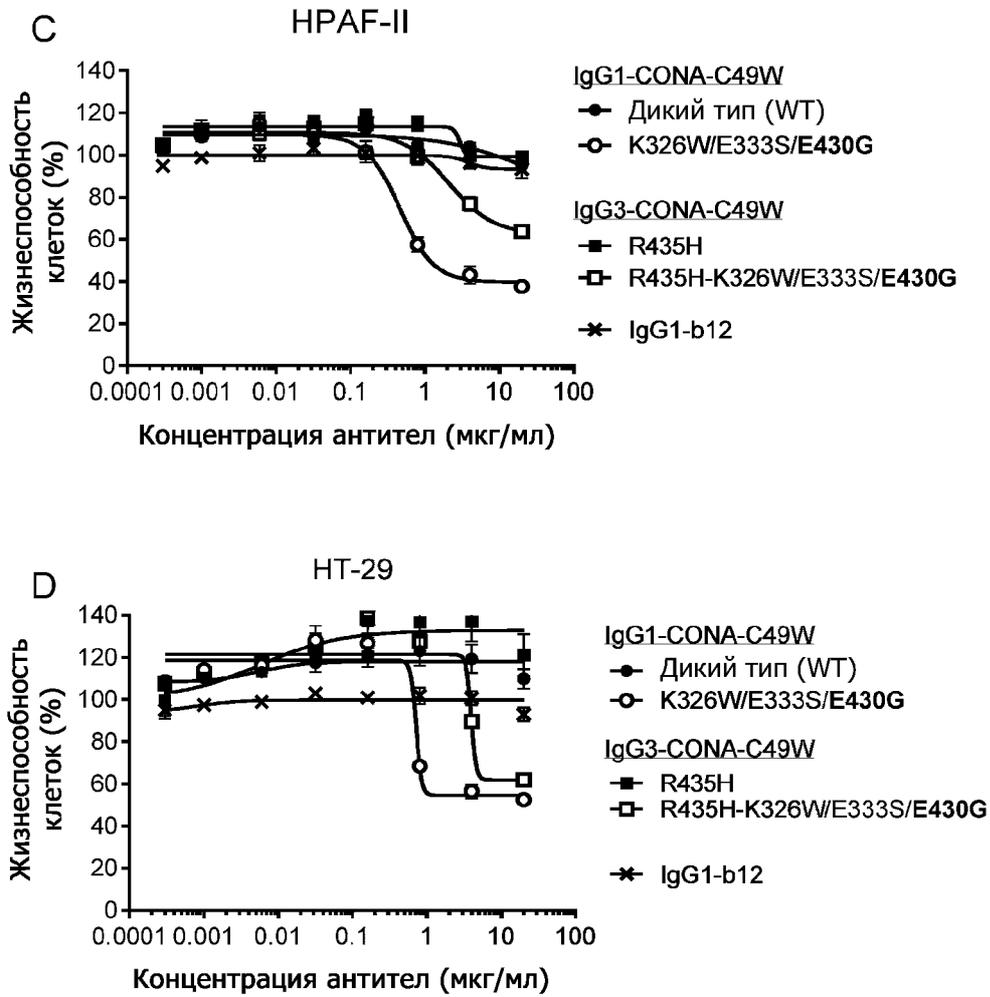
Фиг. 16



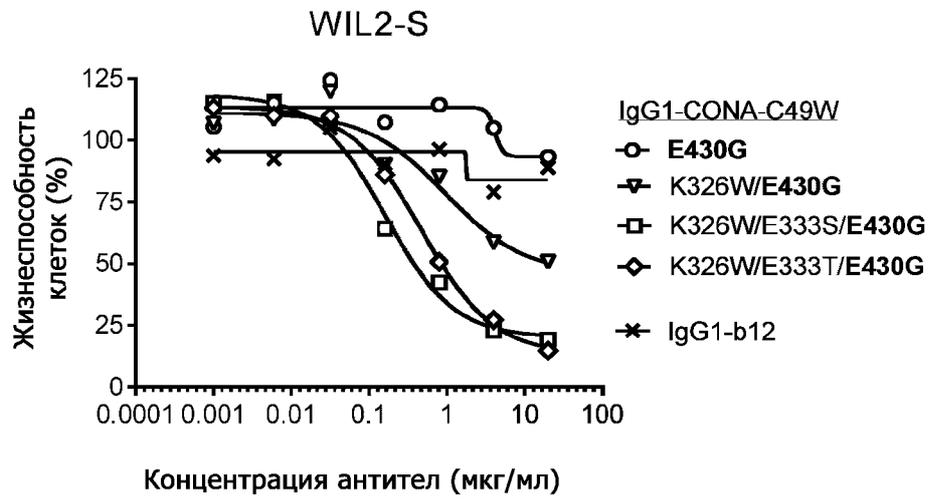
Фиг. 17



