

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992797** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.11

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

(22) Дата подачи заявки
2018.05.24

(54) АНТИТЕЛА, СОДЕРЖАЩИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КОНСТАНТНЫЕ ОБЛАСТИ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ

(31) 62/511,178; 62/599,221

(32) 2017.05.25; 2017.12.15

(33) US

(86) PCT/US2018/034446

(87) WO 2018/218056 2018.11.29

(71) Заявитель:
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Яминюк Аарон П., Корман Алан Дж.,
Селби Марк Дж., Барихарт Брайан С.,
Лонберг Нильс, Сринивасан Мохан,
Хеннинг Карла А., Хан Мишель
Минхуа, Лей Мин, Швейцер Лиан,
Хатчер Сандра В., Раджпал Арвинд
(US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О. (RU)**

(57) Изобретение относится к константным областям тяжелой цепи (называемым "модифицированными константными областями тяжелой цепи") или их функционально эквивалентным фрагментам, которые усиливают биологические свойства антител относительно тех же антител в неизменной форме. Типичная модифицированная константная область тяжелой цепи включает шарнир IgG2 и три константных домена (т.е. домена CH1, CH2 и CH3), где один или несколько доменов константной области имеют изотип, не относящийся к IgG2 (например, IgG1, IgG3 или IgG4). Константная область тяжелой цепи может содержать последовательности доменов человеческого IgG дикого типа или варианты этих последовательностей. Изобретение также относится к способам усиления определенных биологических свойств антител, которые содержат шарнир, не относящийся к IgG2, таких как интернализация, агонизм и антагонизм, где способ включает замену шарнира не относящегося к IgG2 антитела на шарнир IgG2.

A1

201992797

201992797

A1

АНТИТЕЛА, СОДЕРЖАЩИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КОНСТАНТНЫЕ ОБЛАСТИ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет по Предварительным Заявкам США No. 62/511,178 (подана 25 мая 2017 г.) и 62/599,221 (подана 15 декабря 2017 г.). Содержания любых патентов, патентных заявок и ссылок, цитируемых в настоящем описании, включено посредством ссылки во всей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Терапия антителами является одной из наиболее быстро развивающихся областей лечения заболеваний, таких как рак и иммунные нарушения. Тем не менее, эффективное нацеливание антигена терапевтическими антителами остается серьезной проблемой в здравоохранении. Поэтому разработка антител стала основным направлением в фармацевтическом мире. В результате этого внимания появилось множество новых сконструированных антител, таких как фрагменты антител, конъюгаты антител с лекарственными средствами (ADC), антитела с модифицированными эффекторными областями и биспецифические антитела.

Антитела реализуют свои терапевтические свойства посредством множества различных механизмов. Антитела могут напрямую ингибировать или активировать целевой антиген, регулируя таким образом передачу сигналов клетками. Антитела могут ингибировать связывание лиганда с рецептором. Антитела могут также индуцировать или ингибировать иммунный ответ, например, путем усиления иммунной системы субъекта для борьбы с инфекцией или раком (напр., в качестве костимуляторов при активации Т-клеток).

Кроме того, основным механизмом действия терапевтических антител считается опосредованная антителами интернализация рецептора клеточной поверхности/антигена. В этом случае антитело удаляет мишень с клеточной поверхности и выполняет свою функцию путем индуцирования интернализации в клетку. Действительно, одним из пионерных терапевтических средств на основе антител является трастузумаб для лечения рака молочной железы. Трастузумаб нацеливается на рецептор ErbB2 и индуцирует интернализацию рецептор/антитело, таким образом ингибируя передачу сигналов EGFR. Однако антитела не всегда проявляют эффективные свойства интернализации, поэтому существует постоянная потребность в антителах с

улучшенными функциями интернализации. Соответственно, весьма желательными являются способы улучшения интернализации известных терапевтических антител.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к константным областям тяжелой цепи (называемым «модифицированные константные области тяжелой цепи») или их функционально эквивалентным фрагментам, которые усиливают или модифицируют биологические свойства антител по отношению к тем же антителам в неизменной форме. Например, антитела, содержащие модифицированные константные области, проявляют повышенную интернализационную и/или агонистическую или антагонистическую активность. Соответственно, антитела по изобретению являются оптимизированными версиями исходного немодифицированного антитела. В определенных вариантах выполнения изобретения тяжелая цепь содержит модифицированную константную область, содержащую одну или несколько мутаций или модификаций относительно константной области тяжелой цепи дикого типа. В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи включает шарнир IgG2 и три константных домена (*т.е.*, домены CH1, CH2 и CH3), где один или несколько доменов константной области не относятся к изотипу IgG2 человека (*напр.*, IgG1, IgG3 или IgG4), или их функционально эквивалентные фрагменты. Модифицированная константная область может включать соответствующую аминокислотную последовательность дикого типа или ее вариант, *напр.*, одну или несколько (*напр.*, от 1 до 10 или более) аминокислотных замен или делеций в шарнире или доменах CH1, CH2, CH3 относительно аминокислотной последовательности дикого типа. Соответственно, аминокислотная последовательность шарнира и/или каждого константного домена составляет по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 95% или более (*т.е.*, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичности с соответствующей аминокислотной последовательностью дикого типа.

В одном варианте выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи включает шарнир человеческого IgG2 дикого типа или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности шарнира человеческого IgG2 дикого типа. Шарнир может дополнительно содержать дополнительные модификации, например, для уменьшения образования дисульфидной связи. В одном варианте выполнения изобретения шарнир включает аминокислотную замену C219S относительно шарнира человеческого IgG2 дикого типа. В определенных вариантах выполнения изобретения

шарнир содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 8, 21-23, 126-132 и 134-147, или одну из этих последовательностей, которая содержит 1-3 аминокислоты, вставленные между CVE и CPP.

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи включает домен CH1 IgG2, напр., домен CH1 человеческого IgG2 дикого типа, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности домена CH1 человеческого IgG2 дикого типа (SEQ ID NO: 7).

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи включает домен CH2 IgG1, напр., домен CH2 человеческого IgG1 дикого типа, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности домена CH2 человеческого IgG1 дикого типа. Домен CH2 может содержать дополнительные модификации (напр., для уменьшения или устранения эффекторных функций). В некоторых вариантах выполнения изобретения домен CH2 включает аминокислотные замены A330S и P331S относительно полноразмерного CH2 человеческого IgG1 дикого типа. В определенных вариантах выполнения изобретения домен CH2 содержит SEQ ID NO: 24.

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи включает домен CH3 IgG1, напр., домен CH3 человеческого IgG1 дикого типа, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности домена CH3 человеческого IgG1 дикого типа. Домен CH3 может также содержать дополнительные модификации для придания конкретного аллотипа. В одном варианте выполнения изобретения домен CH3 содержит аминокислотный остаток Е в положении 356 и аминокислоту М в положении 358 (аллотип «f») относительно полноразмерного человеческого IgG1 дикого типа другого аллотипа (напр., аллотипа «fa», имеющего D и L в этих положениях соответственно). В некоторых вариантах выполнения изобретения домен CH3 содержит SEQ ID NO: 5.

В конкретном варианте выполнения изобретения антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, в которой (a) домен CH1 представляет собой домен CH1 человеческого IgG2 дикого типа или домен CH1 IgG1 дикого типа с дополнительной модификацией или без нее, (b) шарнир представляет собой IgG2 дикого типа с заменой C219S или без нее, (c) домен CH2 представляет собой домен CH2 человеческого IgG1 дикого типа или домен CH2 IgG2 дикого типа с

дополнительными модификациями или без них, и (d) домен CH3 представляет собой домен CH3 человеческого IgG1 дикого типа или домен CH3 человеческого IgG2 дикого типа с аминокислотой Е в положении 356 и аминокислотой М в положении 358 (напр., аллотип f или fa) или без них. В конкретном варианте выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе, напр., изложенную в любой из SEQ ID NO: 26-37 и 78-93.

Антитела по изобретению (т.е., антитела, имеющие модифицированную константную область) могут быть полностью человеческими антителами или гуманизированными антителами и, кроме того, проявлять одну или несколько усиленных или измененных характеристик по сравнению с теми же антителами без модифицированной константной области тяжелой цепи. Эти признаки могут включать повышенную или измененную интернализацию клеткой, агонистическую активность, образование крупных сшитых комплексов, ADCC, опосредованную рецептором передачу сигналов, антагонистическую активность, иммуномодулирующую активность и противоопухолевую активность; или введение нового свойства, напр., агонистической активности.

Также предлагаются биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты, содержащие модифицированные константные области по изобретению, а также композиции, которые содержат антитела, биспецифические молекулы или иммуноконъюгаты и приемлемый фармацевтический носитель. Такие композиции также могут включать один или несколько дополнительных терапевтических агентов, напр., агент, который стимулирует иммунную систему, такой как ингибитор контрольных точек, костимулирующая молекула, антитело против CD39 или антитело против A2AR.

Также предложены способы получения антитела, содержащего модифицированную константную область тяжелой цепи. Определенные способы, представленные в настоящем документе, включают способы повышения интернализации антитела клеткой и способы повышения агонистической активности антитела по сравнению с тем же антителом, содержащим шарнир, не относящийся к изотипу IgG2. Такие способы включают стадии предоставления антитела, имеющего шарнир, который не является шарниром IgG2, и замены шарнира на шарнир IgG2 (такого как шарнир, который является шарниром человеческого IgG2 дикого типа, шарниром, имеющим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности шарнира человеческого IgG2 дикого типа или шарнира, который модифицирован для уменьшения образования дисульфидной

связи, напр., шарнира, который содержит аминокислотную замену C219S). В одном варианте выполнения изобретения интернализация антитела усиливается или увеличивается по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз или более, что приводит к снижению $T_{1/2}$ по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз или более. В определенных вариантах выполнения изобретения активность агониста увеличивается или усиливается по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз или более, что определяется повышенным высвобождением цитокинов или повышенной пролиферацией в эффекторных Т-клетках; снижением активности регуляторных Т-клеток, если связывание с Treg снижает функцию Treg; или увеличенной деплецией Treg.

В определенных вариантах выполнения изобретения способ дополнительно включает этап замены по меньшей мере одного из доменов CH1, CH2 или CH3 доменом CH1, CH2 или CH3 другого изотипа. Такие замены включают, например: (a) замену домена CH1 доменом CH1 IgG1 или доменом CH1 IgG2; (b) замену домена CH2 доменом CH2 IgG1 или доменом CH2 IgG2; и/или (b) замену домена CH3 доменом CH3 IgG1 или доменом CH3 IgG2, где домен замены имеет последовательность дикого типа или по меньшей мере 95% идентичность с последовательностью дикого типа. В определенных вариантах выполнения изобретения домен CH1 содержит аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 7. В определенных вариантах выполнения изобретения домен CH2 модифицируют для уменьшения или устранения эффекторных функций, напр., домен CH2 содержит аминокислотные замены A330S и P331S (SEQ ID NO: 24). В определенных вариантах выполнения изобретения домен CH3 содержит аминокислотный остаток Е в положении 356 и аминокислоту М в положении 358 (SEQ ID NO: 5, аллотип «f»), а в определенных вариантах выполнения изобретения домен CH3 содержит аллотип «fa».

Способы, раскрытые в настоящем документе, включают способы лечения субъекта путем введения антитела, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, содержащего модифицированную константную область тяжелой цепи. Также могут вводиться совместно один или несколько дополнительных терапевтических агентов, напр., терапевтический агент, который стимулирует иммунную систему, такой как ингибитор контрольных точек, костимулирующая молекула.

В настоящем документе представлены антитела, содержащие модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3 в порядке от N- до С-конца, и где (a) домен CH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную

последовательность, которая отличается от них не более чем на 5 аминокислот или которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 7, и где по меньшей мере один из C131, R133, E137, S138 или R217 не заменены и не удалены; (b) шарнир, содержащий любую одну из SEQ ID NO: 8, 21-23, 126-132 или 134-147 или последовательность, которая содержит 1-3 аминокислоты, вставленные между CVE и CPP, или которая отличается от них не более чем на 5 аминокислот, где шарнир не содержит замены или делеции как в C219, так и в C220; (c) антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством или новым введенным свойством относительно того же антитела, которое содержит шарнир IgG1 и домен CH1; и (d) модифицированная константная область тяжелой цепи не является константной областью IgG2 дикого типа или константной областью IgG2, содержащей C219S и/или C220S. Шарнир может содержать аминокислотную последовательность ERKXCVECPPCPAP (SEQ ID NO: 129) или ERKCXVECPPCPAP (SEQ ID NO: 130), где X представляет собой любую аминокислоту, кроме цистеина. Например, шарнир может содержать аминокислотную последовательность ERKSCVECPPCPAP (SEQ ID NO: 131) или ERKCSVECPPCPAP (SEQ ID NO: 132). В некоторых вариантах выполнения изобретения по меньшей мере один или все аминокислотные остатки P233, V234, A235 и G237 удалены или заменены другим аминокислотным остатком, например, соответствующей аминокислотой в шарнире IgG1. В определенных вариантах выполнения изобретения ни один из аминокислотных остатков R133, E137, S138 и R217 или ни один из C131, R133, E137, S138 и R217 не заменен или не удален. В определенных вариантах выполнения изобретения N192 и/или F193 заменены другой аминокислотой. Антитело может содержать домен CH2, который по меньшей мере на 95% идентичен домену IgG1 дикого типа. Антитело может содержать домен CH3, который по меньшей мере на 95% идентичен домену IgG1 дикого типа. В некоторых вариантах выполнения изобретения домен CH2 и/или CH3 не является доменом CH2 и/или CH3 IgG1 дикого типа, и антитело обладает эффекторной функцией, которая является более эффективной, чем функция IgG1 дикого типа. В определенных вариантах выполнения изобретения домен CH2 и/или CH3 не является доменом CH2 и/или CH3 IgG1 дикого типа, и антитело обладает эффекторной функцией, которая менее эффективна, чем такая у IgG1 дикого типа. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит домен CH2 и/или домен CH1, который по меньшей мере на 95% идентичен домену IgG1 или IgG4 дикого типа. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителами интернализации рецептора, ADCC, опосредованной

рецептором сигнализации, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или новым введенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, где (a) домен CH1 представляет собой домен CH1 человеческого IgG2 дикого типа; (b) шарнир содержит SEQ ID NO: любую одну из SEQ ID NO: 8, 21-23, 126-132 или 134-147 или последовательность, которая содержит 1-3 аминокислоты, вставленные между CVE и CPP; (c) домен CH2 представляет собой человеческий домен IgG1 дикого типа или модифицированный домен CH2, придающий антителу усиленную или пониженную эффекторную функцию; и (d) домен CH3 представляет собой домен CH3 человеческого IgG1 дикого типа или модифицированный домен CH3, придающий антителу усиленную или пониженную эффекторную функцию. Модифицированный константный домен тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична одной или нескольким из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262. Для тяжелых цепей, которые содержат Fc, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из этих последовательностей, предпочтительно, чтобы специфические аминокислотные мутации, сделанные для модуляции биологической активности в этих последовательностях, не варьировались.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, где константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнир, содержащий последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP
APPVAG (SEQ ID NO: 133) или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 133 не более чем в 10 аминокислот или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 133, где (i) по меньшей мере один из C131, R133, E137, S138 и R217 не заменен другой аминокислотой или не удален; (ii) C219 и C220 могут быть заменены другой аминокислотой или удалены, но C219 и C220 не могут быть оба заменены или удалены; (iii) 1-3 аминокислоты могут быть вставлены между CVE и CPP в шарнир; (iv) шарнир необязательно содержит дополнительную аминокислоту на С-конце, напр., G; (v) одна или несколько аминокислот P233, V234, A235 и G237 могут быть заменены другой аминокислотой (напр., соответствующей аминокислотой из IgG1)

или удалены; (vi) домены CH2 и CH3 могут быть доменами CH2 и CH3 дикого типа или модифицированными IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; (vii) модифицированная константная область тяжелой цепи не является константной областью тяжелой цепи дикого типа IgG2 или тяжелой константной областью IgG2 дикого типа с C219S или C220S; и (viii) антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством или новым введенным свойством относительно того же антитела, которое содержит шарнир IgG1 и домен CH1. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело обладает по меньшей мере одним улучшенным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителами интернализацией рецептора, ADCC, опосредованной рецептором сигнализации, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или новым введенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность. В определенных вариантах выполнения изобретения ни одна из аминокислот C131; R133; E137; S138; R217 не заменена другой аминокислотой или не удалена. В определенных вариантах выполнения изобретения N192 и/или F193 не являются замененными или представляют собой N192S и/или F193L соответственно. В определенных вариантах выполнения изобретения C219 представляет собой C219S, C220 представляет собой C220S, P233-G237 заменены или удалены; V234-G237 заменены или удалены; A235-G237 заменены или удалены; G237 заменен или удален; P233 заменен или удален; P233-V234 заменены или удалены; или P233-A235 заменены или удалены. Антитело может иметь эффекторную функцию или быть лишено эффекторной функции. Антитело может содержать домен CH2 дикого типа или модифицированный домен CH2 IgG1 или модифицированный домен CH3 IgG1 дикого типа.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, где константная область тяжелой цепи содержит домен CH1, содержащий последовательность
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVE (SEQ ID NO: 7), или аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности SEQ ID NO: 7 не более чем в 10 аминокислот или по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 7, где (i) по меньшей мере один из C131, R133, E137, S138 и R217 не заменен или не удален; (ii) модифицированная константная область тяжелой цепи не является константной областью тяжелой цепи IgG2 дикого типа или тяжелой константной областью IgG2 дикого типа с C219S или C220S; и (iii) антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством или новым введенным

свойством относительно того же антитела, которое содержит шарнир IgG1 и домен CH1. Антитело может обладать по меньшей мере одним усиленным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителами интернализации рецепторов, ADCC, опосредованной рецептором передачи сигналов, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или новым введенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность. В некоторых вариантах выполнения изобретения ни одна из аминокислот C131; R133; E137 и S138 не заменена другой аминокислотой или не удалена. В некоторых вариантах выполнения изобретения N192 и/или F193 не являются замененными или представляют собой N192S и/или F193L соответственно. Антитело может иметь эффекторную функцию или быть лишенным эффекторной функции. Антитело может содержать домен CH2 IgG1 дикого типа или модифицированного и/или домен CH3 IgG1 дикого типа или модифицированного.