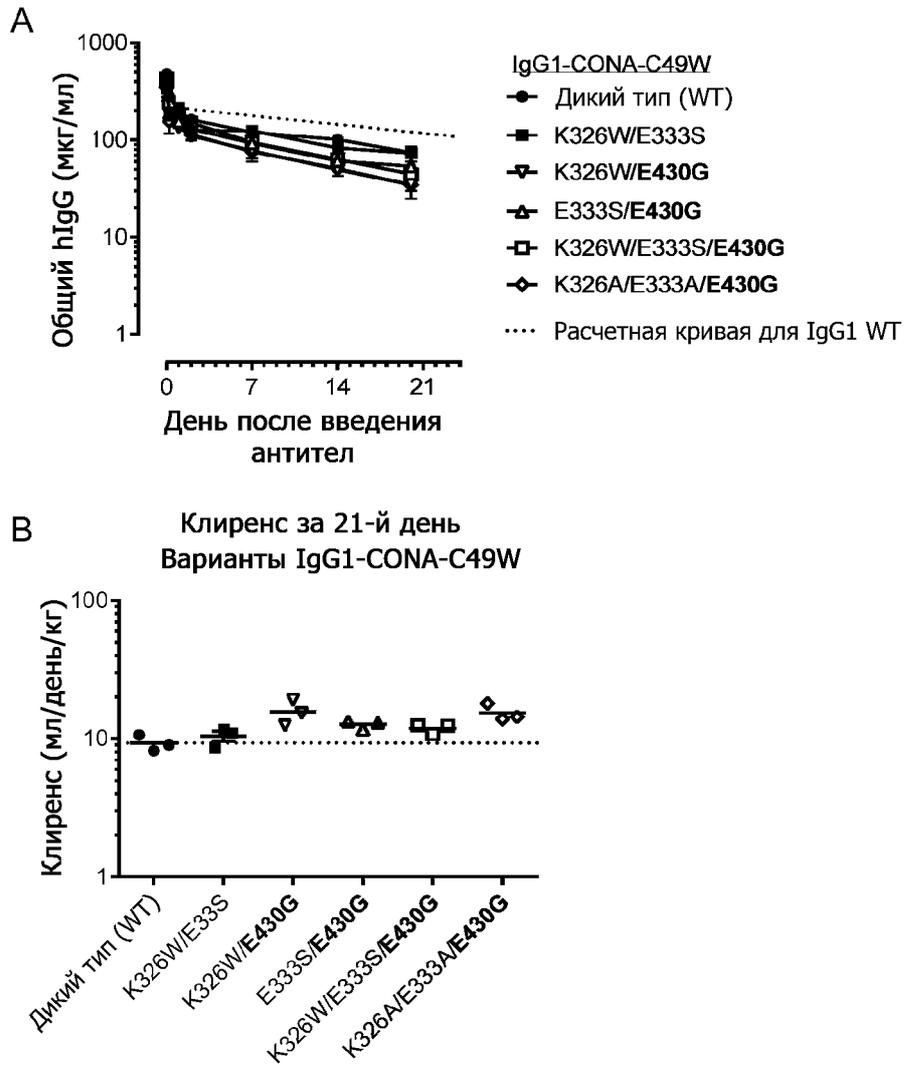
Фиг. 18



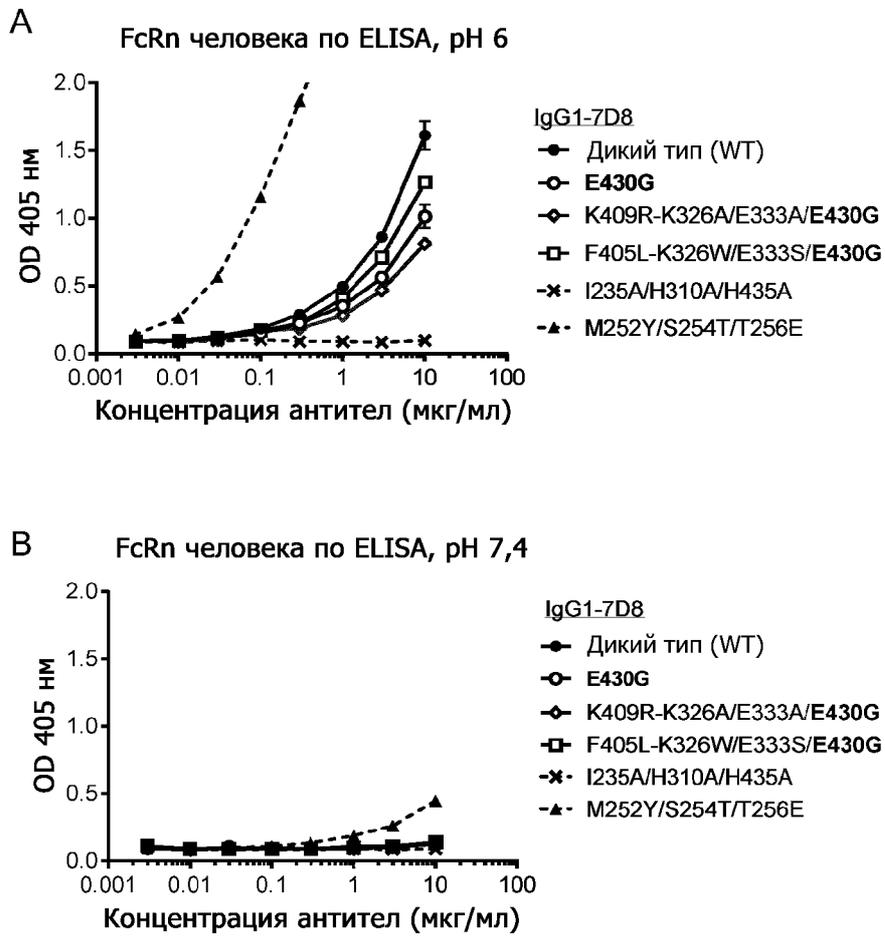
**Фиг. 18**  
 продолжение