Антитело может содержать модифицированную константную область тяжелой цепи, где константная область тяжелой цепи содержит шарнир, содержащий последовательность

ERKCCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 8) или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 8 не более чем в 5 аминокислотах, где (i) C219 и C220 могут быть заменены другой аминокислотой или удалены, но C219 и C220 оба не могут быть заменены или удалены, (ii) одна или несколько аминокислот P233, V234, A235 и G237 могут быть заменены или удалены; (iii) 1-3 аминокислоты могут быть вставлены между CVE и CPP в шарнир; (iv) шарнир необязательно содержит дополнительную аминокислоту на С-конце, напр., G; (v) домены CH2 и CH3 могут быть доменами CH2 и CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа или модифицированного; (vi) модифицированная константная область тяжелой цепи не является константной областью тяжелой цепи IgG2 дикого типа или тяжелой константной областью IgG2 дикого типа с C219S или C220S; и (vii) антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством или новым введенным свойством относительно того же антитела, которое содержит шарнир IgG1 и домен CH1. Антитело может обладать по меньшей мере одним усиленным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителами интернализации рецепторов, ADCC, опосредованной рецептором передачи сигналов, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или новым введенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность. В определенных вариантах выполнения изобретения C219 представляет собой C219S,

C220 представляет собой C220S, P233-G237 заменены или удалены; V234-G237 заменены или удалены; A235-G237 заменены или удалены; G237 заменен или удален; P233 заменен или удален; P233-V234 заменены или удалены; или P233-A235 заменены или удалены. Антитело может иметь эффекторную функцию или быть лишенным эффекторной функции. Антитело может содержать домен CH2 IgG1 дикого типа или модифицированного и/или домен CH3 IgG1 дикого типа или модифицированного.

Также изобретение относится к антителам, содержащим модифицированную константную область тяжелой цепи, где константная область тяжелой цепи содержит шарнир IgG1 или IgG2, и где шарнир не содержит 1-7 аминокислот, и где антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством или новым введенным свойством относительно того же антитела, которое включает шарнир IgG1 и домен CH1. Антитело может обладать по меньшей мере одним усиленным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителами интернализации рецепторов, ADCC, опосредованной рецептором передачи сигналов, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или новым введенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность. Шарнир может быть шарниром IgG2, в котором отсутствуют 1-4 аминокислоты, напр., аминокислоты C219, C220, V222 и E224. Шарнир представляет собой шарнир IgG1, в котором отсутствуют аминокислоты S219, C220, D221, K222, T223, H224 и T225. Антитело может содержать домен CH1 IgG2 дикого типа или модифицированного; домен CH1 IgG1 дикого типа или модифицированного и домен CH2 IgG1, IgG2 или IgG4 и домен CH3 IgG1, IgG2 или IgG4.

Антитела с модифицированными константными областями тяжелой цепи могут быть человеческими или гуманизированными антителами или их антигенсвязывающими частями. В некоторых вариантах выполнения изобретения антитело специфически связывается с антигеном, который участвует в иммунной регуляции. Антитело может быть агонистом костимулирующего рецептора или антагонистом ингибирующего рецептора. Например, антитело может связываться с костимулирующим рецептором, напр., выбранным из группы B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB, GITR, OX40, ICOS, CD70, CD27, CD40, DR3 или CD28H, или антитело может связываться с ингибирующим рецептором, напр., выбранным из группы CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, Galectin 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectin-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4. Антиген может быть антигеном, который требуется для интернализации, напр., CD73. Антиген может быть CD39.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, специфически связывается с костимулирующим рецептором, напр., GITR, OX40, 4-1BB, CD28, ICOS, CD40, CD27 или любым другим членом суперсемейства TNFR и содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 152-232, 234-245 и 247-262. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело проявляет усиленную или измененную агонистическую активность относительно антитела, имеющего такие же переменные области и легкую цепь, но содержащего константную область тяжелой цепи IgG1.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, специфически связывается с молекулой клеточной поверхности, напр., CD73, и запускает опосредованную антителами интернализацию молекулы клеточной поверхности, и содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-232. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело обладает усиленными или измененными свойствами интернализации по отношению к антителу, имеющему такие же переменные области и легкую цепь, но содержащему константную область тяжелой цепи IgG1. Антитела к CD73 также могут быть связаны с Fc, имеющим любую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 234-245 и 247-262.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, специфически связывается с ингибирующим рецептором, напр., CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, Galectin 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectin-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4 и содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262. В некоторых вариантах выполнения изобретения антитело проявляет более сильную или измененную антагонистическую активность или вводит новую активность относительно того же антитела, имеющего константную область тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах выполнения изобретения Fc содержит одну или несколько мутаций для модуляции, напр., снижения эффекторной функции.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, специфически связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает внутриклеточную передачу сигналов, где антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную

из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262. В определенных вариантах выполнения изобретения внутриклеточная передача сигналов опосредует агонистическую активность, антагонистическую активность, интернализацию молекулы клеточной поверхности или ADCC. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело запускает более мощную внутриклеточную передачу сигналов по сравнению с антителом, имеющим такие же переменные области и легкую цепь, но содержащим константную область тяжелой цепи IgG1.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, специфически связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает образование комплексов высокомолекулярное антитело - молекула клеточной поверхности, где антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело запускает образование комплексов с более высокой молекулярной массой относительно антитела, имеющего такие же переменные области и легкую цепь, но содержащего константную область тяжелой цепи IgG1.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, специфически связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает кластеризацию или олигомеризацию молекулы клеточной поверхности, где антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело запускает больше кластеризации или олигомеризации молекулы клеточной поверхности относительно антитела, имеющего такие же переменные области и легкую цепь, но содержащего константную область тяжелой цепи IgG1.

Изобретение также относится к биспецифическим молекулам, содержащим антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, связанную с молекулой, имеющей вторую специфичность связывания. Изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, связанную со вторым агентом. Изобретение также относится к композиции, содержащей антитело, биспецифический или иммуноконъюгат, описанные в настоящем документе, и носитель. Композиции могут содержать один или несколько дополнительных терапевтических агентов, напр.,

терапевтический агент стимулирует иммунную систему и является, напр., антагонистом ингибитора контрольных точек или костимулирующего рецептора.

Изобретение также относится к способам получения антитела, содержащего модифицированную константную область тяжелой цепи, где антитело содержит домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3 в порядке от N- до С-конца, включающим стадии: (а) предоставления антитела, содержащего шарнир и/или домен CH1, который не является шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2; и (b) замены шарнира и/или домена CH1 шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2 соответственно. Кроме того, в настоящем документе представлены способы повышения интернализации антитела клеткой, включающие: (а) предоставление антитела, содержащего шарнир и/или домен CH1, который не является шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2; и (b) замену шарнира и/или домена CH1 шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2 соответственно. Интернализация антитела может быть увеличена по сравнению с интернализацией того же антитела, содержащего шарнир, не относящийся к изотипу IgG2, напр., антитела, содержащего константную область IgG1. Изобретение также относится к способам повышения агонистической активности антитела, включающим: (а) предоставление антитела, содержащего шарнир и/или домен CH1, который не является шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2; и (b) замену шарнира и/или домена CH1 шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2 соответственно. Агонистическая активность может быть увеличена по сравнению с агонистической активностью того же антитела, содержащего шарнир, не относящийся к изотипу IgG2, напр., антитела, содержащего константную область IgG1. Шарнир IgG2 может представлять собой шарнир человеческого IgG2 дикого типа или может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности шарнира человеческого IgG2 дикого типа, и может включать, напр., последовательность, приведенную в Таблице 4. Способ может включать этап замены по меньшей мере одного из доменов CH1, CH2 или CH3 доменом CH1, CH2 или CH3 другого изотипа соответственно. Способ может включать стадии (а) замены домена CH1 на домен IgG2 CH1; (b) замены домена CH2 на домен CH2 IgG1; и/или (b) замены домена CH3 на домен CH3 IgG1. Способ может включать стадии (а) замены домена CH1 доменом CH1 человеческого IgG2 дикого типа или доменом, идентичным ему по меньшей мере на 95%; (b) замены домена CH2 доменом CH2 человеческого IgG2 дикого типа или доменом, идентичным ему по меньшей мере на 95%; и/или (b) замены домена CH3 доменом CH3 человеческого IgG1 дикого типа или идентичным ему по меньшей мере на 95% доменом. Способ может включать стадию замены константной области тяжелой цепи модифицированной

константной областью тяжелой цепи, содержащей любую из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262, или областью по меньшей мере на 95% идентичной SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262 (или введением в Fc аминокислотных мутаций этих последовательностей). Шарнир может быть модифицирован для уменьшения или изменения образования дисульфидной связи. Шарнир может содержать аминокислотную замену C219S. Шарнир может содержать аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 8, 21-23, 126-132 или 134-147, или последовательность, которая содержит 1-3 аминокислоты, вставленные между CVE и CPP. Домен CH1 может содержать аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO: 7). Домен CH2 может быть модифицирован для уменьшения или устранения эффекторных функций. Домен CH2 может содержать аминокислотные замены A330S и P331S. Домен CH2 может содержать аминокислотную последовательность PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO: 4). Домен CH2 может содержать аминокислотные замены A330S и P331S. Домен CH3 может содержать аминокислотную последовательность

GQPREPQVYTLPPSR~~EE~~MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5).

Изобретение также относится к модифицированным константным областям тяжелой цепи с уменьшенным или необнаруживаемым связыванием с одним или несколькими FcγR (напр., CD16, CD32, CD64). Такие модифицированные константные области тяжелой цепи могут иметь 1-5, 1-3, 1-2 или одну мутацию (напр., замену) относительно константной области тяжелой цепи дикого типа.

Изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающей части, полученным способами, описанными в настоящем документе, напр., изложенными выше, напр., человеческим или гуманизированным антителам. Способы лечения субъекта, напр., субъекта, страдающего раком, любым из антител, описанных в настоящем документе, также включены в настоящий документ. Способы могут включать введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов, напр., терапевтических агентов, которые стимулируют иммунную систему. Например, терапевтический агент может быть нацелен на ингибитор контрольных точек или

костимулирующую молекулу. Способы могут включать введение композиции, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата, описанных в настоящем документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На ФИГ. 1A показана кинетика опосредованной антителами интернализации CD73 в клетках H2228 (клеточная линия немелкоклеточной карциномы легкого) следующими антителами: 11F11, 4C3, 6D11, CD73.3-IgG1.1f с легкой цепью 4C3Vk1 (“3-Vh-hHC-IgG1.1f/4C3Vk1”), CD73.4-IgG2CS с легкой цепью 11F11 Vk2 (“4-Vh-hHC-IgG2-C219S/11F11-Vk2”), CD73.10-IgG2CS (“CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S”), CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f (“CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f”) и CD73.10-IgG1.1f (“CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f”) антителами в клетках H2228. Антитела 11F11 (которое имеет изотип IgG2), CD73.4-IgG2CS, CD73.10-IgG2CS и CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f интернализуются быстрее и в большей степени, чем другие протестированные антитела, которые имеют изотип IgG1.

На ФИГ. 1B показана кинетика опосредованной антителами интернализации CD73 тех же антител, что и на Фигуре 1A, в клетках HCC15 (клеточная линия немелкоклеточной карциномы легкого), демонстрируя результаты, аналогичные полученным в клетках H2228.

На ФИГ. 1C показана кинетика опосредованной антителами интернализации CD73 тех же антител, что и на Фигурах 1A и 1B, а также CD73.11-IgG2CS (“11-Vh-hVC-IgG2-C219S”) в клетках Calu6, демонстрируя результаты, аналогичные полученным в клетках H2228 и HCC15.

На ФИГ. 1D показана кинетика опосредованной антителами интернализации CD73 тех же антител, что показаны на Фигуре 1C в клетках NCI-2030 (линия клеток немелкоклеточной карциномы легкого), демонстрируя результаты, аналогичные полученным в клетках H2228, HCC15 и Calu6.

На ФИГ. 1E показана кинетика опосредованной антителами интернализации CD73 указанных антител в клетках Calu6, измеренная методом проточной цитометрии.

На ФИГ. 1F показана кинетика опосредованной антителами интернализации CD73 указанных антител в клетках NCI-H292 (клеточная линия мукоэпидермоидной карциномы легкого), измеренная с помощью проточной цитометрии, но где антитела не вымывались после первой инкубации клеток с антителами.

На ФИГ. 1G показан процент CD73, интернализованного в клетках Calu6, обработанных указанными антителами, демонстрирующий опосредованную антителами интернализацию CD73 указанных антител в клетках Calu6 с течением времени.

На ФИГ. 1H показан процент CD73, интернализированного в клетках NCI-H292, обработанных указанными антителами с течением времени, демонстрирующий опосредованную антителами интернализацию CD73 указанных антител в клетках NCI-H292 с течением времени.

На ФИГ. 1I показан процент CD73, интернализированного в клетках SNU-C1 (клеточная линия карциномы толстой кишки), обработанных указанными антителами с течением времени, демонстрирующий опосредованную антителами интернализацию CD73 указанных антител в клетках SNU-C1 с течением времени.

На ФИГ. 1J показан процент CD73, интернализированного в клетках NCI-H1437 (клеточная линия немелкоклеточной карциномы легкого), обработанных указанными антителами с течением времени, демонстрирующий опосредованную антителами интернализацию CD73 указанных антител в клетках NCI-H1437 с течением времени.

На ФИГ. 2 показана кинетика связывания указанных антител к GITR человека с антителами против CD3 (планшет покрыт) и CD28-активированными CD4 Т-клетками человека, и их соответствующие значения EC50, полученные из графика.

На ФИГ. 3A, 3B и 3C показана секреция IFN- γ и IL-2 донорными CD4 Т-клетками, стимулированными растворимыми антителами к GITR человека с различными константными участками тяжелой цепи. На ФИГ. 3A показана секреция IFN- γ донорными CD4 Т-клетками, стимулированными экспрессирующими ОКТ3 клетками CHO и различными концентрациями антител к GITR человека с константной областью IgG2-IgG1. На ФИГ. 3B показана секреция IL-2 донорными CD4 Т-клетками, стимулированными экспрессирующими ОКТ3 клетками CHO и различными концентрациями константного домена тяжелой цепи IgG1 или гибридного константного домена тяжелой цепи IgG2-IgG1. На ФИГ. 3C показана секреция IL-2 донорными CD4 Т-клетками, стимулированными экспрессирующими ОКТ3 клетками CHO и различными концентрациями безэффektorных версий (IgG1.1) антител на ФИГ. 3A и B.

На ФИГ. 4 показана секреция IL-2 из клеток 3A9-hGITR, культивированных на планшетах, покрытых моноклональными антителами против CD3, в присутствии возрастающих количеств указанных антител к GITR человека: гибридомы к GITR (IgG2) и рекомбинантных производных, таких как IgG1f, IgG1.1 (безэффektorные) или таких как химера с шарниром IgG2.

На ФИГ. 5A, 5B, 5C и 5D показано влияние шарнира IgG2 на размер комплексов антитело/антиген. На ФИГ. 5A, 5B и 5C показаны данные хроматограмм SEC, данные DLS и данные MALS для комплексов hCD73-his с антителом CD73.4, содержащим

разные константные области. На ФИГ. 5D показана схематическая модель комплексов hCD73-his/mAb, полученных из масс, определенных MALS на ФИГ. 5C.

На ФИГ. 6 показаны данные SEC-MALS для комплексов CD73/mAb.

На ФИГ. 7 показаны данные DLS для комплексов CD73/mAb.

На ФИГ. 8A показан процент CD73, интернализованного в клетках Calu6, обработанных указанными антителами с течением времени, демонстрирующий опосредованную антителами интернализацию CD73 указанных антител в клетках Calu6 в течении времени.

На ФИГ. 8B показан процент CD73, интернализованного в клетках NCI-H292, обработанных указанными антителами с течением времени, демонстрирующий опосредованную антителами интернализацию CD73 указанных антител в клетках Calu6 с течением времени.

На ФИГ. 8C показан уровень CD73 на поверхности клеток Calu6, обработанных 5 мкг/мл указанных антител в течение 0, 5, 15 или 30 минут.

На ФИГ. 9 показан уровень IL-2, секретируемого CD4⁺ Т-клетками, сокультивируемыми с клетками CHO-OKT3 в присутствии антитела к GITR, имеющего указанные константные области.

На ФИГ. 10 показан процент опосредованной антителами интернализации CD73 через 1, 4 или 21 час после добавления каждого из показанных антител. Столбцы для каждого антитела показаны в порядке 21 часа (слева), 4 часов (в середине) и 1 часа (справа).

На ФИГ. 11A показано наложение данных хроматограммы SEC для 1:1 молярных комплексов hCD73-his с 16 различными антителами к CD73.4, содержащими разные последовательности константной области.

На ФИГ. 11B показано расширение данных хроматограммы за 11-19,5 минут хроматограммы на ФИГ. 10A с указанием 4 различных видов элюирования.

На ФИГ. 11C показан процент площади сигнала UV-хроматограммы для пика 2 на ФИГ. 11B, нанесенный на график для 16 различных комплексов антитело/CD73-his. Данные сортируются слева направо в порядке повышения площади пика.

На ФИГ. 12 показано связывание антитела с белками FcγR-his, захватившими анти-his Fab. Ответы на связывание наносят на график в процентах от теоретического R_{max}, предполагая стехиометрию связывания 1:1 mAb:FcγR. Столбцы для каждого антитела показаны в порядке, представленном цветными легендами в нижней части слайда.

На ФИГ. 13 показано связывание антитела с белками FcγR-his, захватившими анти-his Fab. Ответы на связывание представлены в виде процента от теоретического R_{max}, предполагая стехиометрию связывания 1:1 mAb:FcγR. Столбцы для каждого антитела показаны в порядке, представленном цветными легендами в нижней части слайда.

На ФИГ. 14А показано связывание антитела с белками FcγR-his, захватившими анти-his Fab. Ответы на связывание представлены в виде процента от теоретического R_{max}, предполагая стехиометрию связывания 1:1 mAb:FcγR. Столбцы для каждого антитела показаны в порядке, представленном цветными легендами в нижней части слайда.