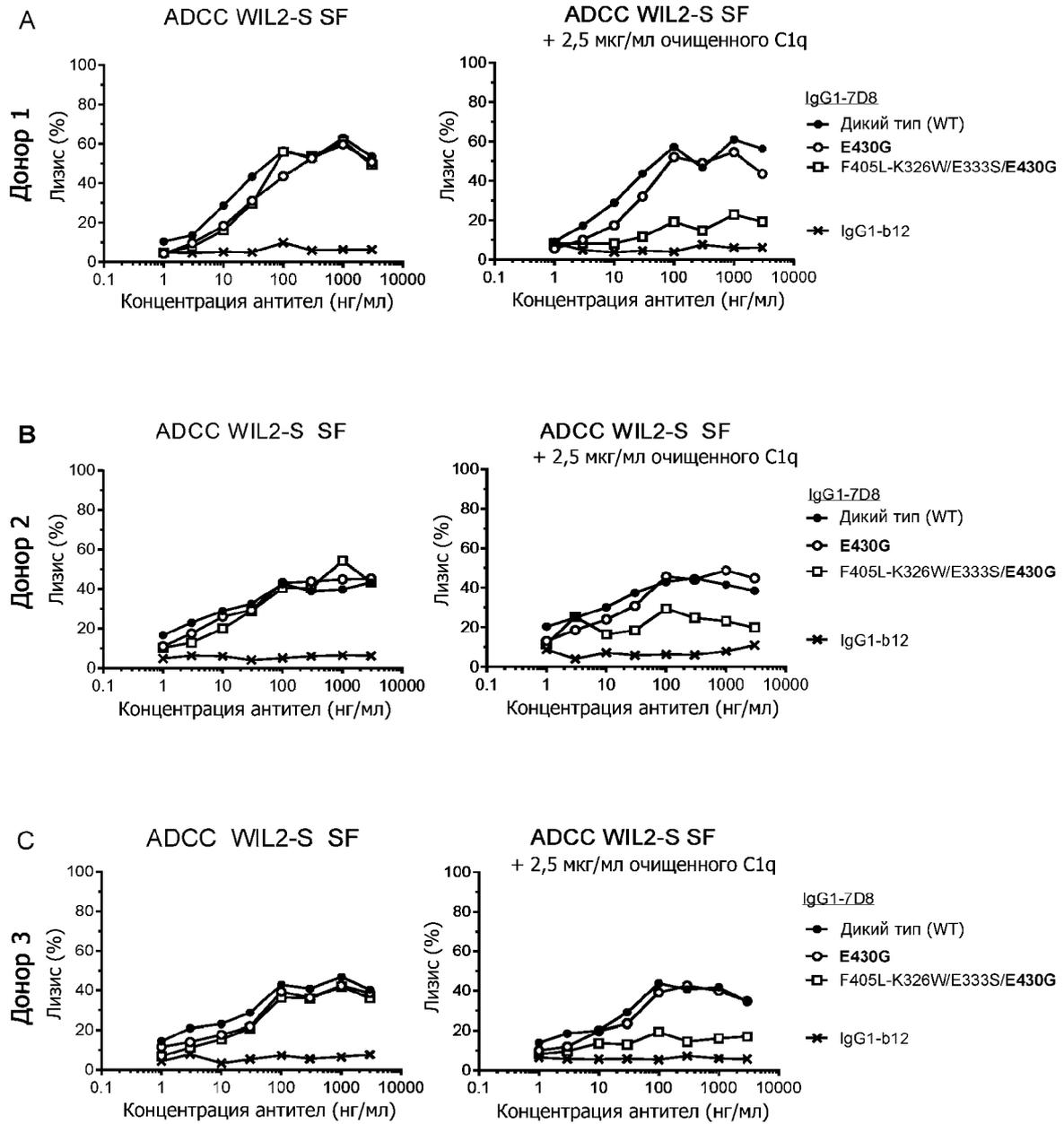
Фиг. 19



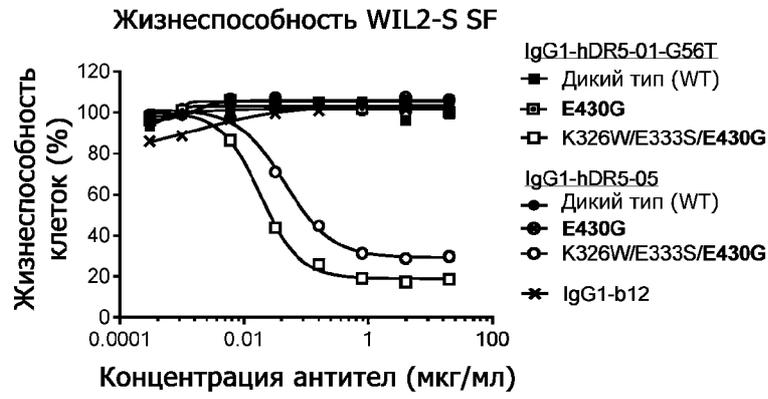
Фиг. 20



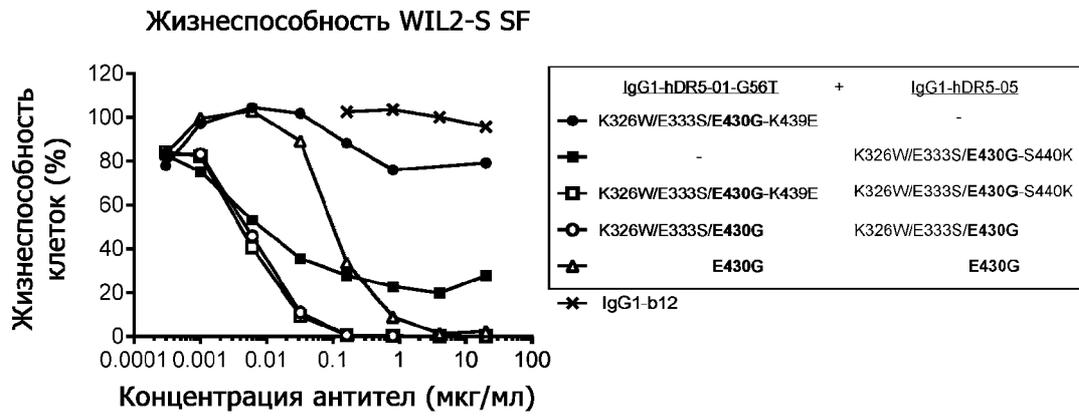