На ФИГ. 14В показано связывание антитела с белками FcγR-his, захватившими анти-his Fab. Ответы на связывание представлены в виде процента от теоретического R_{max}, предполагая стехиометрию связывания 1:1 mAb:FcγR. Столбцы для каждого антитела показаны в порядке, представленном цветными легендами в нижней части слайда.

На ФИГ. 15 показан анализ динамики интернализации антител к GITR.

На ФИГ. 16А показан анализ совместной локализации GITR и раннего эндосомного маркера EEA2 в нулевой момент времени.

На ФИГ. 16В показан анализ совместной локализации GEA и раннего эндосомного маркера EEA2 через 30 и 120 минут.

На ФИГ. 16С показаны результаты количественного определения эндосомальной совместной локализации, показанной на ФИГ. 16А и 16В, нанесенные на график как отношение интенсивности совместно локализованного пикселя к общему окрашиванию.

На ФИГ. 17А показана активация передачи сигнала NFκB в CD8⁺ Т-клетках, обработанных указанными антителами к GITR.

На ФИГ. 17В показана активация передачи сигналов NFκB в CD4⁺ Т-клетках, обработанных указанными антителами к GITR.

На ФИГ. 18 показана активация p38 в CD4⁺ Т-клетках, обработанных указанными антителами к GITR.

На ФИГ. 19 показана конфигурация дисульфидных связей в антителах IgG2, имеющих конформацию А, В или А/В.

На ФИГ. 20А показан уровень IL-2, секретируемого CD4⁺ Т-клетками, совместно культивируемыми с клетками CHO-OKT3 в присутствии различных концентраций антитела к GITR, имеющего указанные константные области.

На ФИГ. 20В показан уровень IL-2, секретируемого CD4+ Т-клетками, совместно культивируемыми с клетками CHO-ОКТ3 в присутствии 5 мкг/мл антитела к GITR, имеющего указанные константные области (тот же эксперимент, что и на ФИГ. 20А).

На ФИГ. 20С показан уровень IL-2, секретируемого CD4+ Т-клетками, совместно культивируемыми с клетками CHO-ОКТ3 в присутствии 1,25 мкг/мл антитела к GITR, имеющего указанные константные области (тот же эксперимент, что и на ФИГ. 20А).

На ФИГ. 20D показан уровень IL-2, секретируемого CD4+ Т-клетками, совместно культивируемыми с клетками CHO-ОКТ3 в присутствии 0,313 мкг/мл антитела к GITR, имеющего указанные константные области (тот же эксперимент, что и на ФИГ. 20А).

На ФИГ. 21 показана аминокислотная последовательность части hIgG1f, где подчеркнутые последовательности воспроизведены ниже и показывают расположение мутаций в аминокислотных последовательностях hIgG1, hIgG1.1f, hIgG1.3f и hIgG1-P238K относительно IgG1 дикого типа.

На ФИГ. 22А, 22В, 22С, 22D, 22Е, 22F, 22G, 22H, 22I, 22J, 22K и 22L показано сравнение скоростей диссоциации антитела Y1238 в контексте различных областей Fc из указанных рецепторов Fc на основе данных сенсограммы.

На ФИГ. 23А, 23В, 23С, 23D, 23Е и 23F показаны профили заряда для молекул dAb-Fc, которые характеризуются icIEF.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В определенных вариантах выполнения изобретение основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того, что следующие свойства антител усиливаются или изменяются, когда антитела содержат шарнир IgG2, относительно тех же антител, которые содержат шарнир, не относящийся к IgG2 (или относительно тех же антител, которые содержат константную область IgG1): (i) интернализация; (ii) агонистическая функция; (iii) опосредованная рецептором внутриклеточная передача сигналов; (iv) ADCC; и (v) масса комплексов антитело/антиген. Кроме того, эти усиленные или измененные свойства антител дополнительно усиливаются или изменяются, когда антитела содержат, помимо шарнира IgG2, домен CH1 IgG2. Было также отмечено, что антитела, имеющие домен CH1 IgG2, но не шарнир IgG2, обладают усиленной или измененной активностью по сравнению с теми же антителами, имеющими домен CH1 IgG1. Не желая ограничиваться конкретным механизмом действия, было обнаружено, что усиливающие эффекты шарнира IgG2 коррелируют с увеличением размера комплексов антитело/антиген. Увеличенный размер комплексов антитело/антиген, когда антитело имеет шарнир IgG2, может быть результатом более высокой жесткости

шарниров IgG2 по сравнению с жесткостью других изотипов. Кроме того, было показано, что определенные области или аминокислотные остатки шарнира IgG2 и домена CH1 могут быть модифицированы, тогда как другие предпочтительно не модифицированы, для того чтобы сохранить усиленные или измененные активности.

Как дополнительно описано в настоящем документе, эти модифицированные константные области тяжелой цепи, придающие антителам (или их антигенсвязывающим областям) усиленные или модифицированные активности, могут иметь эффекторную функцию. Таким образом, было показано, что могут быть созданы антитела, которые имеют полезные свойства, присущие шарниру IgG2 и/или домену CH1, а также имеют эффекторную функцию.

Изобретение также основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того, что делеция определенных частей шарнира в антителе IgG1 или IgG2 приводит к тому, что антитело обладает усиленными или измененными свойствами по сравнению с антителом с константной областью IgG1.

Также в настоящем документе описаны модифицированные области тяжелой цепи, которые имеют мутации, которые снижают эффекторную функцию ADCC и/или CDC, напр., мутацию P238, напр., P238K, и в некоторых вариантах выполнения изобретения такая одна или более мутация комбинируется с мутацией, которая усиливает (i) интернализацию; (ii) агонистическую функцию; (iii) опосредованную рецептором внутриклеточную передачу сигналов; (iv) ADCC; и/или (v) массу комплексов антитело/антиген.

Соответственно, в настоящем документе представлены (i) антитела, имеющие модифицированные константные области тяжелой цепи, придающие антигенсвязывающим областям антител усиленные или измененные свойства, и способы их применения, и (ii) способы усиления или изменения определенных биологических свойств антител, которые включают шарнир, не относящийся к IgG2, и/или домен CH1, таких как интернализация, агонизм и антагонизм, где способ включает замену шарнира, не относящегося к IgG2, и/или домена CH1 антитела на шарнир IgG2 и/или домен CH1 IgG2 или его часть.

Изобретение относится к «модифицированным константным областям тяжелой цепи», которые усиливают определенные биологические свойства антител, напр., антител, которые имеют шарнир, не относящийся к IgG2, и/или домен CH1, не относящийся к IgG2, по сравнению с теми же антителами, имеющими разные константные области. Типичные модифицированные константные области тяжелой цепи включают шарнир IgG2, домен CH1, домен CH2 и домен CH3, где по меньшей мере один

из этих константных доменов не относится к изотипу IgG2 и может быть, напр., IgG1, IgG3 или IgG4. В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит шарнир IgG2 и домены CH2 и CH3 IgG1. В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 IgG2 и шарнир IgG2. В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 IgG2, шарнир IgG2, домен CH2 IgG1 и домен CH3 IgG1. Модифицированная константная область тяжелой цепи может иметь эффекторную функцию, сходную с таковой у IgG1 дикого типа, или может быть сконструирована так, чтобы иметь пониженную или усиленную эффекторную функцию по сравнению с таковой у IgG дикого типа. Модифицированная константная область тяжелой цепи может содержать домен CH1 дикого типа, шарнир, домен CH2 и/или CH3 или их вариант, напр., CH1, шарнир, CH2 и/или домен CH3, имеющий одну или несколько аминокислотных замен, делеций или добавлений относительно соответствующего домена дикого типа, и/или имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична, или более, соответствующей последовательности дикого типа.

Изобретение также относится к антителам и слитым белкам, содержащим константную область тяжелой цепи IgG1.3. Антитело, содержащее константную область тяжелой цепи IgG1.3, может быть антагонистическим или агонистическим антителом, таким как антагонистическое антитело к ингибитору контрольных точек или агонистическое антитело к стимулятору контрольных точек.

Определения

Для того чтобы настоящее описание было более понятным, сначала даются определения для конкретных терминов. Дополнительные определения излагаются по тексту подробного описания изобретения.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» может включать целые антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (напр., антигенсвязывающий фрагмент, который включает шарнир, антигенсвязывающий фрагмент, который включает шарнир и домен CH1, антигенсвязывающий фрагмент, который включает шарнир и домен CH2 или антигенсвязывающий фрагмент, который включает шарнир, домен CH2 и часть домена CH3) или их отдельные цепи. В одном варианте выполнения изобретения «антитело» относится к белку, напр., гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой

дисульфидными связями, или к его антигенсвязывающей части. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как V_H) и константной области тяжелой цепи. В определенных встречающихся в природе антителах IgG, IgD и IgA константная область тяжелой цепи состоит из шарнира, домена CH1, домена CH2 и домена CH3. В определенных встречающихся в природе антителах каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области V_H и V_L могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L составлена из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (напр., эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Иммуноглобулин может быть любым из широко известных изотипов, включая, но не ограничиваясь этим, IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Изотип IgG подразделяется на подклассы у определенных видов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у человека и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. В определенных вариантах выполнения изобретения антитела, описанные в настоящем документе, относятся к человеческому подтипу IgG1 или IgG2. Иммуноглобулины, напр., человеческий IgG1, существуют в нескольких аллотипах, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. «Антитело» может включать в качестве примера как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и нечеловеческие антитела; полностью синтетические антитела; и одноцепочечные антитела.

В определенных вариантах выполнения изобретения тяжелая цепь антитела содержит С-концевой лизин; С-концевой глицин (потерявшая С-концевой лизин), или не содержит GK, или не содержит K. При ссылке на антитела, содержащие модифицированную константную область тяжелой цепи, описанную в настоящем документе, антитело может содержать раскрытую последовательность, имеющую С-концевой GK или K, или, альтернативно, лишенную GK или K.

Аминокислотная нумерация в соответствии с индексом EU, как у Kabat. Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD, и в соответствии с ФИГ. 3с-3f Публ. Пат. Заявки США No. 2008/0248028.

Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающая часть» антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Антигенсвязывающая часть антитела может представлять собой «шарнир, содержащий антигенсвязывающую часть». Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» антитела, описанного в настоящем документе, включают (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, C_L и C_{H1}; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_{H1}; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341: 544-546), состоящий из домена V_H; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR) или (vii) комбинацию двух или более изолированных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, V_L и V_H, могут быть кодированы отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов, с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть выполненными в виде одной белковой цепи, в которой пара V_L и V областей образует одновалентные молекулы (известные как одноцепочечное Fv (scFv); см., напр., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; и Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающая часть» антитела. Эти и другие потенциальные конструкции описаны в Chan & Carter (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10:301. Эти фрагменты антител получают с использованием общепринятых методик, известных специалистам в данной области, и фрагменты проверяют на пригодность таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части могут быть получены с помощью методик рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

«CDR» варибельного домена представляют собой аминокислотные остатки в гиперварибельной области, идентифицируемые в соответствии с определениями Kabat, Chothia, комбинацией Kabat и Chothia, AbM, контактными и/или конформационным определениями или любым методом определения CDR, хорошо известны в данной

области. CDR антител могут быть идентифицированы как гипервариабельные области, первоначально определенные Kabat et al. См., напр., Kabat et al., 1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Положения CDR также могут быть идентифицированы как структурные петлевые структуры, первоначально описанные Chothia и другими. См., напр., Chothia et al., 1989, *Nature* 342:877-883. Другие подходы к идентификации CDR включают «определение AbM», являющееся компромиссом между Kabat и Chothia и полученное с использованием программного обеспечения для моделирования антител Oxford Molecular's AbM (в настоящее время Accelrys®), или «определение контактов» CDR на основе наблюдаемых контактов антигена, изложенные в MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745. В другом подходе, упоминаемом в настоящем документе как «конформационное определение» CDR, положения CDR могут быть идентифицированы как остатки, которые вносят энтальпийный вклад в связывание антигена. См., напр., Makabe et al., 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166. Тем не менее, другие определения границ CDR могут не строго следовать одному из вышеприведенных подходов, но, тем не менее, будут перекрываться по меньшей мере с частью CDR Kabat, хотя они могут быть сокращены или удлинены в свете прогноза или экспериментальных данных о том, что конкретные остатки, или группы остатков, или даже целые CDR не оказывают значительного влияния на связывание антигена. Как используется в настоящем документе, CDR может относиться к CDR, определенным любым подходом, известным в данной области техники, включая комбинации подходов. Используемые в настоящем документе способы могут использовать CDR, определенные в соответствии с любым из этих подходов. Для любого данного варианта выполнения, содержащего более одного CDR, CDR могут быть определены в соответствии с любым из определений Kabat, Chothia, удлинений, AbM, контактного и/или конформационного определения.

Используемый в настоящем документе термин «изотип» относится к классу антител (напр., антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), которые кодируются генами константного домена тяжелой цепи. Полноразмерная аминокислотная последовательность каждой константной области человеческого IgG дикого типа (включая все домены, т.е., домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3) каталогизируется в базе данных UniProt, доступной в режиме онлайн, например, как P01857 (IgG1), P01859 (IgG2), P01860 (IgG3) и P01861 (IgG4) или их различные аллотипы (SEQ ID NO: 1, 6, 11 и 16 соответственно). В настоящем описании домен константной области тяжелой цепи, напр., шарнир, имеет «изотип IgG1», «изотип IgG2», «изотип IgG3» или «изотип IgG4», если домен содержит аминокислотную последовательность

соответствующего домена соответствующего изотипа или его варианта (который имеет более высокую гомологию с соответствующим доменом соответствующего изотипа, чем с доменом других изотипов).

«Аллотип» относится к встречающимся в природе вариантам в пределах определенной группы изотипов, которые отличаются несколькими аминокислотами (см., напр., Jefferies et al. (2009) mAbs 1:1). Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть любого аллотипа.

Белок «дикого типа» или его часть является разновидностью белка в том виде, в каком он встречается в природе. Аминокислотная последовательность белка дикого типа, напр., константная область тяжелой цепи, представляет собой аминокислотную последовательность белка в том виде, в каком она встречается в природе. Из-за аллотипических различий может быть более одной аминокислотной последовательности для белка дикого типа. Например, существует несколько аллотипов природных константных областей тяжелой цепи человеческого IgG1 (см., напр., Jeffries et al. (2009) mAbs 1:1).

«Область Fc» (область кристаллизуемого фрагмента) или «домен Fc» или «Fc» относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание с рецепторами Fc, расположенными на различных клетках иммунной системы (напр., эффекторных клетках) или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, область Fc антитела изотипа IgG содержит константную область тяжелой цепи антитела за исключением первого домена константной области иммуноглобулина (CH1). В изотипах антител IgG, IgA и IgD область Fc содержит константные домены C_{H2} и C_{H3} в каждой из двух тяжелых цепей антитела; области Fc IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (домены C_H 2-4) в каждой полипептидной цепи. Для IgG область Fc содержит домены иммуноглобулина, состоящие из шарнира, CH2 и CH3. Для целей настоящего изобретения область Fc определяется как начинающаяся с аминокислоты 216 и заканчивающаяся аминокислотой 447, где нумерация соответствует индексу EU, как в Kabat. Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD, и в соответствии с ФИГ. 3с-3f Публ. Пат. Заявки США No. 2008/0248028. Fc может представлять собой нативный (или встречающийся в природе или дикого типа) Fc, включая любой аллотипический вариант, или вариант Fc (напр., не встречающийся в природе Fc), содержащий, напр., 1, 2, 3, 4, 5, 1-5, 1-10 или 5-10 или более аминокислотных мутаций, напр., замены, добавления или делеции. Например, вариант Fc может содержать аминокислотную последовательность,

которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична Fc дикого типа. Модифицированные или мутированные Fc могут иметь усиленную или уменьшенную эффекторную функцию и/или период полужизни. Области CH2 и CH3 являются первичным сайтом эффекторных функций и связывания FcRn. Fc может относиться к этой области изолированно или в контексте Fc-содержащего белкового полипептида, такого как «связывающий белок, содержащий область Fc», также упоминаемого как «Fc-белок слияния» (напр., антитело или иммуноадгезин).

«Эффекторная функция» относится к взаимодействию области Fc антитела с рецептором Fc или лигандом или к биохимическому событию, которое возникает в результате этого. Типичные «эффекторные функции» включают связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), связывание с рецептором Fc, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), и подавление рецептора на клеточной поверхности (напр., рецептора В-клеток; BCR). Для таких эффекторных функций обычно требуется, чтобы область Fc была объединена с доменом связывания (напр., варибельным доменом антитела).

«Рецептор Fc» или «FcR» представляет собой рецептор, который связывается с областью Fc иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом IgG, содержат рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRII и FcγRIII у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIA у людей) и одного ингибирующего (FcγRIIB) рецептора. Различные свойства FcγR человека приведены в Таблице 1. Большинство типов врожденных эффекторных клеток коэкспрессируют один или несколько активирующих FcγR и ингибирующий FcγRIIB, тогда как клетки естественных киллеров (NK) избирательно экспрессируют один активирующий рецептор Fc (FcγRIII у мышей и FcγRIIA у людей), но не экспрессируют ингибирующий FcγRIIB у мышей и людей. Человеческий IgG1 связывается с большинством человеческих рецепторов Fc и считается эквивалентным мышинному IgG2a в отношении типов активирующих рецепторов Fc, с которыми он связывается.

Таблица 1. Свойства человеческих FcγR

Fc γ	Аллельные варианты	Аффинность в отношении человеческого IgG	Предпочтение к изотипу	Распространение в клетках
Fc γ RI (CD64)	Не описаны	Высокая (K _D ~10 нМ)	IgG1=3>4>>2	Моноциты, макрофаги, активированные нейтрофилы, дендритные клетки?
Fc γ RIIA (CD32a)	H131	От низкой до Средней	IgG1>3>2>4	Нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки, тромбоциты
	R131	Низкая	IgG1>3>4>2	
Fc γ RIIA (CD16a)	V158	Средняя	IgG1=3>>4>2	NK-клетки, моноциты, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки?
	F158	Низкая	IgG1=3>>4>2	
Fc γ RIIB (CD32b)	I232	Низкая	IgG1=3=4>2	В-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки
	T232	Низкая	IgG1=3=4>2	

«Шарнир», «шарнирный домен», или «шарнирная область», или «шарнирная область антитела» относится к домену константной области тяжелой цепи, которая соединяет домен СН1 с доменом СН2 и включает в себя верхнюю, среднюю и нижнюю части шарнира (Roux et al. J. Immunol. 1998 161:4083). Шарнир обеспечивает различные уровни гибкости между связывающей и эффекторной областями антитела, а также обеспечивает сайты межмолекулярного дисульфидного связывания между двумя константными областями тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, шарнир начинается у Glu216 и заканчивается у Gly237 для всех изотипов IgG (Roux et al., 1998 J Immunol 161:4083). Последовательности шарниров IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 дикого типа показаны в Таблице 2.

Таблица 2.

Аминокислоты шарнирной области

Тип Ig	С-концевой С _H 1*	Верхний Шарнир	Средний Шарнир	Нижний Шарнир
IgG1	VDKRV (SEQ ID NO:57)	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:59)	CPPCP (SEQ ID NO:64)	APELLGG (SEQ ID NO:70)
IgG2	VDKTV (SEQ ID NO:58)	ERK (SEQ ID NO:60)	CCVECPPCP (SEQ ID NO:65)	APPVAG (SEQ ID NO:71)
IgG3 (17-15-15-15)	VDKRV	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:61)	CPRCP (SEQ ID NO:66) (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (SEQ ID NO:67)	APELLGG
IgG3 (17-15-15)	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₂	APELLGG
IgG3 (17-15)	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₁	APELLGG
IgG3 (15-15-15)	VDKRV	EPKS (SEQ ID NO:62)	CDTPPPCPRCP (SEQ ID NO:68) (EPKSCDTPPPCPRCP) ₂	APELLGG
IgG3 (15)	VDKRV	EPKS	CDTPPPCPRCP	APELLGG
IgG4	VDKRV	ESKYGPP (SEQ ID NO:63)	CPSCP(SEQ ID NO:69)	APEFLGG

* С-концевые аминокислотные последовательности доменов С_H1.

Термин «шарнир» включает шарниры дикого типа (такие указанные в Таблице 3), а также их варианты (напр., не встречающиеся в природе шарниры или модифицированные шарниры). Например, термин «шарнир IgG2» включает шарнир IgG2 дикого типа, показанный в Таблице 3, и варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-

5 и/или не более 5, 4, 3, 2 или 1 мутации, напр., замены, делеции или добавления. Типичные варианты шарниров IgG2 включают шарниры IgG2, в которых 1, 2, 3 или все 4 цистеина (C219, C220, C226 и C229) заменены другой аминокислотой. В конкретном варианте выполнения изобретения шарнир IgG2 содержит замену C219X или C220X, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме цистеина. Шарнир IgG2 может содержать замену, которая сама по себе или вместе с одной или несколькими заменами в других областях тяжелой или легкой цепи приведет к тому, что антитело, содержащее шарнир, примет форму А или В (см., напр., Allen et al. (2009) *Biochemistry* 48:3755). В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир представляет собой гибридный шарнир, который содержит последовательности по меньшей мере из двух изотипов. Например, шарнир может содержать верхний, средний или нижний шарнир от одного изотипа и остаток шарнира от одного или нескольких других изотипов. Например, шарнир может быть шарниром IgG2/IgG1 и может включать, напр., верхний и средний шарниры IgG2 и нижний шарнир IgG1. Шарнир может иметь эффекторную функцию или быть лишен эффекторной функции. Например, нижний шарнир IgG1 дикого типа обеспечивает эффекторную функцию.

Шарнир «не относящийся к IgG2» относится к шарниру, который не относится к изотипу IgG2.

Термин «домен CH1» относится к константной области тяжелой цепи, связывающей вариабельный домен с шарниром в константной области тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, домен CH1 начинается в A118 и заканчивается в V215. Термин «домен CH1» включает в себя домены CH1 дикого типа (такие как имеющие SEQ ID NO: 2 для IgG1 и SEQ ID NO: 7 для IgG2; Таблица 3), а также их варианты (напр., не встречающиеся в природе домены CH1 или модифицированные домены CH1). Например, термин «домен CH1» включает домены CH1 дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или не более 5, 4, 3, 2 или 1 мутации, напр., замены, делеции или добавления. Типичные домены CH1 включают домены CH1 с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полужизни. В настоящем документе представлены модификации домена CH1, которые влияют на биологическую активность антитела.

Термин «домен CH2» относится к константной области тяжелой цепи, связывающей шарнир с доменом CH3 в константном домене тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, домен CH2 начинается в P238 и заканчивается в K340. Термин «домен CH2» включает в себя домены CH2 дикого типа (напр., имеющие SEQ ID NO: 4 для IgG1; Таблица 3), а также их варианты (напр., не встречающиеся в

природе домены CH2 или модифицированные домены CH2). Например, термин «домен CH2» включает в себя домены CH2 дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или не более 5, 4, 3, 2 или 1 мутации, напр., замены, делеции или добавления. Типичные домены CH2 включают домены CH2 с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полужизни. В определенных вариантах выполнения изобретения домен CH2 содержит замены A330S/P331S, которые снижают эффекторную функцию. В настоящем документе представлены другие модификации домена CH2, которые влияют на биологическую активность антитела.

Термин «домен CH3» относится к константной области тяжелой цепи, которая является С-концевой по отношению к домену CH2 в константном домене тяжелой цепи. Как используется в настоящем документе, домен CH3 начинается в G341 и заканчивается в K447. Термин «домен CH3» включает домены CH3 дикого типа (такие как, имеющие SEQ ID NO: 5 для IgG1; Таблица 3), а также их варианты (напр., не встречающиеся в природе домены CH3 или модифицированные домены CH3). Например, термин «домен CH3» включает домены CH3 дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или не более 5, 4, 3, 2 или 1 мутации, напр., замены, делеции или добавления. Типичные домены CH3 включают домены CH3 с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полужизни. В настоящем документе представлены модификации домена CH3, которые влияют на биологическую активность антитела.

Таблица 3

Домен	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
IgG1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKV	2
Шарнир IgG1	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG	3
IgG1 CH2	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	4

IgG1 CH3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	5
IgG2 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT YTCNVDPHKPSNTKVDKTV	7
Шарнир IgG2	ERKCCVECPPCPAPPVAG	8
IgG2 CH2	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK	9
IgG2 CH3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
IgG3 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YTCNVNHPKPSNTKVDKRV	12
Шарнир IgG3	ELKTPLGDTTHTCPRCPE	13
IgG3 CH2	PKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPR CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSFLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK	14
IgG3 CH3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESSGQPENNYNTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	15
IgG4 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDPHKPSNTKVDKRV	17
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPSCPAPEFLGG	18
IgG4 CH2	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSFLTTLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK	

IgG4 CH3	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	20
----------	--	----

Используемый в настоящем документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, которое проявляет единственную специфичность связывания и аффинность для конкретного эпитопа, или композиции антител, в которой все антитела проявляют единственную специфичность связывания и аффинность для конкретного эпитопа. Обычно, такие моноклональные антитела будут получены из одной клетки или нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, и будут передаваться без преднамеренного внесения каких-либо изменений в последовательность. Соответственно, термин «человеческое моноклональное антитело» относится к моноклональному антителу, которое имеет переменные и неопределяемые константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В одном варианте выполнения изобретения моноклональные антитела человека продуцируются гибридомой, например, полученной путем слияния В-клетки, полученной от трансгенного или трансхромосомного животного, не являющегося человеком, например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи, в immortalized клетку.

Термин «рекомбинантное человеческое антитело» в контексте настоящего описания включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как (a) антитела, выделенные из животного (напр., мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным для генов иммуноглобулина человека или полученных из них гибридом, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, напр., из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, в которых используются конкретные последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, которые кодируются генами зародышевой линии, но включают последующие перестройки и мутации, которые возникают, например, во время созревания антитела. Как известно в данной области (см., напр., Lonberg (2005) Nature Biotech. 23(9):1117-1125), переменная

область содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые перестраиваются с образованием антитела, специфичного для чужеродного антигена. В дополнение к перегруппировке переменная область может быть дополнительно модифицирована путем множественных изменений одной аминокислоты (называемых соматической мутацией или гипермутацией) для повышения сродства антитела к чужеродному антигену. Константная область изменится в дальнейшем ответе на антиген (т.е., переключение изотипа). Следовательно, перестроенные и соматически мутированные последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды иммуноглобулинов легкой и тяжелой цепи в ответ на антиген, могут не быть идентичны исходным последовательностям зародышевой линии, но вместо этого будут по существу идентичными или подобными (т.е., иметь по меньшей мере 80% идентичности).

«Человеческое» антитело (HuMAb) относится к антителу, имеющему переменные области, в которых как каркасы, так и области CDR получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также получена из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Описанные в настоящем документе антитела могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (напр., мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*). Тем не менее, термин «антитело человека», используемый в настоящем документе, не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека. Термины «человеческие» антитела и «полностью человеческие» антитела используются как синонимы.

«Гуманизированное» антитело относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR антитела, не принадлежащего человеку, заменены соответствующими аминокислотами, полученными из иммуноглобулинов человека. В одном варианте выполнения изобретения в гуманизированной форме антитела некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR были заменены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в одной или нескольких областях CDR являются неизмененными. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот допустимы, если они не отменяют способность антитела

связываться с конкретным антигеном. «Гуманизированное» антитело сохраняет антигенную специфичность, сходную со специфичностью исходного антитела.

«Химерное антитело» относится к антителу, в котором переменные области получены из одного вида, а константные области получены из другого вида, такому как антитело, в котором переменные области получены из мышиного антитела, а константные области получены из человеческого антитела.

«Биспецифическое» или «бифункциональное антитело» представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелых/легких цепей, дающее в результате два антигенсвязывающих сайта со специфичностью к различным антигенам. Биспецифические антитела могут быть получены различными способами, включая слияние гибридом или связывание фрагментов Fab'. См., напр., Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

Фразы «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфичное к антигену» используются в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

«Выделенное антитело», как используется в настоящем документе, предназначено для обозначения антитела, которое по существу не содержит других антител, имеющих различные антигенные специфичности (напр., выделенное антитело, которое специфически связывается с антигеном «х», по существу, не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от антигена «х»). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом антигена «х», может иметь перекрестную реактивность с другими антигенами «х» белков разных видов.

Используемый в настоящем описании термин «агонистическое антитело» относится к антителу, которое является агонистом костимуляторного рецептора, напр., антителу, которое способно стимулировать иммунную систему (или иммунный ответ) субъекта путем стимуляции активности белка, который, в свою очередь, стимулирует иммунную клетку, напр., Т-клетку, такому как белок B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, или CD27, DR3, или CD28H. В определенных вариантах выполнения изобретения агонистическое антитело представляет собой антитело, которое усиливает активность ингибирующего рецептора, напр., CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 или LAG-3, TIM-3, Galectin 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectin-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, CD73, PD1H, LAIR1, TIM-1 или TIM-4 и тем самым ингибирует иммунный ответ.

Используемый в настоящем документе термин «антагонистическое антитело» относится к антителу, которое является антагонистом ингибирующего сигнала на иммунной клетке, напр., Т-клетке, напр., антителу, которое способно ингибировать или блокировать белок, который ингибирует активацию Т-клетки (напр., ингибиторам контрольных точек иммунного ответа), таким как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 или LAG-3, TIM-3, Galectin 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectin-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, CD73, PD1H, LAIR1, TIM-1 или TIM-4, и таким образом стимулирует иммунный ответ. В определенных вариантах выполнения изобретения антагонистическое антитело представляет собой антитело, которое ингибирует активность стимулирующего рецептора, напр., B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, или CD27, DR3, или CD28H и тем самым ингибирует иммунный ответ.

Как агонистические, так и антагонистические антитела приводят к усилению антиген-специфических Т-клеточных ответов или к ингибированию антиген-специфических Т-клеточных ответов (регуляторы контрольных точек иммунного ответа).

Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к сайту на антигене (напр., GITR), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы внутри белковых антигенов могут образовываться как из смежных аминокислот (обычно, линейный эпитоп), так и из несмежных аминокислот, расположенных рядом с третичным сворачиванием белка (обычно, конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, но не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной структурой, как правило, теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какие эпитопы связаны данным антителом (т.е., картирование эпитопов), хорошо известны в данной области и включают, например, анализы иммуноблоттинга и иммунопреципитации, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды тестируют на реактивность с данным антителом. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают методики, известные в данной области и описанные в настоящем документе, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс (см., напр., *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Термин «встречающийся в природе» используется в настоящем документе применительно к объекту, относящемуся к тому факту, что объект может быть найден в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории, является встречающейся в природе.

«Полипептид» относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка без верхнего предела длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как, но не ограничиваясь этим, гликозилирование, фосфорилирование или дисульфидная связь. «Белок» может содержать один или несколько полипептидов.

Используемый в настоящем документе термин «молекула нуклеиновой кислоты» включает молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой кДНК.

Также изобретение относится к «консервативным модификациям последовательностей» последовательностей, раскрытых в настоящем документе, включая, например, консервативные замены нуклеотидов и аминокислот, а также добавления и делеции нуклеотидов и аминокислот. Например, модификации могут быть введены в SEQ ID NO: 1 - 74 стандартными методиками, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные модификации последовательностей включают консервативные аминокислотные замены, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (напр., лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (напр., аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (напр., глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (напр., аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (напр., треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (напр., тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

В одном варианте выполнения изобретения модификации аминокислотной последовательности константной области тяжелой цепи или ее домена не модифицируют или не аннулируют определенные свойства константной области тяжелой цепи. Эти свойства включают, напр., жесткость или прочность шарнира, а также

агонистическую или антагонистическую активность антитела. В определенных вариантах выполнения изобретения модификации аминокислотной последовательности константной области тяжелой цепи или ее домена действительно изменяют или аннулируют определенные свойства константной области тяжелой цепи.

Способы идентификации аминокислотных консервативных замен, которые аннулируют и не аннулируют свойства антител и/или константных областей, хорошо известны в данной области, напр., как описано в настоящем документе в разделе Примеры.

Для нуклеиновых кислот термин «существенная гомология» указывает, что две нуклеиновые кислоты или их обозначенные последовательности, когда они оптимально выровнены и сравнены, идентичны с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов в по меньшей мере около 80% нуклеотидов, обычно по меньшей мере около от 90% до 95% и более предпочтительно по меньшей мере около от 98% до 99,5% нуклеотидов. В качестве альтернативы, существенная гомологичность существует, когда сегменты будут гибридизоваться в селективных условиях гибридизации с комплементом цепи.

Для полипептидов термин «существенная гомология» указывает, что два полипептида или их обозначенные последовательности, когда они оптимально выровнены и сравнены, идентичны с соответствующими аминокислотными вставками или делециями в по меньшей мере около 80% аминокислот, обычно по меньшей мере от около 90% до 95% и более предпочтительно по меньшей мере от около 98% до 99,5% аминокислот.

Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных позиций, совместно используемых последовательностями, когда последовательности оптимально выровнены (т.е., $\% \text{ гомологии} = \# \text{ идентичных позиций} / \text{общее } \# \text{ положений} \times 100$), при этом оптимальное выравнивание определяется с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с помощью программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступной по адресу <http://www.gcg.com>) с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и веса гэпа 40, 50, 60, 70 или 80 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент

идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может быть также определен с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который внедрен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы веса остатка PAM120, штрафа за удлинение гэпа 12 и штрафа за гэп 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), который был внедрен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступном по адресу <http://www.gcg.com>), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательности нуклеиновой кислоты и белка, описанные в настоящем документе, могут далее использоваться в качестве «запрашиваемой последовательности» для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации связанных последовательностей. Такие поиски могут быть выполнены с помощью программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Поиски нуклеотидов BLAST могут быть выполнены с помощью программы NBLAST, вес = 100, длина слова = 12, с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в настоящем документе. Поиски белка BLAST могут быть выполнены с помощью программы XBLAST, вес = 50, длина слова = 3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белка, описанным в настоящем документе. Для получения выравниваний с гэпами для целей сравнения, может быть использован Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (напр., XBLAST и NBLAST). См. www.ncbi.nlm.nih.gov.

Используемый в настоящем документе термин «антиген» относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антиген может представлять собой полноразмерный или зрелый белок или его фрагмент.

«Иммунный ответ» относится к биологическому ответу у позвоночного на чужеродные агенты, который защищает организм от этих агентов и вызванных ими заболеваний. Иммунный ответ опосредуется действием клетки иммунной системы (напр., Т-лимфоцита, В-лимфоцита, естественной клетки-киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимых

макромолекул, продуцируемых любыми из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), приводящему к селективному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из тела позвоночных патогенных микроорганизмов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток или, в случае аутоиммунного или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека. Иммунная реакция включает, напр., активацию или ингибирование Т-клетки, напр., эффекторной Т-клетки или Th-клетки, такой как CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки, или ингибирование Treg-клетки.

«Иммуномодулятор» или «иммунорегулятор» относится к агенту, напр., компоненту сигнального пути, который может участвовать в модуляции, регуляции или модификации иммунного ответа. «Модулирующий», «регулирующий» или «модифицирующий» иммунный ответ относится к любому изменению в клетке иммунной системы или в активности такой клетки (напр., эффекторной Т-клетки). Такая модуляция включает в себя стимуляцию или подавление иммунной системы, что может проявляться увеличением или уменьшением числа клеток различных типов, увеличением или уменьшением активности этих клеток или любыми другими изменениями, которые могут происходить в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых могут иметь усиленную функцию в микроокружении опухоли. В предпочтительных вариантах выполнения изобретения иммуномодулятор расположен на поверхности Т-клетки. «Иммуномодулирующая мишень» или «иммунорегуляторная мишень» представляет собой иммуномодулятор, который нацелен на связывание, и активность которого изменяется в результате связывания вещества, агента, фрагмента, соединения или молекулы. Иммуномодулирующие мишени включают, например, рецепторы на клеточной поверхности («иммуномодулирующие рецепторы») и рецепторные лиганды («иммуномодулирующие лиганды»).

«Иммунотерапия» относится к лечению субъекта, пораженного или подвергающегося риску заражения или рецидива заболевания, способом, включающим индукцию, усиление, подавление или иное изменение иммунного ответа.

«Иммуностимулирующая терапия» или «иммуностимуляторная терапия» относится к терапии, которая приводит к увеличению (индукции или усилению) иммунного ответа у субъекта, напр., для лечения рака.