Фиг. 21



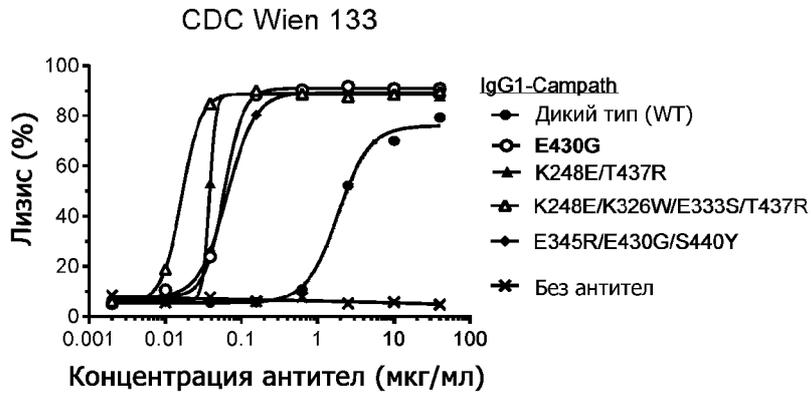
Фиг. 22



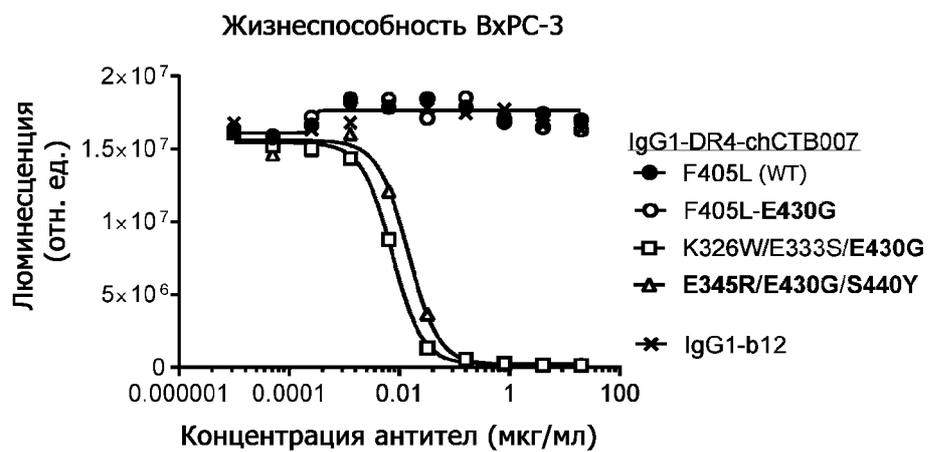