«Потенцирование эндогенного иммунного ответа» означает повышение эффективности или потенции существующего иммунного ответа у субъекта. Это увеличение эффективности и потенции может быть достигнуто, например, путем

преодоления механизмов, которые подавляют эндогенный иммунный ответ хозяина, или путем стимулирования механизмов, которые усиливают эндогенный иммунный ответ хозяина.

«Т-эффекторные» («T_{eff}») клетки относятся к Т-клеткам (напр., CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеткам) с цитолитической активностью, а также к Т-хелперным (Th) клеткам, которые секретируют цитокины и активируют и направляют другие иммунные клетки, но не включают регуляторные Т-клетки (Treg-клетки).

Используемый в настоящем документе термин «связанный» относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т.е., рекомбинантно слитой). Такие связи могут быть достигнуты с использованием широкого разнообразия известных в данной области методик, таких как химическое конъюгирование и продуцирование рекомбинантного белка.

Как используется в настоящем документе, «введение» относится к физическому введению композиции, содержащей терапевтический агент, субъекту с применением любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области. Предпочтительные пути введения антител, описанные в настоящем документе, включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза «парентеральное введение» означает способы введения, отличные от энтерального и топического введения, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интралимфатическую, внутричерепную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно, антитело, описанное в настоящем документе, можно вводить непарентеральным путем, таким как топический, эпидермальный или слизистый путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или топически. Введение также может выполняться, например, один раз, несколько раз и/или в течение одного или нескольких длительных периодов.

Используемый в настоящем документе термин «опосредованный Т-клетками ответ» относится к ответу, опосредованному Т-клетками, включая эффекторные Т-клетки (напр., клетки CD8⁺) и хелперные Т-клетки (напр., клетки CD4⁺). Ответы,

опосредованные Т-клетками, включают, например, цитотоксичность и пролиферацию Т-клеток.

Используемый в настоящем документе термин «ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)» относится к иммунному ответу, индуцированному цитотоксическими Т-клетками. Ответы CTL опосредуются, прежде всего, CD8+ Т-клетками.

Используемые в настоящем документе термины «ингибирует» или «блокирует» (напр., относящиеся к ингибированию/блокированию лиганда к его рецептору или к последующему внутриклеточному ответу) используются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. В некоторых вариантах выполнения изобретения антитело ингибирует связывание на по меньшей мере около 50%, напр., на по меньшей мере около 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100%, что определяется, напр., как описано в настоящем описании далее.

Используемый в настоящем документе термин «рак» относится к широкой группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое клеточное деление может привести к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые проникают в соседние ткани и могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровоток.

Термины «лечить», «лечение» и «вылечивание», как они используются в настоящем документе, относятся к любому типу вмешательства или процессу, выполняемому над субъектом, или вводимому активному агенту субъекту с целью обращения, облегчения, улучшения, ингибирования, или замедления, или предотвращения прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. Профилактика относится к введению субъекту, у которого нет заболевания, с целью предотвратить возникновение заболевания или минимизировать его последствия, если оно имеет место.

«Гематологическое злокачественное образование» включает лимфому, лейкоз, миелому или лимфоидное злокачественное образование, а также рак селезенки и лимфатических узлов. Типичные лимфомы включают как В-клеточные лимфомы, так и Т-клеточные лимфомы. В-клеточные лимфомы включают как лимфомы Ходжкина, так и большинство неходжкинских лимфом. Неограничивающие примеры В-клеточных лимфом включают диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому лимфатической ткани, ассоциированную со слизистой оболочкой, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (перекрываются с хроническим

лимфолейкозом), мантийноклеточную лимфому (MCL), лимфому Беркитта, медиастинальную В-крупноклеточную лимфому Беркитта, макроглобулинемию Вальденстрема, узловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, лимфому селезенки из клеток краевой зоны, внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, лимфоматоидный гранулематоз. Неограничивающие примеры Т-клеточных лимфом включают экстранодальную Т-клеточную лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому. Гематологические злокачественные новообразования также включают лейкоз, такой как, но не ограничиваясь этим, вторичный лейкоз, хронический лимфолейкоз, острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и острый лимфобластный лейкоз. Гематологические злокачественные новообразования дополнительно включают миеломы, такие как, но не ограничиваясь этим, множественная миелома и вялотекущая множественная миелома. Другие гематологические и/или В-клеточные или Т-клеточные раковые заболевания охватываются термином гематологические злокачественные новообразования.

Термин «эффективная доза» или «эффективная дозировка» определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта. «Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная дозировка» лекарственного средства или терапевтического агента представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует уменьшение выраженности симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, или профилактике нарушений или инвалидности вследствие заболевания. «Профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективная дозировка» лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом субъекту, подверженному риску развития заболевания или страдающему рецидивом заболевания, тормозит развитие или рецидив заболевания. Способность терапевтического или профилактического агента стимулировать регрессию заболевания или ингибировать развитие или рецидив заболевания можно оценить с использованием различных способов, известных квалифицированному практику, таких как у людей во время клинических испытаний, в системах на животных моделях, прогнозирующих эффективность на людях, или путем анализа активности агента в анализах *in vitro*.

Например, противораковое средство представляет собой лекарственное средство, которое замедляет прогрессирование рака или способствует регрессии рака у субъекта. В предпочтительных вариантах выполнения изобретения терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии рака до момента его устранения. «Содействие регрессии рака» означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, отдельно или в сочетании с противоопухолевым средством, приводит к уменьшению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, предотвращению нарушения или нетрудоспособности из-за заболевания, или иному улучшению симптомов заболевания у пациента. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства ускорять регрессию рака у пациента. Физиологическая безопасность относится к приемлемо низкому уровню токсичности или другим неблагоприятным физиологическим эффектам на клеточном уровне, уровне органов и/или организмов (неблагоприятным эффектам), возникающим в результате введения лекарственного средства.

В качестве примера для лечения опухолей терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли на по меньшей мере около 20%, более предпочтительно на по меньшей мере около 40%, еще более предпочтительно на по меньшей мере около 60 % и еще более предпочтительно на по меньшей мере около 80% по сравнению с нелеченными субъектами. В наиболее предпочтительных вариантах выполнения изобретения терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства полностью ингибирует рост клеток или рост опухоли, т.е., предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли на 100%. Способность соединения ингибировать рост опухоли может быть оценена с использованием анализов, описанных ниже. Альтернативно, это свойство композиции может быть оценено путем изучения способности соединения ингибировать рост клеток, где такое ингибирование может быть измерено *in vitro* с помощью анализов, известных специалисту в данной области. В других предпочтительных вариантах выполнения изобретения, описанных в настоящем документе, регрессия опухоли может наблюдаться и может продолжаться в течение периода по меньшей мере около 20 дней, более предпочтительно по меньшей мере около 40 дней или даже более предпочтительно по меньшей мере около 60 дней.

Термины «пациент» и «субъект» относятся к любому человеку или животному, не являющемуся человеком, которое получает либо профилактическое, либо

терапевтическое лечение. Например, способы и композиции, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения субъекта, страдающего раком. Термин "не являющееся человеком животное" включает всех позвоночных, напр., млекопитающих и не-млекопитающих, таких как приматы, не являющиеся человеком, овца, собака, корова, куры, амфибии, рептилии и т.д.

Различные аспекты, описанные в настоящем документе, описаны более подробно в следующих подразделах.

I. Модифицированные константные области тяжелой цепи

В настоящем документе описаны «модифицированные константные области тяжелой цепи», которые, когда присутствуют в антителах, усиливают или изменяют определенные биологические свойства или свойства антител по сравнению с теми же антителами, которые не имеют модифицированной константной области тяжелой цепи, такими как антитела, которые содержат шарнир, не относящийся к IgG2, напр., антитела IgG1. Усиленные или измененные биологические свойства антител включают:

- (a) повышенную или измененную интернализацию клеткой;
- (b) повышенную или измененную агонистическую активность;
- (c) повышенную или измененную антагонистическую или блокирующую активность;
- (d) усиленную ADCC;
- (d) создание нового свойства;
- (e) повышенную или измененную передачу сигнала;
- (f) образование более крупных сшитых комплексов антитело/антиген;
- (g) усиление кластеризации или олигомеризации поверхностной молекулы клетки-мишени;
- (h) усиление стимуляции или усиление иммунного ответа; и/или
- (i) усиление ингибирования иммунного ответа.

В настоящем документе также представлены антитела, содержащие тяжелые цепи, содержащие одну или несколько аминокислотных мутаций, которые модулируют эффекторную функцию, напр., снижают эффекторную функцию.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, обеспечивает более эффективную интернализацию антителозависимого рецептора (или лиганда, или поверхностной молекулы), напр., антитело интернализирует молекулу-мишень или поверхностную молекулу (напр., рецептор или лиганд) и/или интернализируется само с

более высокой скоростью и/или степенью интернализации в клетку после того, как антитело связывается со своей мишенью на клеточной мембране по сравнению с тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, и содержит, напр., тяжелую цепь IgG1. Скорость и степень интернализации антитела могут быть определены, напр., как показано в Примерах. Скорость интернализации, измеряемая, напр., с помощью $T_{1/2}$ интернализации, напр., как показано в Примерах, может быть усилена или увеличена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз или более, что приводит к снижению $T_{1/2}$ по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз или более. Например, вместо того, чтобы иметь $T_{1/2}$ 10 минут, модифицированная константная область тяжелой цепи может увеличить скорость интернализации и, таким образом, уменьшить $T_{1/2}$ до 5 минут (т.е., двукратное увеличение скорости интернализации или двукратное снижение $T_{1/2}$). « $T_{1/2}$ » определяется как время, за которое достигается половина максимальной интернализации, измеренное с момента добавления антитела в клетки. В определенных вариантах выполнения изобретения $T_{1/2}$ уменьшается по меньшей мере на 10 минут, 30 минут или 1 час. Максимальным уровнем интернализации может быть уровень интернализации на плато графика, представляющего нанесенную на график интернализацию в зависимости от концентрации антитела или времени. Модифицированная константная область тяжелой цепи может увеличить максимальный уровень интернализации антитела по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз или более. Другим способом сравнения эффективности интернализации различных антител, таких как антитело с модифицированной константной областью тяжелой цепи и то же самое антитело без нее, является сравнение их уровня интернализации при данной концентрации антитела (напр., 100 нМ) и/или при данном времени (напр., 2 минуты, 5 минут, 10 минут или 30 минут). Сравнение уровней интернализации также может быть сделано путем сравнения уровней EC_{50} интернализации. Уровень интернализации одного антитела может быть определен относительно уровня интернализации данного (эталонного) антитела, напр., антитела, описанного в настоящем документе, напр., 11F11 или CD73.4-IgG2CS-IgG1, и может быть указан в процентах от значения, полученного с данным (эталонным) антителом. Степень интернализации может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз или более раз по сравнению с любым из этих способов.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, обладает более сильной агонистической активностью по сравнению с тем же антителом, которое не содержит

модифицированную константную область тяжелой цепи, и содержит, напр., тяжелую цепь IgG1. В определенных вариантах выполнения изобретения усиленная активность агониста усиливает стимулирующую активность молекулы-мишени, напр., GITR, или других молекул, которые стимулируют или совместно стимулируют иммунный ответ, напр., активность Т-клеток. В определенных вариантах выполнения изобретения усиленная активность агониста усиливает ингибирующую активность молекулы-мишени, которая ингибирует иммунный ответ, напр., активность Т-клеток (напр., ингибитор контрольных точек). Усиленную агонистическую активность антитела, которое модулирует активность Т-клеток, можно определить, напр., как показано в Примерах, напр., путем измерения уровня секреции IFN- γ или IL-2 из Т-клеток, которые контактируют с антителом. Агонистическая активность антитела, которое связывается со стимулирующей мишенью, может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз или более, как это определено по увеличению высвобождения цитокинов или увеличению пролиферации эффекторных Т-клеток; снижению активности регуляторных Т-клеток, если участие в Treg снижает функцию Treg; или увеличенному истощению Treg. Например, количество IFN- γ или IL-2, секретируемого из Т-клеток, стимулированных антителом, которое связывается со стимулирующей мишенью, содержащей модифицированную константную область тяжелой цепи, может составлять по меньшей мере в 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз или более выше, чем у Т-клеток, имитированных тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи. Агонистическая активность антитела, которое связывается с ингибирующей мишенью, может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз или более, что определяется уменьшенным высвобождением цитокинов или уменьшенной пролиферацией эффекторных Т-клеток; повышенной активностью регуляторных Т-клеток; или уменьшенным истощением Treg. Например, количество IFN- γ или IL-2, секретируемого из Т-клеток, стимулированных антителом, которое связывается с ингибирующей мишенью, содержащей модифицированную константную область тяжелой цепи, может составлять по меньшей мере 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз или ниже, чем у Т-клеток, имитируемых тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, обладает более сильным антагонистическим или блокирующим действием по сравнению с тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, и

содержит, напр., тяжелую цепь IgG1. Усиленную антагонистическую активность антитела можно определить, напр., путем измерения высвобождения и/или пролиферации цитокинов в условиях, которые включают условия активации Т-клеток. Антагонистическая активность может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 и более раз.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, обладает усиленной активностью ADCC по сравнению с тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, и содержит, напр., тяжелую цепь IgG1. Усиленная ADCC может быть определена в соответствии со способами, известными в данной области техники. ADCC может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, в 2 раза, в 5 раз или более.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, обладает способностью образовывать более крупные сшитые комплексы антитело/антиген по сравнению с тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, и содержит, напр., тяжелую цепь IgG1. Способность образовывать комплексы можно определить, как описано, напр., в Примерах. Комплексы антитело/антиген, образованные с антителом, которое содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, могут быть по меньшей мере на 50%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз или 10 раз больше, чем комплексы, образованные с тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи. В определенных вариантах выполнения изобретения комплексы по меньшей мере 2000 кДа; 3000 кДа; 5000 кДа; 10000 кДа, 50000 кДа или 100000 кДа образуются с антителами, имеющими модифицированную константную область тяжелой цепи.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, запускает большую кластеризацию или олигомеризацию молекулы-мишени на клеточной поверхности по сравнению с тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, и содержит, напр., тяжелую цепь IgG1. Степень кластеризации олигомеризации можно определить, напр., путем измерения размера комплексов антитело/антиген.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, трансдуцирует передачу сигналов или сигнальную трансдукцию более высокого уровня или другого типа по

сравнению с тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, и содержит, напр., тяжелую цепь IgG1. Сигнальная трансдукция может контролироваться путем определения уровня активации одного или нескольких белков в путях сигнальной трансдукции. В определенных вариантах выполнения изобретения сигнальная трансдукция определяется путем измерения активности (или фосфорилирования) белка сигнальной трансдукции, напр., NFkB или p38, как описано, напр., в Примерах. Сигнальная трансдукция, запускаемая антителом, которое содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, может быть выше или ниже по меньшей мере на 10%, 20%, 50%, в 2 раза, 5 раз или более, чем сигнальная трансдукция с тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи. Например, сигнальная трансдукция, запускаемая антителом, которое связывается со стимулирующей молекулой (напр., GITR) и содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, может быть усилена по меньшей мере на 10% по сравнению с трансдукцией, полученной с тем же антителом, имеющим тяжелую цепь IgG1. Например, EC₅₀ активности NFkB или p38 (напр., фосфорилирования) может быть уменьшено по меньшей мере на 50%, в 2 раза, в 5 раз или более.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, обладает повышенной способностью стимулировать или усиливать иммунный ответ или иммунную систему по сравнению с тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, и содержит, напр., тяжелую цепь IgG1. Повышенная способность стимулировать иммунный ответ или иммунную систему может быть результатом усиленной агонистической активности Т-клеточных костимуляторных рецепторов и/или усиленной антагонистической активности ингибирующих рецепторов. Повышенная способность стимулировать иммунный ответ или иммунную систему может отражаться в кратном увеличении EC₅₀ или максимального уровня активности в анализе, в котором измеряется иммунный ответ, напр., анализе, в котором измеряются изменения в высвобождении цитокинов или хемокинов, цитолитической активности (определяется непосредственно на клетках-мишенях или опосредованно через обнаружение CD107a или гранзимов) и пролиферации. Способность стимулировать иммунный ответ или активность иммунной системы может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, в 3 раза, в 5 раз или более.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, обладает повышенной

антипролиферативной или противоопухолевой активностью по сравнению с тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, и содержит, напр., тяжелую цепь IgG1. Усиленная противоопухолевая активность антитела может быть определена, например, по росту опухоли у животного, которое было обработано антителом. Противоопухолевая активность может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз и более. Противоопухолевая активность может быть измерена, напр., как уменьшение бремени опухоли, напр., выраженное в уменьшенной кинетике роста опухоли и полной регрессии опухоли.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, обладает повышенной способностью ингибировать или подавлять иммунный ответ или иммунную систему по сравнению с тем же антителом, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, и содержит, напр., тяжелую цепь IgG1. Повышенная способность ингибировать или подавлять иммунный ответ или иммунную систему может быть результатом усиленной антагонистической активности Т-клеточных костимуляторных рецепторов и/или усиленной агонистической активности ингибирующих рецепторов. Повышенная способность стимулировать иммунный ответ или иммунную систему может отражаться в кратном увеличении EC_{50} или максимальном уровне активности в анализе, в котором измеряется иммунный ответ, напр., анализе, в котором измеряются изменения в высвобождении цитокинов или хемокинов, цитолитической активности (определяется непосредственно на клетках-мишенях или опосредованно через обнаружение CD107a или гранзимов) и пролиферации. Способность ингибировать или подавлять иммунный ответ или активность иммунной системы может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз и более.

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи или ее часть, напр. шарнир, является более жесткой по сравнению с другими константными областями тяжелой цепи, напр., константными областями тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4. Например, модифицированная константная область тяжелой цепи представляет собой не встречающуюся в природе константную область тяжелой цепи, которая является более жесткой или имеет часть, напр., шарнир, которая является более жесткой, чем природная константная область тяжелой цепи или ее шарнир. Жесткость константной области тяжелой цепи или ее части, такой как шарнир, может быть определена, напр., с помощью компьютерного моделирования, электронной микроскопии, спектроскопии, такой как Ядерный Магнитный Резонанс (ЯМР), рентгеновской кристаллографии (В-факторы) или

Аналитическим ультрацентрифугированием со Скоростной Седиментацией (AUC) для измерения или сравнения радиуса вращения антител, содержащих шарнир. Альтернативно, жесткость константной области тяжелой цепи или ее части может быть определена путем измерения размеров комплексов антитело/антиген, напр., как далее описано в настоящем документе.