Фиг. 23



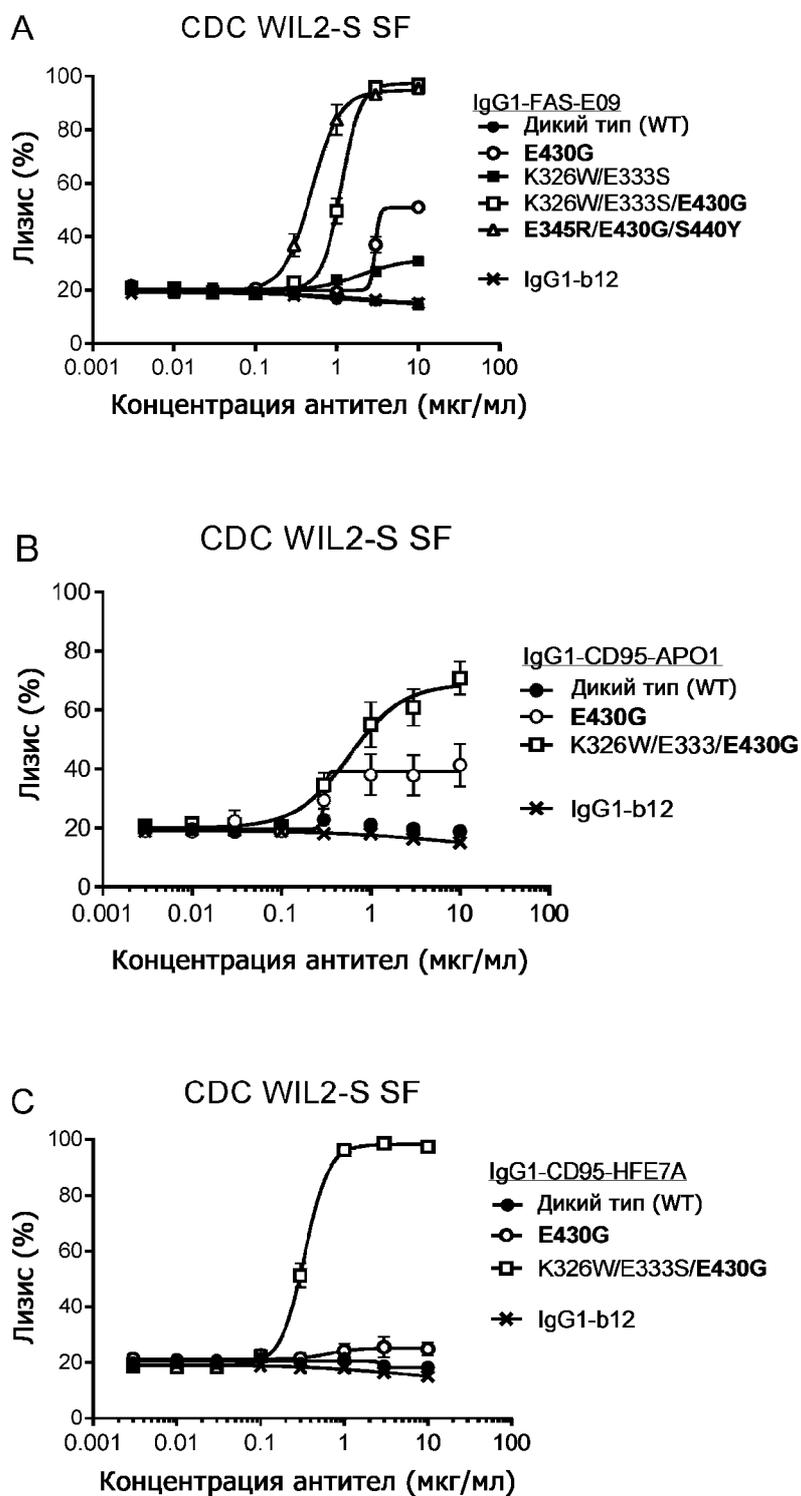
Фиг. 24



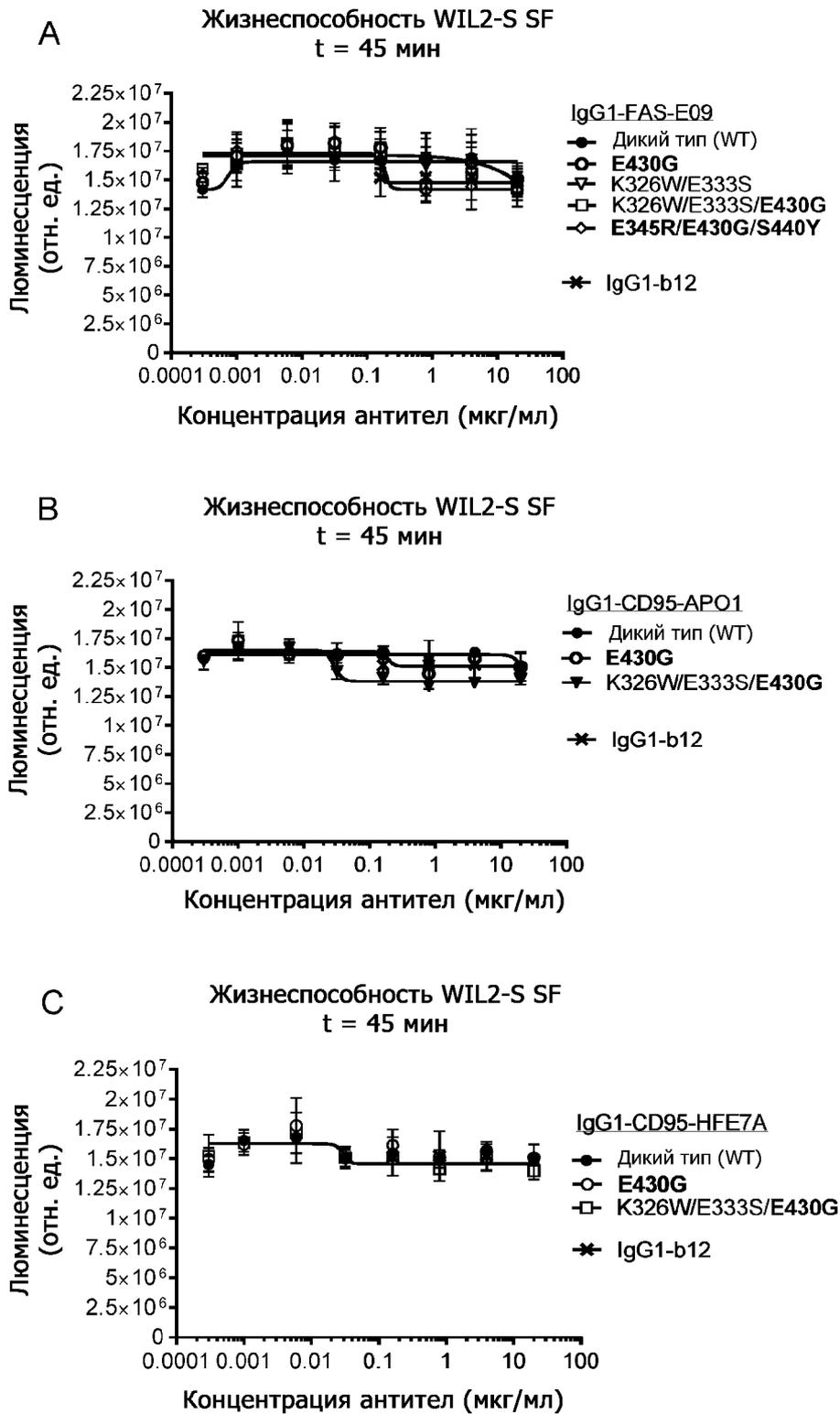
Фиг. 25