Понятно, что антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи и обладающее усиленным функциональным свойством, которое определяется в соответствии с методиками, известными в данной области техники, и описанное в настоящем документе, относится к статистически значимому различию в конкретной активности относительно активности, наблюдаемой в том же антителе, но с другой константной областью тяжелой цепи.

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит шарнир изотипа IgG2 («шарнир IgG2») и домен CH1, CH2 и CH3. В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит шарнир IgG2 и домен CH1, CH2 и CH3, где по меньшей мере один из доменов CH1, CH2 и CH3 не относится к изотипу IgG2. В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит шарнир IgG2 и домен CH1, CH2 и CH3, где константный домен тяжелой цепи не является константной областью IgG2 дикого типа или не является константной областью IgG2 с мутацией в аминокислоте 219 или 220. Шарнир IgG2 может представлять собой шарнир IgG2 дикого типа, напр., шарнир человеческого IgG2 дикого типа (напр., имеющий SEQ ID NO: 8) или его вариант, при условии, что шарнир IgG2 сохраняет способность придавать антителу усиленную активность по сравнению с тем же антителом, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или содержит тяжелую цепь IgG1. В определенных вариантах выполнения изобретения шарнирный вариант IgG2 сохраняет жесткость или прочность, аналогичные таковым для шарнира IgG2 дикого типа. Жесткость шарнира может быть определена, напр., с помощью компьютерного моделирования, электронной микроскопии, спектроскопии, такой как Ядерный Магнитный Резонанс (ЯМР), рентгеновской кристаллографии (В-факторы) или Аналитическим ультрацентрифугированием со Скоростной Седиментацией (AUC) для измерения или сравнения радиуса вращения антител, составляющих шарнир. Шарнир имеет такую же или более высокую жесткость относительно жесткости другого шарнира, если антитело, содержащее шарнир, имеет значение, полученное в результате одного из испытаний, описанных в предыдущем предложении, которое отличается от значения того же

антитела с другим шарниром, напр., шарниром IgG1, менее чем на 5%, 10%, 25%, 50%, 75% или 100%. Специалист в данной области сможет определить по результатам испытаний, имеет ли шарнир по меньшей мере жесткость, аналогичную жесткости другого шарнира, путем интерпретации результатов этих испытаний.

Примером варианта шарнира человеческого IgG2 является шарнир IgG2, который содержит замену одного или нескольких из четырех остатков цистеина (т.е., C219, C220, C226 и C229) другой аминокислотой. Цистеин может быть заменен серином. Типичным шарниром IgG2 является шарнир человеческого IgG2, содержащий мутацию C219X или мутацию C220X, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме цистеина. В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир IgG2 не содержит замены как C219X, так и C220X. В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир IgG2 содержит C219S или C220S, но не одновременно C219S и C22S. Другие варианты шарнира IgG2, которые можно использовать, включают шарниры человеческого IgG2, содержащие замену C220, C226 и/или C229, напр., мутацию C220S, C226S или C229S (которая может сочетаться с мутацией C219S). Шарнир IgG2 также может представлять собой шарнир IgG2, в котором часть шарнира является частью другого изотипа (т.е., представлять собой химерный или гибридный шарнир), при условии, что жесткость химерного шарнира по меньшей мере аналогична жесткости шарнира IgG2 дикого типа. Например, шарнир IgG2 может быть шарниром IgG2, в котором нижний шарнир (как определено в Таблице 2) имеет изотип IgG1 и, напр., является нижним шарниром IgG1 дикого типа.

«Гибридный» или «химерный» шарнир относится к специфическому изотипу, если более половины последовательных аминокислот шарнира происходят из этого изотипа. Например, шарнир, имеющий верхний и средний шарнир IgG2 и нижний шарнир IgG1, считается гибридным шарниром IgG2.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, которая содержит шарнир IgG2, содержащий последовательность, приведенную в Таблице 4, напр., одну из следующих аминокислотных последовательностей: 8, 21, 22, 23, 126-129 и 134-147. В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир содержит SEQ ID NO: 8, 21, 126, 134 или 135, где 1, 2, 3 или все 4 аминокислоты P233, V234, A235 и G237 (соответствующие С-концевым 4 аминокислотам «PVAG» (SEQ ID NO: 148) удаляются или заменяются другой аминокислотой, напр., аминокислотами С-конца шарнира IgG1 (ELLG (SEQ ID NO: 149) или ELLGG (SEQ ID NO: 150)). В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир содержит SEQ ID NO: 8, 21, 126, 134 или 135, где V234,

A235 и G237 удалены или заменены другой аминокислотой. В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир содержит SEQ ID NO: 8, 21, 126, 134 или 135, где A235 и G237 удалены или заменены другой аминокислотой. В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир содержит SEQ ID NO: 8, 21, 126, 134 или 135, где G237 удален или заменен другой аминокислотой. В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир содержит SEQ ID NO: 8, 21, 126, 134 или 135, где V234 и A235 удалены или заменены другой аминокислотой. Замена PVAG (SEQ ID NO: 143) в IgG2 соответствующими аминокислотами шарнира IgG1, т.е., (ELLG (SEQ ID NO: 144) или ELLGG (SEQ ID NO: 145)), для получения гибридного шарнира, имеющего SEQ ID NO: 22 или 138, или его вариантов (см., напр., Таблицу 4), обеспечивает шарнир, имеющий преимущества шарнира IgG2 и эффекторную функцию шарниров IgG1.

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит шарнир, который состоит из или состоит по существу из одной из последовательностей в Таблице 4, напр., SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 127-132 и 134-141, и в определенных вариантах выполнения изобретения не содержит дополнительных шарнирных аминокислотных остатков.

Таблица 4: Типичные шарниры IgG2

Описание шарнира IgG2	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
IgG2 Дикого типа	ERKCCVECPCPAPPVAG	8
IgG2 с C219S	ERKSCVECPCPAPPVAG	21
IgG2 с C220S	ERKCSVECPCPAPPVAG	126
IgG2 с C219X	ERKXCVECPCPAPPVAG	134
IgG2 с C220X	ERKCXVECPCPAPPVAG	135
IgG2 Дикого типа с С-концевым X	ERKCCVECPCPAPPVAGX	143
IgG2 с C219S с С-концевым X	ERKSCVECPCPAPPVAGX	144
IgG2 с C220S с С-концевым X	ERKCSVECPCPAPPVAGX	145
IgG2 с C219X с С-концевым X	ERKXCVECPCPAPPVAGX	146
IgG2 с C220X с С-концевым X	ERKCXVECPCPAPPVAGX	147
IgG2/IgG1 гибрид	ERKCCVECPCPAPELLGG	22
IgG2/IgG1 гибрид с C219S	ERKSCVECPCPAPELLGG	23
IgG2/IgG1 гибрид с C220S	ERKCSVECPCPAPELLGG	127
IgG2/IgG1 гибрид с C219X	ERKXCVECPCPAPELLGG	136

IgG2/IgG1 гибрид с C220X	ERKCXVECPPCPAPELLG	137
IgG2/IgG1 гибрид deltaG	ERKCCVECPPCPAPELLG	138
IgG2/IgG1 гибрид с C219S deltaG	ERKSCVECPPCPAPELLG	139
IgG2/IgG1 гибрид с C220S deltaG	ERKCSVECPPCPAPELLG	140
IgG2/IgG1 гибрид с C219X deltaG	ERKXCVECPPCPAPELLG	141
IgG2/IgG1 гибрид с C220X deltaG	ERKCXVECPPCPAPELLG	142
Усеченный IgG2 дикого типа	ERKCCVECPPCPAP	128
Усеченный IgG2 дикого типа с C219S	ERKSCVECPPCPAP	129
Усеченный IgG2 дикого типа с C220S	ERKCSVECPPCPAP	130
Усеченный IgG2 дикого типа с C219X	ERKXCVECPPCPAP	131
Усеченный IgG2 дикого типа с C220X	ERKCXVECPPCPAP	132

Х представляет собой любую аминокислоту, кроме цистеина.

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит шарнир IgG2, представленный в Таблице 4, в которой 1-5, 1-3, 1-2 или 1 аминокислота вставлена между аминокислотными остатками CVE и CPP. В определенных вариантах выполнения изобретения вставлены THT или GGG. В определенных вариантах выполнения изобретения между шарниром и доменом CH2 может быть вставлена 1, 1-2 или 1-3 аминокислоты. Например, дополнительный глицин может быть вставлен между шарниром и доменом CH2.

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи представляет собой константную область IgG1 или IgG2, где шарнир содержит делецию из 1-10 аминокислот. Как показано в Примерах, антитело IgG1, лишенное аминокислотных остатков SCDKTHT (S219, C220, D221, K222, T223, H224 и T225; SEQ ID NO: 151), обеспечивало опосредованную антителом интернализацию CD73 более эффективно, чем то же антитело, имеющее константную область IgG1 дикого типа. Аналогично в контексте антитела IgG2, антитело IgG2, лишенное аминокислотных остатков CCVE (C219, C220, V222 и E224; SEQ ID NO: 152), обеспечивало интернализацию CD73, опосредованную антителами, более эффективно, чем то же антитело, имеющее константную область IgG1 дикого типа. Соответственно,

в настоящем документе представлены модифицированные константные области тяжелой цепи, в которых шарнир содержит делецию из 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислотных остатков, выбранных из остатков S219, C220, D221, K222, T223, H224 и T225 для антитела IgG1 и остатков C219, C220, V222 и E224 для антитела IgG2.

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи включает домен CH1, который представляет собой домен CH1 дикого типа изотипа IgG1 или IgG2 («домен CH1 IgG1» или «домен CH1 IgG2» соответственно). Также можно использовать домены CH1 изотипов IgG3 и IgG4 («домен CH1 IgG3» и «домен CH1 IgG2» соответственно). Домен CH1 также может представлять собой вариант домена CH1 дикого типа, напр., вариант домена CH1 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Типичные варианты доменов CH1 включают A114C, C131S и/или T173C. Домен CH1, напр., домен CH1 IgG2, может содержать замену C131S, которая связана с антителом IgG2 или антителом, имеющим CH1 IgG2, и шарнир формы В (или конформации).

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит домен CH1, который имеет изотип IgG2. В некоторых вариантах выполнения изобретения домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG2 дикого типа, напр., имеющий аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSNEGTQTYTCNV~~D~~HKPSN~~T~~KVDKTV (SEQ ID NO: 7).

В определенных вариантах выполнения изобретения домен CH1 представляет собой вариант SEQ ID NO: 7 и содержит 1-10, 1-5, 1-2 или 1 аминокислотные замены или делеции относительно SEQ ID NO: 7. Как дополнительно описано в Примерах, в настоящем документе было показано, что домен CH1 IgG2 или его варианты придают усиленные свойства антителам относительно антител IgG1 и даже более усиленные свойства, когда антитела также содержат шарнир IgG2. В определенных вариантах выполнения изобретения варианты CH1 IgG2 не содержат аминокислотную замену или делецию в одном или нескольких из следующих аминокислотных остатков: C131, R133, E137 и S138, причем эти аминокислотные остатки показаны жирным шрифтом и подчеркнуты в SEQ ID NO: 7, показанной выше. Например, модифицированная константная область тяжелой цепи может содержать домен CH1 IgG2, в котором ни один из R133, E137 и S138 не заменен другой аминокислотой или удален, или в котором ни один из C131, R133, E137 и S138 не заменен другой аминокислотой или удален. В определенных вариантах выполнения изобретения C131 заменен другой аминокислотой, напр., C131S, замена которой запускает антитело для принятия конформации В. Было

показано, что как антитела конформации А, так и антитела конформации В, имеющие модифицированные константные области тяжелой цепи, обладают усиленной активностью относительно того же антитела с константной областью IgG1.

В определенных вариантах выполнения изобретения N192 и/или F193 (показанные как выделенные курсивом и подчеркнутые остатки в SEQ ID NO: 7, показанной выше) заменены другой аминокислотой, напр., соответствующими аминокислотами в IgG1, т.е., N192S и/или F193L.

В определенных вариантах выполнения изобретения один или несколько аминокислотных остатков домена CH1 IgG2 заменены соответствующими аминокислотными остатками в IgG4. Например, N192 может быть N192S; F193 может быть F193L; C131 может быть C131K; и/или T214 может быть T214R.

Антитело может содержать модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую домен CH1 IgG2 или его вариант и шарнир IgG2 или его вариант. Шарнир и домен CH1 могут представлять собой комбинацию любого шарнира IgG2 и домена CH1 IgG2, описанных в настоящем документе. В определенных вариантах выполнения изобретения CH1 IgG2 и шарнир включают следующую аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSMEGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 133) или аминокислотную последовательность, которая отличается от нее не более чем в 1-10 аминокислот. Варианты аминокислот являются такими, как описано для шарнира и доменов CH1 выше.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержат по меньшей мере шарнир IgG2 и, необязательно, также домен CH1 IgG2, или фрагмент, или производное шарнира и/или домена CH1, и антитело принимает форму (конформацию) А (см., напр., Allen et al. (2009) Biochemistry 48:3755). В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержат по меньшей мере шарнир IgG2 и, необязательно, также домен или фрагмент CH1 IgG2 или производное шарнира и/или домена CH1, и антитело принимает форму В (см., напр., Allen et al. (2009) Biochemistry 48:3755).

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит домен CH2, который представляет собой домен CH2 дикого типа изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 («домен CH2 IgG1», «домен CH2 IgG2», «домен CH2 IgG3» или «домен CH2 IgG4» соответственно. Домен CH2 также может представлять собой вариант домена CH2 дикого типа, напр., вариант домена CH2

IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Типичные варианты доменов CH2 включают варианты, которые модулируют биологическую активность области Fc антитела, такую как ADCC или CDC, или модулируют период полужизни антитела или его стабильность. В одном варианте выполнения изобретения домен CH2 представляет собой домен CH2 человеческого IgG1 с мутацией A330S и/или P331S, где домен CH2 обладает пониженной эффекторной функцией относительно той же самой мутации CH2 без мутаций. Домен CH2 может иметь усиленную эффекторную функцию. Домены CH2 могут содержать одну или несколько из следующих мутаций: SE (S267E), SELF (S267E/L328F), SDIE (S239D/I332E), SEFF, GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E) и/или одну или несколько мутации в следующих аминокислотах: E233, L235, G237, P238, H268, P271, L328, A330 и K322. Обращается внимание на то, что некоторые из этих мутаций на самом деле являются частью шарнира, а не домена CH2, как определено в настоящем документе. Другие мутации дополнительно изложены в настоящем документе в другом месте.

В определенных вариантах выполнения изобретения модифицированная константная область тяжелой цепи содержит домен CH3, который представляет собой домен CH3 дикого типа изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 («домен CH3 IgG1», «домен CH3 IgG2», «домен CH3 IgG3» или «домен CH3 IgG4» соответственно. Домен CH3 также может представлять собой вариант домена CH3 дикого типа, напр., вариант домена CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Типичные варианты доменов CH3 включают варианты, которые модулируют биологическую активность области Fc антитела, такую как ADCC или CDC, или модулируют период полужизни антитела или его стабильность.

Как правило, варианты CH1, шарнира, доменов CH2 или CH3 могут включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более мутаций и/или не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутации, или 1-10, или 1-5 мутаций, или содержат аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична таковой для соответствующего домена дикого типа (CH1, шарнир, домен CH2 или CH3 соответственно) при условии, что константная область тяжелой цепи, содержащая конкретный вариант, сохраняет необходимую биологическую активность.

В Таблице 5 приведены типичные константные области тяжелой цепи человека, содержащие CH1, шарнир, домены CH2 и/или CH3 человека, где каждый домен представляет собой либо домен дикого типа, либо его вариант, который обеспечивает требуемую биологическую активность константной области тяжелой цепи. Незаполненная клетка в Таблице 5 указывает, что домен присутствует или нет, и, если он присутствует, может иметь любой изотип, напр., IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Например, антитело, содержащее константную область 1 тяжелой цепи в Таблице 5, представляет собой антитело, которое содержит константную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере шарнир IgG2, и которое также может содержать домен CH1, CH2 и/или CH3, и, если присутствует, то домен CH1, CH2 и/или CH3 имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В качестве другого примера для понимания Таблицы 5 антитело, содержащее константную область 8 тяжелой цепи, представляет собой антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, содержащую домен CH1 IgG1 и шарнир IgG2, домен CH2 IgG1, и которое может также содержать или не содержать домен CH3, который присутствует и может иметь изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Таблица 5

МНССР*	CH1	Шарнир	CH2	CH3
1		IgG2		
2	IgG1	IgG2		
3	IgG2	IgG2		
4		IgG2	IgG1	
5		IgG2	IgG2	
6		IgG2		IgG1
7		IgG2		IgG2
8	IgG1	IgG2	IgG1	
9	IgG1	IgG2	IgG2	
10	IgG2	IgG2	IgG1	
11	IgG2	IgG2	IgG2	
12	IgG1	IgG2		IgG1
13	IgG1	IgG2		IgG2
14	IgG2	IgG2		IgG1
15	IgG2	IgG2		IgG2
16		IgG2	IgG1	IgG1
17		IgG2	IgG1	IgG2
18		IgG2	IgG2	IgG1
19		IgG2	IgG2	IgG2
20	IgG1	IgG2	IgG1	IgG1
21	IgG1	IgG2	IgG1	IgG2

22	IgG1	IgG2	IgG2	IgG1
23	IgG1	IgG2	IgG2	IgG2
24	IgG2	IgG2	IgG1	IgG1
25	IgG2	IgG2	IgG1	IgG2
26	IgG2	IgG2	IgG2	IgG1
27	IgG2	IgG2	IgG2	IgG2

* Модифицированная константная область тяжелой цепи

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, показанную в Таблице 5, обладает усиленной биологической активностью по сравнению с тем же антителом, содержащим константную область тяжелой цепи, которое не содержит эту специфическую константную область тяжелой цепи, или относительно того же антитела, которое содержит константную область IgG1.

В определенных вариантах выполнения изобретения способ улучшения биологической активности антитела, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2, и/или домен CH1, не относящийся к IgG2, включает предоставление антитела, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2, и/или домен CH1, не относящийся к IgG2, и замену шарнира, не относящегося к IgG2, и домена CH1, не относящегося к IgG2, шарниром IgG2 и доменом CH1 IgG2 соответственно. Способ улучшения биологической активности антитела, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, может включать предоставление антитела, которое не содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, и замену его константной области тяжелой цепи модифицированной константной областью тяжелой цепи.

Типичные модифицированные константные области тяжелой цепи представлены в Таблице 6, в которой указывается идентичность каждого из доменов.

Таблица 6

Модифицированная константная область тяжелой цепи	CH1	Шарнир	CH2	CH3	SEQ ID NO целой MHCCR

IgG1-IgG2-IgG1	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:2	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:22	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:4	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:26
IgG1-IgG2-IgG12	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:2	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:8	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:4	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:27
IgG1-IgG2CS-IgG1	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:2	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:23	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:4	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:32
IgG1-IgG2CS-IgG12	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:2	IgG2 C219S SEQ ID NO:21	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:4	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:33
IgG2-IgG1	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:7	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:22	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:4	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:28
IgG2-IgG12	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:7	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:8	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:4	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:29

IgG2CS-IgG1	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:7	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:23	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:4	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:34
IgG2CS-IgG12	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:7	IgG2 C219S SEQ ID NO:21	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:4	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:35
IgG1CH1- IgG2Шарнир- IgG1CH2 (A330S, P331S)-IgG1CH3 или IgG1-IgG2-IgG1.1	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:2	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:8	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:24	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:30
IgG1CH1-IgG2 Шарнир(C219S)- IgG1CH2(A330S, P331S)-IgG1CH3 или IgG1-IgG2CS-IgG1.1	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:2	IgG2 C219S SEQ ID NO:21	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:24	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:36
IgG2-IgG1.1	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:7	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:8	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:24	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:31

IgG2CS-IgG1.1	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:7	IgG2 C219S SEQ ID NO:21	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:24	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:37
---------------	--	----------------------------	--	--	-----------------

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую шарнир IgG2, содержащий любую одну из SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 и 137 или ее вариант, такой как шарнир IgG2, содержащий аминокислотную последовательность, которая (i) отличается от любой из SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 и 137 заменами, добавлениями или делециями 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот; (ii) отличается от любой из SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 и 137 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от любой из SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 и 137 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 или 137, где в любом из (i) - (iv) аминокислотная замена может быть консервативной аминокислотной заменой или неконсервативной аминокислотной заменой; и где модифицированная константная область тяжелой цепи обладает усиленной биологической активностью относительно активности другой константной области тяжелой цепи, напр., константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или относительно той же модифицированной константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир содержит последовательность, которая является вариантом любой из SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 и 137, где R217 (вторая аминокислота в шарнире IgG2 дикого типа (SEQ ID NO: 8) не удалена или не заменена другой аминокислотой. В определенных вариантах выполнения изобретения, в которых шарнир представляет собой вариант любой из SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 и 137, шарнир имеет жесткость, аналогичную жесткости IgG2 дикого типа.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую домен CH1 IgG1,

содержащий SEQ ID NO: 2, или домен CH1 IgG2, содержащий SEQ ID NO: 7, или вариант SEQ ID NO: 2 или 7, причем этот вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 2 или 7 заменами, добавлениями или делециями 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот; (ii) отличается от SEQ ID NO: 2 или 7 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO: 2 или 7 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 2 или 7, где в любом из (i) - (iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и где модифицированная константная область тяжелой цепи обладает усиленной биологической активностью относительно активности другой константной области тяжелой цепи, напр., константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или относительно той же модифицированной константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую домен CH2 IgG1, содержащий SEQ ID NO: 4 или 24, или вариант SEQ ID NO: 4 или 24, причем этот вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 4 или 24 заменами, добавлениями или делециями 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот; (ii) отличается от SEQ ID NO: 4 или 24 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO: 4 или 24 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 4 или 24, где в любом из (i) - (iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и где модифицированная константная область тяжелой цепи обладает усиленной биологической активностью относительно активности другой константной области тяжелой цепи, напр., константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или относительно той же модифицированной константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую домен CH3 IgG1, содержащий SEQ ID NO: 5, или вариант SEQ ID NO: 5, причем этот вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 5 заменами, добавлениями или делециями 1, 2, 3, 4 или 5

аминокислот; (ii) отличается от SEQ ID NO: 5 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO: 5 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичной SEQ ID NO: 5, где в любом из (i) - (iv), аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и где модифицированная константная область тяжелой цепи обладает усиленной биологической активностью относительно активности другой константной области тяжелой цепи, напр., константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или относительно той же модифицированной константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

Модифицированные константные области тяжелой цепи также могут содержать комбинацию доменов CH1, шарнира, CH2 и CH3, описанных выше.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, описанную в настоящем документе, или вариант модифицированной константной области тяжелой цепи, описанный в настоящем документе, причем этот вариант (i) отличается от модифицированной константной области тяжелой цепи, описанной в настоящем документе, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от модифицированной константной области тяжелой цепи, описанной в настоящем документе, не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от модифицированной константной области тяжелой цепи, описанной в настоящем документе, 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 3-5, 1-10 или 5-10 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична модифицированной константной области тяжелой цепи, описанной в настоящем документе, где в любом из (i) - (iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и где модифицированная константная область тяжелой цепи обладает усиленной биологической активностью относительно активности другой константной области тяжелой цепи, напр., константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или относительно той же модифицированной константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую любую одну из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262, или вариант любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262, причем этот вариант (i) отличается от любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262 заменами, добавлениями или делециями 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот; (ii) отличается от любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262 не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 3-5, 1-10 или 5-10 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262, где в любом из (i) - (iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и где модифицированная константная область тяжелой цепи обладает усиленной биологической активностью (и/или пониженной эффекторной функцией) относительно активности другой константной области тяжелой цепи, напр., константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или относительно той же модифицированной константной области тяжелой цепи, которая содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

Модифицированные константные области тяжелой цепи могут иметь (i) сходную, пониженную или повышенную эффекторную функцию (напр., связывание с FcγR) относительно константной области тяжелой цепи дикого типа и (или) (ii) сходный, уменьшенный или увеличенный период полужизни (или связывание с рецептором FcRn) относительно константной области тяжелой цепи дикого типа.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 198, или ее часть, содержащую P238K, или вариант любой из SEQ ID NO: 198 или ее части, где вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 198 или ее части, содержащей P238K, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 198 или ее части, содержащей P238K, не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от SEQ ID NO: 198 или ее части, содержащей P238K, 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 3-5, 1-10 или 5-10

аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 198 или ее части, содержащей P238K, где аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и где модифицированная константная область тяжелой цепи имеет пониженную эффекторную функцию, напр., необнаружимое связывание с Fc γ R (напр., CD32a, CD32b и CD16a) с низкой аффинностью и необязательно необнаружимое связывание с Fc γ R (CD64) с высокой аффинностью, определяемое в анализе, описанном в настоящем документе.

В определенных вариантах выполнения изобретения Fc IgG1, содержащий мутацию P238K (напр., содержащий SEQ ID NO: 198 или ее часть), не содержит никаких других мутаций относящихся к Fc IgG1 дикого типа, напр., описанных в настоящем документе. В определенных вариантах выполнения изобретения Fc IgG1, содержащий мутацию P238K (напр., содержащий SEQ ID NO: 198 или ее часть), содержит 1-5 аминокислотных замен в дополнение к P238K относительно человеческого Fc IgG1 дикого типа, напр., он включает SEQ ID NO: 198 или ее часть и 1-5 аминокислотных замен относительно SEQ ID NO: 198 или ее части при условии, что Fc IgG1 обладает пониженной эффекторной функцией.

В определенных вариантах выполнения изобретения Fc IgG1, содержащий мутацию P238K, не содержит никакой другой мутации, которая снижает эффекторную функцию. В определенных вариантах выполнения изобретения Fc IgG1, содержащий мутацию P238K, содержит 1-5 мутаций, которые снижают эффекторную функцию.

В определенных вариантах выполнения изобретения Fc IgG, содержащий мутацию P238K, также содержит мутацию L235E и/или мутацию K322A и может в определенных вариантах выполнения изобретения не содержать никакой дополнительной мутации Fc, которая модулирует эффекторную функцию Fc, напр., он не включает мутацию в P330, P331 или мутацию в нижнем шарнире, напр., у аминокислот 234 и 236-237. IgG может представлять собой IgG1 или IgG2.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую константный домен IgG2 или по меньшей мере его шарнир, где константный домен IgG2 или его шарнир содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из P238A, P238K, L235A, K322A, и, необязательно, мутацию в C219 и/или C220, напр., C219S и/или C220S.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую константный домен IgG1, содержащий один или несколько из L234A, L235E и G237A. Используемый в настоящем документе термин «IgG1.3» относится к тяжелой цепи IgG1, содержащей L234A, L235E и G237A (см., напр., SEQ ID NO: 248). Константные области IgG1, содержащие эти три мутации, также могут содержать дополнительные мутации такие, как описанные в настоящем документе. Типичные последовательности, содержащие мутации L234A, L235E и G237A и дополнительные мутации, представлены в настоящем документе в Таблице Последовательностей. Fc IgG1.3 обеспечивает антитело со значительно пониженной эффекторной функцией, такой как ADCC и CDC. В определенных вариантах выполнения изобретения Fc содержит мутации IgG1.3 и дополнительные мутации, напр., P238K.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1.3, константная область которой не содержит ничего, кроме мутации, которая модулирует эффекторную функцию, в дополнение к L234A, L235E и G237A. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1.3, константная область которой не содержит ничего, кроме мутации, в дополнение к L234A, L235E и G237A.

Константные области тяжелой цепи представлены в Таблице Последовательностей. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит одну из константных областей тяжелой цепи, указанных в Таблице, где константная область не содержит никакой мутации в дополнение к мутации в последовательности, указанной в Таблице. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело содержит одну из константных областей тяжелой цепи, указанных в Таблице, где константная область (i) отличается от последовательности из Таблицы Последовательностей 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от последовательности из Таблицы Последовательностей не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (iii) отличается от последовательности из Таблицы Последовательностей 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности из Таблицы Последовательностей, где в любом из (i) - (iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и где биологическая активность константной области существенно не изменяется этими мутациями.

Константные области тяжелой цепи могут содержать комбинацию мутаций, которые придают антителу, содержащему область тяжелой цепи, комбинацию биологических активностей, присущих каждой отдельной мутации. Например, одну или несколько мутаций, которые усиливают образование агонистической активности крупных комплексов на клеточной поверхности или которые усиливают интернализацию антитела, можно комбинировать с одной или несколькими мутациями, которые модулируют эффекторную функцию. Типичные последовательности константных цепей, содержащих комбинацию мутаций, обеспечивающих различные биологические функции, приведены в Таблице Последовательностей.

II. Антитела с модифицированными константными областями тяжелой цепи и их антигены-мишени

Модифицированные константные области тяжелой цепи можно использовать в широком спектре антител, таких как антитела, которые требуют интернализацию (напр., конъюгаты антител с лекарственными средствами (ADC), и антитела к CD73), агонистическую активность (напр., антитела, которые эффективны в модулировании иммунных ответов, напр., при стимулировании активации Т-клеток, такие как агонистические антитела к GITR), антагонистическую активность (напр., антитела, которые ингибируют или блокируют белок, который ингибирует иммунный ответ, напр., активацию Т-клеток, такие как антитело-антагонист PD-1), эффекторную функцию, например, ADCC и CDC, или пониженную эффекторную функцию, сигнальную трансдукцию или противоопухолевую активность. Например, интернализация рецептора, ингибирующего клеточную поверхность, может ограничивать его способность взаимодействовать с его рецептором(ами) и снижать функцию(ии) клетки.

В одном варианте выполнения изобретения антитела, содержащие модифицированный константный домен тяжелой цепи, представляют собой антитела, которые требуют их интернализацию для активности (напр., антитела, которые специфичны для рецепторов клеточной поверхности), напр., индуцируя опосредованный рецептором эндоцитоз, когда они связываются с поверхностью клетки. Такие антитела могут быть использованы в качестве носителей для направленной доставки лекарственных средств, токсинов, ферментов или ДНК для терапевтических применений. Поэтому желательно повышение свойств интернализации этих антител. Типичными антителами, которые могут выиграть от эффективной интернализации, являются конъюгаты антител с лекарственными средствами. Различные анализы для измерения свойств интернализации антитела известны в данной области и описаны в

настоящем документе. В этих анализах используется, например, широкий спектр красителей для пометки антител, которые можно использовать в анализах с отмывкой или анализах на основе гашения для мониторинга интернализации. Интернализацию антител также можно отслеживать в анализах без промывки, которые основаны на флуоресцентных метках.

В одном варианте выполнения изобретения антитела, содержащие модифицированный константный домен тяжелой цепи, представляют собой антитела, которые требуют интернализацию антигена, с которым они связаны, напр., молекулы клеточной поверхности, такой как рецептор или лиганд, для активности. Таким образом, в антителах к белкам клеточной поверхности, которые требуют пониженной регуляции для биологической (напр., терапевтической) активности, могут использоваться модифицированная константная область тяжелой цепи, описанная в настоящем документе.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитела, содержащие модифицированный константный домен тяжелой цепи, связываются с молекулами клеточной поверхности и агонизируют или антагонизируют биологическую активность молекулы клеточной поверхности, напр., молекулы клеточной поверхности на иммунной клетке, напр., Т-клетке, Teff-клетке, Th1-клетке, Th2-клетке, CD4⁺ Т-клетке, CD8⁺ Т-клетке, Treg-клетке, дендритной клетке, макрофаге, моноците, клетке Лангерганса, NK-клетке, клетке-супрессоре миелоидного происхождения, В-клетке или любой другой иммунной клетке. Молекула клеточной поверхности может быть стимулирующей, напр., костимулирующей молекулой (напр., GITR, OX40, CD137, CD40, ICOS и другими членами семейства TNFR), и антитело может дополнительно стимулировать активность (агонистическое антитело) или антитело может ингибировать активность (антагонистическое антитело). Молекула клеточной поверхности может быть ингибирующей молекулой (напр., CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3), и антитело может дополнительно стимулировать активность (агонистическое антитело), или антитело может ингибировать активность (антагонистическое антитело).

В определенных вариантах выполнения изобретения антитела, содержащие модифицированный константный домен тяжелой цепи, представляют собой агонистические антитела стимулирующих (или костимулирующих) молекул, которые, напр., стимулируют иммунную систему субъекта, напр., путем индукции секреции IL-2 и/или IFN- γ из Т-клеток (напр., антитела к GITR). Было показано, что другие агонистические антитела активируют APC, стимулируют противоопухолевые Т-клеточные ответы и/или стимулируют цитотоксические миелоидные клетки с

потенциалом для борьбы с раком в отсутствии Т-клеточного иммунитета. Агонистические антитела стимулирующих молекул отличаются от антагонистических антител ингибирующих молекул, которые блокируют отрицательные иммунные контрольные точки, такие как к CTLA-4 или к PD-1. Активность агониста, такая как пролиферация Т-клеток, может быть измерена с использованием различных способов, известных в данной области.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитела, содержащие модифицированный константный домен тяжелой цепи, являются антагонистическими антителами ингибиторов контрольных точек, усиливают иммунный ответ субъекта путем блокирования или ингибирования отрицательных контрольных точек иммунного ответа, такими как антитела против CTLA-4 или против PD-1, напр., путем нацеливания ингибирующего рецептора, экспрессированного на активированных Т-клетках. Антагонистическая активность, такая как ингибирование пролиферации Т-клеток, может быть измерена с использованием различных способов, известных в данной области.

В одном варианте выполнения изобретения антитело является (i) агонистом костимулирующего рецептора или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала, напр., на Т-клетках, которые оба могут приводить к усилению иммунных ответов, напр., антиген-специфических Т-клеточных ответов (регуляторы контрольных точек иммунного ответа). В определенных вариантах выполнения изобретения антитело является (i) антагонистом костимулирующего рецептора или (ii) агонистом ингибирующего сигнала, напр., на Т-клетках. Костимулирующие и коингибирующие молекулы могут быть членами суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), и антитела, имеющие модифицированные константные области тяжелой цепи, могут связываться с любым из них. Одним из важных семейств мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство B7, которое включает B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6, и антитела, имеющие модифицированные константные области тяжелой цепи, могут связываться с любым из них. Другим семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или совместно ингибирующими рецепторами, является семейство молекул TNF, которые связываются с членами семейства рецепторов TNF (TNFR), которые включают CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1,

Lymphotoxin α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT α , LT β , LT β R, Lymphotoxin α 1 β 2, FAS, FASL (CD178), DR3 (TNFRSF25), RELT, DR6, TROY, NGFR (см., напр., Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1). Таким образом, антитела, описанные в настоящем документе, могут связываться с любой из этих поверхностных молекул, и они могут быть, напр., (i) агонистами или антагонистами (или ингибиторами или блокирующими агентами) белков семейства IgSF, или семейства B7, или семейства TNFR, которые ингибируют активацию Т-клеток, или антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (напр., IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF; «иммуносупрессивные цитокины»), и/или (ii) агонистами или антагонистами стимулирующих рецепторов семейства IgSF, семейства B7, или семейства TNF, или цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток, для модуляции, напр., стимуляции, иммунного ответа, напр., для лечения пролиферативных заболеваний, таких как рак.

Соответственно, антитело с модифицированным константным доменом тяжелой цепи может быть использовано в качестве одного из следующих агентов:

(1) Агонист белка, который стимулирует, напр., активацию Т-клеток, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 or CD28H; или

(2) Антагонист (ингибитор или блокирующий агент) белка, который ингибирует активацию Т-клеток (напр., ингибиторы контрольных точек иммунного ответа), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 и LAG-3, как описано выше, и любого из следующих белков: TIM-3, Galectin 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectin-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, CD73, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4, CD39.

Другие антитела включают антагонисты ингибирующих рецепторов на NK-клетках и агонисты активирующих рецепторов на NK-клетках, напр., KIR, TIGIT, NKG2A.