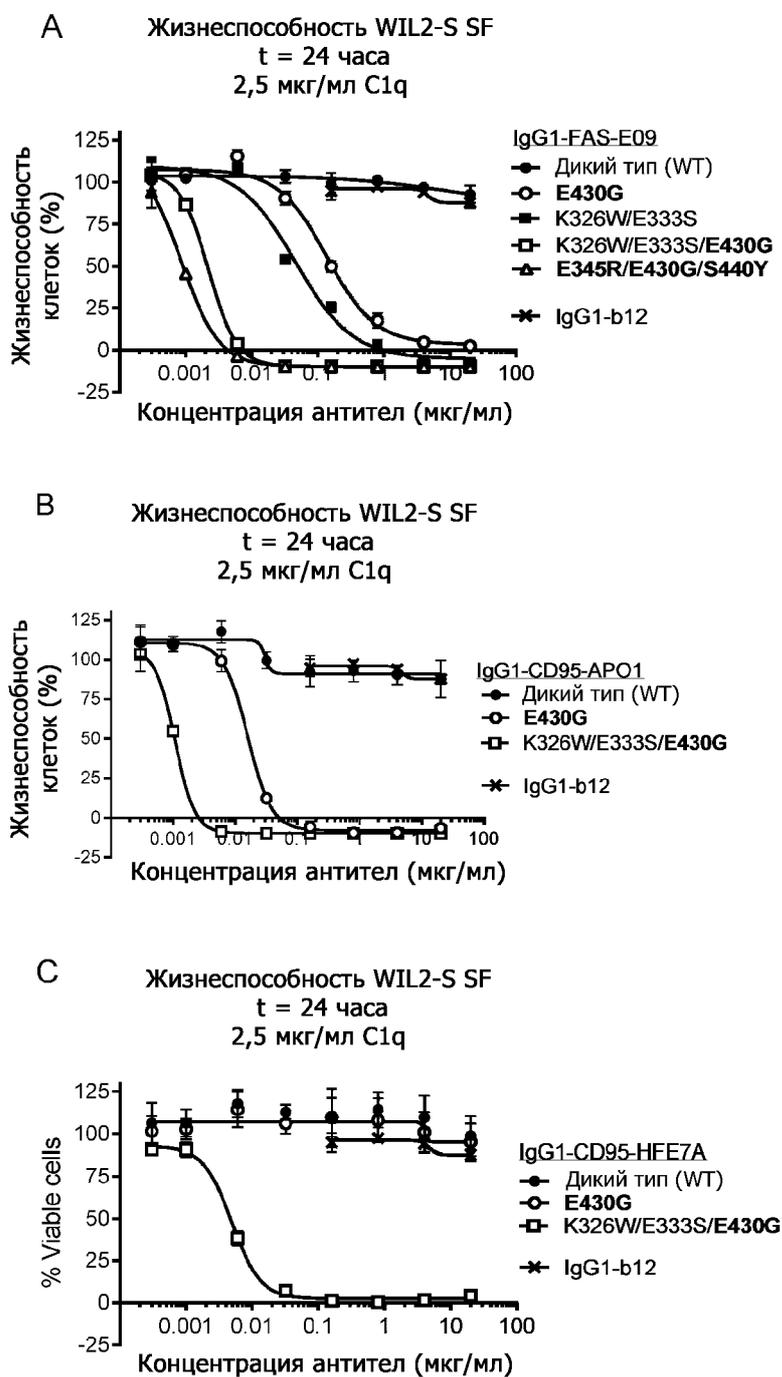
Фиг. 26



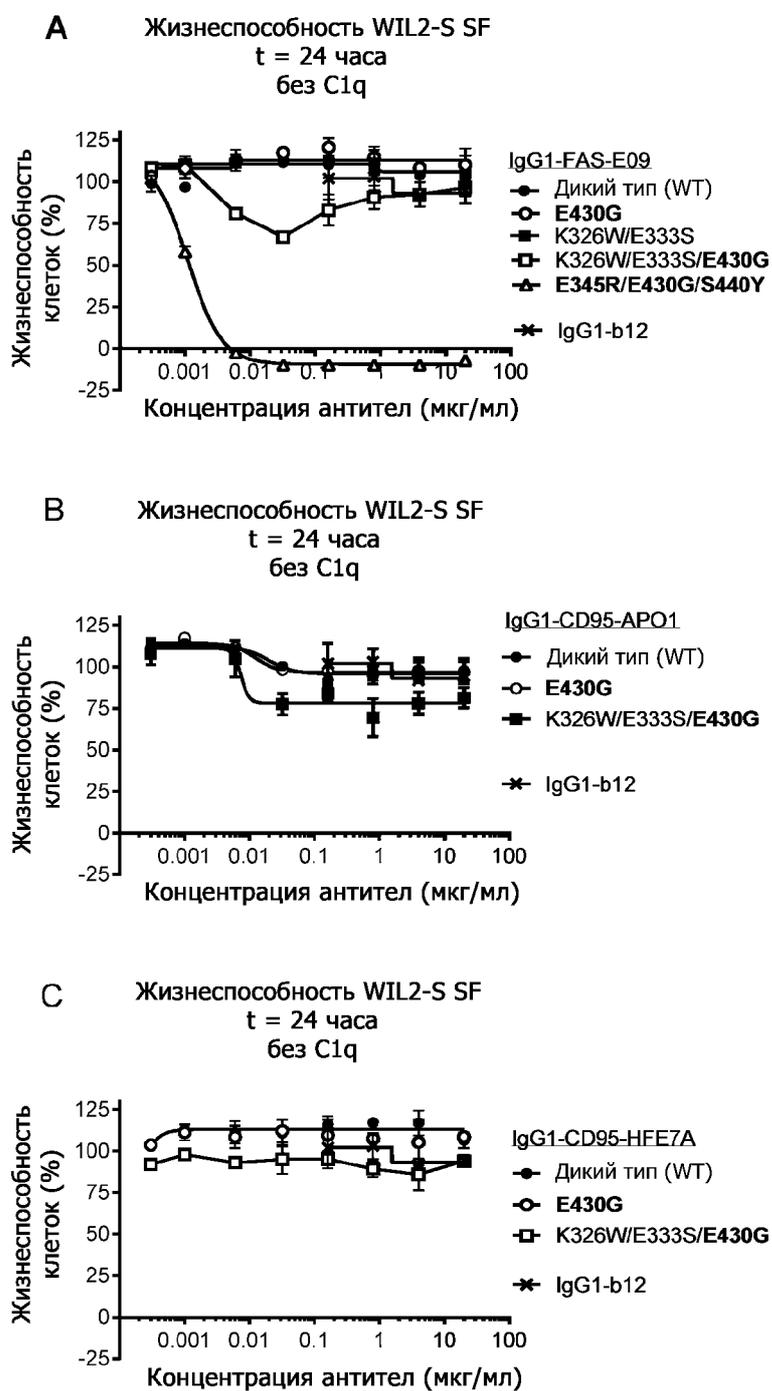
Фиг. 27



Фиг. 28



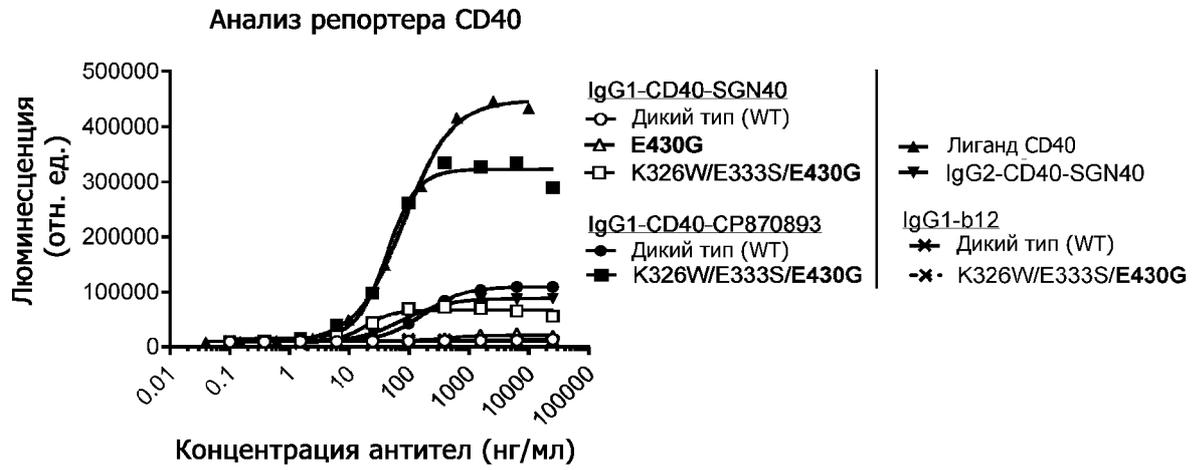
Фиг. 29



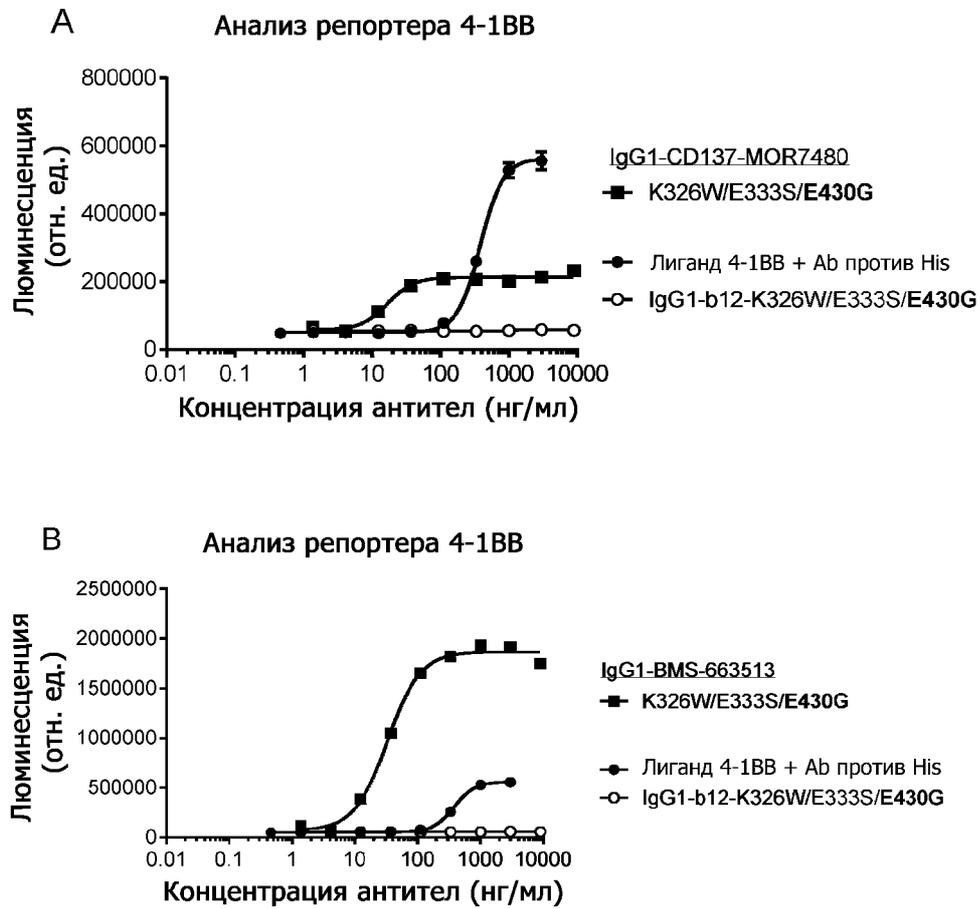
Фиг. 30



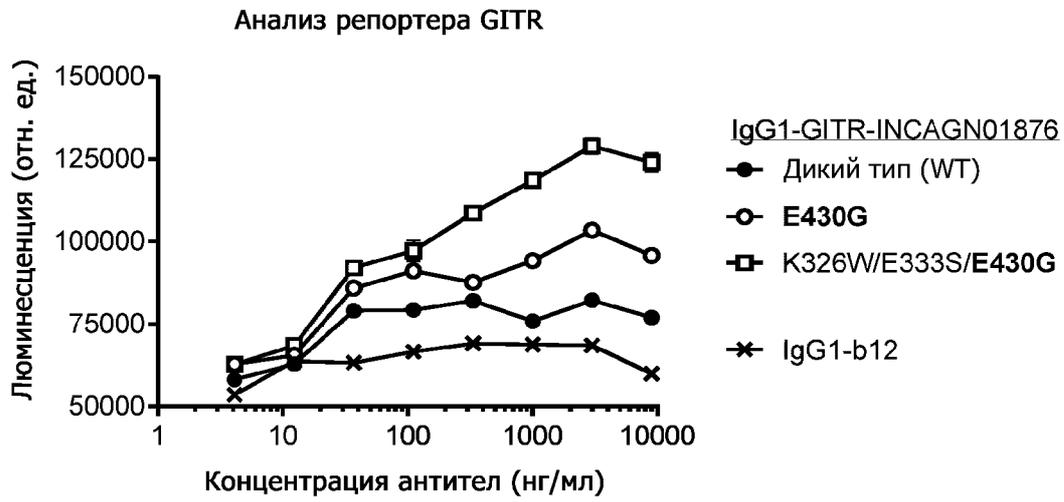
Фиг. 31



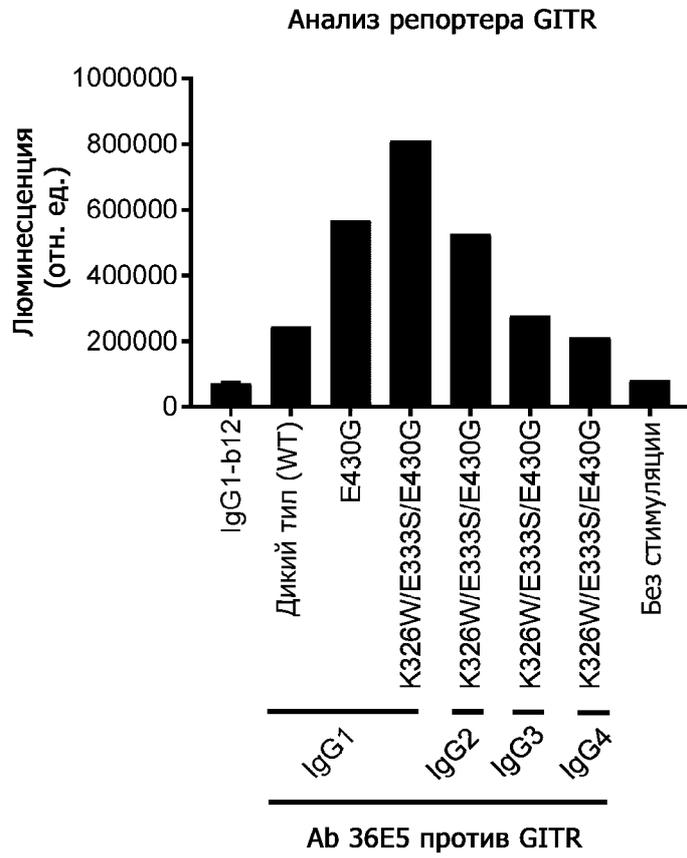
**Фиг. 32**



Фиг. 33



Фиг. 34



Фиг. 35