Как правило, антитела, которые могут извлечь выгоду из модифицированной константной области тяжелой цепи, включают, напр., агонистические антитела, которые лигируют положительные костимуляторные рецепторы, блокирующие антитела, которые ослабляют передачу сигналов через ингибирующие рецепторы, антагонистические антитела и антитела, которые системно увеличивают частоту противоопухолевых Т-клеток, антитела, которые преодолевают различные иммуносупрессивные пути в микроокружении опухоли (напр., блокируют ингибирующее взаимодействие с рецептором (напр., взаимодействия PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют Treg (напр., моноклональное антитело против CD25), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или

обращают/предотвращают энергию или истощение Т-клеток) и антитела, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаление в местах опухоли. Повышенная интернализация ингибирующих рецепторов может привести к снижению уровня потенциального ингибитора.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, представляет собой антитело, которое конъюгировано с терапевтическим агентом с образованием иммуноконъюгата, такого как конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), где иммуноконъюгат требует интернализации для своей активности. В ADC антитело функционирует в качестве нацеливающего агента для направления ADC в клетку-мишень, экспрессирующую его антиген, такой как антиген в раковой клетке. В этом случае антиген может быть антигеном, ассоциированным с опухолью, т.е., антигеном, который уникально экспрессируется или сверхэкспрессируется раковой клеткой. Оказавшись там, лекарственное средство высвобождается либо внутри клетки-мишени, либо в ее окрестностях, чтобы действовать в качестве терапевтического агента. Для обзора механизма действия и использования ADC в терапии рака, см. Schrama *et al.*, *Nature Rev. Drug Disc.* 2006, 5, 147.

Для лечения рака терапевтический агент или лекарственное средство ADC предпочтительно представляет собой цитотоксическое лекарственное средство, которое вызывает гибель целевой раковой клетки. Цитотоксические лекарственные средства, которые можно использовать в ADC, включают следующие типы соединений и их аналогов и производных:

(а) енедины, такие как калихеамицин (см., напр., Lee *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 3464 и 3466) и унциаламицин (см., напр., Davies *et al.*, WO 2007/038868 A2 (2007) и Chowdari *et al.*, US 8,709,431 B2 (2012));

(b) тубулизины (см., напр., Domling *et al.*, US 7,778,814 B2 (2010); Cheng *et al.*, US 8,394,922 B2 (2013); и Cong *et al.*, US 2014/0227295 A1;

(c) CC-1065 и дуокармицин (см., напр., Boger, US 6,545,530 B1 (2003); Sufi *et al.*, US 8,461,117 B2 (2013); и Zhang *et al.*, US 2012/0301490 A1 (2012));

(d) эпотилоны (см., напр., Vite *et al.*, US 2007/0275904 A1 (2007) и US RE42930 E (2011));

(е) ауристатины (см., напр., Senter *et al.*, US 6,844,869 B2 (2005) и Doronina *et al.*, US 7,498,298 B2 (2009));

(f) димеры пирролобездиазепина (PBD) (см., напр., Howard *et al.*, US 2013/0059800 A1(2013); US 2013/0028919 A1 (2013); и WO 2013/041606 A1 (2013)); и

(g) мейтансиноиды, такие как DM1 и DM4 (см., напр., Chari *et al.*, US 5,208,020 (1993) и Amphlett *et al.*, US 7,374,762 B2 (2008)).

В ADC антитело и терапевтический агент могут быть конъюгированы через линкер, напр., расщепляемый линкер, такой как пептидильный, дисульфидный или гидразоновый линкер. Например, линкер может представлять собой пептидильный линкер, такой как Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser или Glu. ADC могут быть получены, как описано в Пат. США No. 7,087,600; 6,989,452; и 7,129,261; Публикациях PCT WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312; и WO 08/103693; Патентных Публикациях США 20060024317; 20060004081; и 20060247295; описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Типичные мишени для ADC, которые могут быть усилены с помощью модифицированной константной области тяжелой цепи, включают B7H4 (Korman *et al.*, US 2009/0074660 A1); CD19 (Rao-Naik *et al.*, 8,097,703 B2); CD22 (King *et al.*, US 2010/0143368 A1); CD30 (Keler *et al.*, US 7,387,776 B2 (2008); CD70 (Terrett *et al.*, US 8,124,738 B2); CTLA-4 (Korman *et al.*, US 6,984,720 B1 (2006)); PD-1 (Korman *et al.*, US 8,008,449 B2 (2011); PSMA (Huang *et al.*, US 2009/0297438 A1 и Cardarelli *et al.*, US 8,875,278 B2); PTK7 (Terrett *et al.*, US 2010/0034826 A1); глипикан-3 (Terrett *et al.*, US 2010/0209432 (A1)), RG1 (Harkins *et al.*, US 7,335,748 B2 (2008)), мезотелин (Terrett *et al.*, US 8,268,970 B2 (2012)) и CD44 (Xu *et al.*, US 2010/0092484 A1).

Модифицированные константные домены тяжелой цепи также могут быть частью антител для применений вне онкологии, напр., при иммунологических заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, волчанка и т.д.

Модифицированные константные домены тяжелой цепи также могут быть слиты с молекулами, не являющимися антителами (или вариантами антител) или их фрагментами, и могут быть слиты с любым полипептидом, который нуждается в присутствии Fc. Модифицированный константный домен тяжелой цепи может быть слит с антигенсвязывающим фрагментом антитела, как дополнительно определено в настоящем документе (напр., в разделе определений).

В определенных вариантах выполнения изобретения константный домен тяжелой цепи или его часть, содержащая мутацию P238K, которая лишена определенной эффекторной функции, слит с полипептидом, напр., частью тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента антитела. Как дополнительно описано в настоящем документе, Fc IgG, напр., IgG1, содержащий мутацию P238K и содержащий, напр., аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 198, может быть

слит с переменным доменом тяжелой цепи антитела, где антитело связывается с любой мишенью, напр., целевым белком, описанным в настоящем документе (напр., CD40 или CD40L). Fc IgG1 с мутацией P238K (напр., IgG1 fa P238K, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198 или в контексте IgG1, имеющего аллотип f), можно использовать в любом антителе или с любым его антигенсвязывающим фрагментом, для которого эффекторная функция, в частности, связывание с FcγRs CD32a, CD32b и CD16a, нежелательна. В дополнение к P238K константная область тяжелой цепи может содержать дополнительные 1 или 2 мутации, напр., замены, которые уменьшают связывание с FcγR CD64, или P238K может использоваться в контексте шарнира IgG2, напр., шарнира IgG2, содержащего C219S, как дополнительно описано в настоящем документе.

III. Способы модификации биологической активности антител

В настоящем документе представлены способы усиления биологической активности определенных антител, таких как одна или несколько из следующих биологических активностей:

- (a) повышенная или измененная интернализация клеткой;
- (b) повышенная или измененная агонистическая активность;
- (c) повышенная или измененная антагонистическая или блокирующая активность;
- (d) усиленная или пониженная ADCC;
- (d) создание нового свойства;
- (e) повышенная или измененная трансдукция сигнала;
- (f) образование более крупных сшитых комплексов антитело/антиген;
- (g) усиление кластеризации или олигомеризации молекулы-мишени клеточной поверхности;
- (h) усиление стимуляции или усиление иммунного ответа; и/или
- (i) усиление ингибирования иммунного ответа.

Способ усиления биологической активности антитела может включать замену константной области тяжелой цепи или ее части, напр., шарнира и/или домена CH1, модифицированной константной областью тяжелой цепи или ее частью, напр., шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2.

В определенных вариантах выполнения изобретения способ улучшения биологической активности антитела включает (i) предоставление антитела, которое не содержит модифицированной константной области тяжелой цепи, как описано в

настоящем документе; и (ii) замену константной области тяжелой цепи антитела модифицированной константной областью тяжелой цепи или ее частью, которая усиливает биологическую активность антитела. В определенных вариантах выполнения изобретения способ улучшения биологической активности антитела включает (i) предоставление антитела, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2 (напр., шарнир IgG1, шарнир IgG3 или шарнир IgG4); и (ii) замену шарнира, не относящегося к IgG2, антитела на шарнир IgG2. В определенных вариантах выполнения изобретения способ улучшения биологической активности антитела включает (i) предоставление антитела, которое содержит неусиливающий шарнир IgG2; и (ii) замену неусиливающего шарнира IgG2 антитела на шарнир IgG2. «Неусиливающий шарнир IgG2» представляет собой вариант шарнира IgG2, который отличается от шарнира IgG2 тем, что он больше не обладает необходимой характеристикой для усиления биологической активности антитела, напр., вариант шарнира, который больше не имеет жесткости шарнира IgG2 дикого типа.

Типичные способы усиления биологической активности антитела включают (i) предоставление антитела, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или неусиливающий шарнир IgG2, и (ii) замену шарнира шарниром, содержащим SEQ ID NO: 8, 21 22, 23, 126-132, 134-136 или 137 или их варианты, напр., варианты, описанные в настоящем документе. Способы усиления биологической активности антитела могут также включать (i) предоставление антитела, которое содержит константную область тяжелой цепи, которая не является модифицированной константной областью тяжелой цепи, и (ii) замену константной области тяжелой цепи модифицированной константой областью тяжелой цепи. Замена константной области тяжелой цепи может включать замену домена CH1, шарнира, CH2 и/или CH3. Например, константная область тяжелой цепи может быть модифицирована путем замены шарнира на шарнир IgG2 или его вариант и/или путем замены домена CH1 на домен CH1 IgG1 или IgG2 или его вариант. В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир заменяется шарниром IgG2, а домен CH2 заменяется доменом CH2 IgG1. В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир заменяется шарниром IgG2, а домен CH3 заменяется доменом IgG1 CH3. В определенных вариантах выполнения изобретения шарнир заменяется шарниром IgG2, CH1 заменяется шарниром IgG2, домен CH2 заменяется доменом CH2 IgG1, а домен CH3 заменяется доменом CH3 IgG1. В определенных вариантах выполнения изобретения константная область тяжелой цепи заменяется модифицированными областями 1-27 тяжелой цепи, указанными в приведенной выше Таблице 5, или

константными областями тяжелой цепи, представленными в Таблице 6 или описанными в настоящем документе.

В настоящем документе также представлены способы усиления биологической активности антитела IgG1 или IgG2, включающие удаление 1-10 аминокислот в шарнире IgG1 или IgG2 антитела соответственно. Например, одна или несколько аминокислот S219, C22, D221, K222, T223, H224 и T225 могут быть удалены. В одном варианте выполнения изобретения все аминокислоты S219, C22, D221, K222, T223, H224 и T225 удалены.

Кроме того, изобретение относится к способам получения и предоставления безэфекторных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, напр., путем мутации P238, напр., в P238K, для устранения или снижения эфекторной функции антитела.

В определенных вариантах выполнения изобретения замена константной области тяжелой цепи антитела, напр., для модификации его биологической активности, не сопровождается снижением или значительным снижением его активности связывания с антигеном-мишенью. Как описано в Примерах, замена константной области тяжелой цепи антител к GITR и против CD73 существенно не изменяла их аффинность к человеческим антигенам GITR и CD73 соответственно.

Понятно, что при ссылке на замену домена определенного изотипа тем же доменом другого изотипа или доменом, включающим мутацию, напр., мутацию P238, нет необходимости буквально заменять домен, а, скорее, это может быть необходимо только для изменения аминокислот, которые различаются между двумя изотипами.

Стандартные анализы для оценки способности антител связываться с антигеном различных видов известны в данной области и дополнительно описаны в настоящем документе и включают, напр., ELISA, Вестерн-блоты и RIA. Подходящие анализы подробно описаны в Примерах. Кинетика связывания (напр., аффинность связывания) антител также может быть оценена с помощью стандартных анализов, известных в данной области, таких как анализ BIACORE® SPR. Анализы для оценки свойств антител, имеющих модифицированные константные области (напр., связывание лиганда, пролиферация Т-клеток, продуцирование цитокинов), более подробно описаны ниже и в Примерах.

Типичные антитела, которые могут быть модифицированы, как описано в настоящем документе, включают, напр., антитела для лечения рака, такие как: Yervoy™ (ипилимумаб) или Тремелимумаб (к CTLA-4), галиксимаб (к B7.1), BMS-936558 (к PD-1), CT-011 (к PD-1), MK-3475 (к PD-1), AMP224 (к B7DC), BMS-936559 (к B7-H1), MPDL3280A (к B7-H1), MEDI-570 (к ICOS), AMG557 (к B7H2), MGA271 (к B7H3),

IMP321 (к LAG-3), BMS-663513 (к CD137), PF-05082566 (к CD137), CDX-1127 (к CD27), к OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (к OX40L), Атацицепт (к TACI), CP-870893 (к CD40), Люкатумумаб (к CD40), Дацетузумаб (к CD40), Муромонаб-CD3 (к CD3), Ипилумумаб (к CTLA-4).

Другие антитела, которые можно модифицировать, как описано в настоящем документе, включают антагонистические антитела к PD-1 и PD-L1. Типичным антителом против PD-1, которое можно модифицировать, как описано в настоящем документе, является ниволумаб (BMS-936558); антитело, которое содержит CDR или переменные области одного из антител 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 и 4A11, описанных в WO 2006/121168; МК-3475 (Ламбролизумаб), описанный в WO2012/145493; AMP-514, описанный в WO 2012/145493; CT-011 (Пидилизумаб; ранее CT-AcTibody или BAT; см., напр., Rosenblatt et al. (2011) *J. Immunotherapy* 34:409); раскрытые в WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, WO2013/173223, Патентах США No. 7,635,757 и 8,217,149 и Патентной Публикации США No. 2009/0317368.

Другие антитела, которые могут быть модифицированы, включают антитела против PD-L1, напр., BMS-936559 (обозначается как 12A4 в WO 2007/005874 и патенте США No. 7,943,743); антитело, которое содержит CDR или переменные области 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, которое описано в Публикации PCT WO 07/005874 и патенте США No. 7,943,743; MEDI4736 (также известное как Anti-B7-H1); MPDL3280A (также известное как RG7446); любое из антител против PD-L1, раскрытое в WO2013/173223, WO2011/066389, WO2012/145493, Патентах США No. 7,635,757 и 8,217,149 и Публикации США No. 2009/145493.

Другие антитела, которые могут быть модифицированы, включают антитела против CTLA-4, напр., Yervoy™ (ипилимумаб или антитело 10D1, описанное в Публикации PCT WO 01/14424); тремелимумаб (ранее тицилимумаб, CP-675,206); моноклональное или антитело против CTLA-4, описанное в любой из следующих публикаций: WO 98/42752; WO 00/37504; Пат. США. No. 6,207,156; Hurwitz *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho *et al.* (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206); и Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304; и любое из антител к CTLA-4, раскрытых в WO2013/173223.

Другие антитела, которые могут быть модифицированы, включают антитела против LAG-3, напр., BMS-986016; IMP731, описанные в US 2011/007023; и IMP-321.

Другие антитела, которые могут быть модифицированы, включают антитела-агонисты к GITR, напр., антитело 6C8 к GITR или его гуманизированные варианты,

описанные в WO 2006/105021; антитело, описанное в WO 2011/028683; и антитело, описанное в JP2008278814.

Антитела, которые нацелены на другие антигены, в том числе описанные в другом месте настоящего документа, также могут быть модифицированы. Например, антитела против Her2, которые требуют интернализации, напр., трастузумаб (Herceptin), могут быть модифицированы, как описано в настоящем документе.

IV. Дополнительные модификации константного домена тяжелой цепи

В дополнение к описанным в настоящем документе модификациям антител для усиления их биологической активности или снижения эффекторной функции могут быть внесены дополнительные мутации, напр., в CH1, шарнир, домен CH2 или CH3, напр., для дополнительного снижения эффекторной функции, связывания с FcγR и/или стабильности антител. Например, любая из описанных в настоящем документе модификаций, напр., ниже, может быть объединена с мутацией P238, напр., P238K, такой как в IgG1 или гибриде IgG1-IgG2 Fc или их части.

Fc и модифицированные Fc

Антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать Fc, включающий одну или несколько модификаций, обычно для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание с рецептором Fc и/или

антиген-зависимая клеточная цитотоксичность. Например, можно вносить модификации в область Fc, чтобы генерировать вариант Fc с (a) повышенной или пониженной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC), (b) повышенной или пониженной опосредованной комплементом цитотоксичностью (CDC), (c) повышенной или пониженной аффинностью к C1q и/или (d) повышенной или пониженной аффинностью к рецептору Fc относительно исходного Fc. Такие варианты области Fc будут обычно содержать по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в области Fc. Считается, что объединение модификаций аминокислот является особенно желательным. Например, вариант области Fc может включать две, три, четыре, пять и т.д. замены, напр., определенных положений области Fc, определенных в настоящем документе. Типичные варианты последовательности Fc раскрыты в настоящем документе и также представлены в Пат. США No. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; 6,194,551; 7,317,091; 8,101,720; Патентных Публикациях PCT WO 00/42072; WO 01/58957; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455;

WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 и WO 06/020114.

Снижение Эффекторной Функции

Активность ADCC может быть уменьшена путем модификации области Fc. В определенных вариантах выполнения изобретения сайты, которые влияют на связывание с рецепторами Fc, могут быть удалены (напр., путем мутации), предпочтительно, сайты, отличные от сайтов связывания с рецептором реутилизации. В других вариантах выполнения изобретения область Fc может быть модифицирована для удаления сайта ADCC. Сайты ADCC известны в данной области; см., напр., Sarmay *et al.* (1992) *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 в отношении сайтов ADCC в IgG1. В одном варианте выполнения изобретения вариант G236R и L328R человеческого IgG1 эффективно устраняет связывание с FcγR. Horton *et al.* (2011) *J. Immunol.* 186:4223 и Chu *et al.* (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926. В других вариантах выполнения изобретения Fc, имеющий пониженное связывание с FcγR, содержит аминокислотные замены L234A, L235E и G237A. Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289.

Активность CDC также может быть снижена путем модификации области Fc. Мутации в положениях D270, K322, P329 и P331 IgG1, в частности, мутации аланина D270A, K322A, P329A и P331A, значительно снижают способность соответствующего антитела связывать C1q и активировать комплемент. Idusogie *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:4178; WO 99/51642. Было показано, что модификация положения 331 IgG1 (напр., P331S) снижает связывание с комплементом. Тао *et al.* (1993) *J. Exp. Med.* 178:661 и Canfield & Morrison (1991) *J. Exp. Med.* 173:1483. В другом примере один или несколько аминокислотных остатков в аминокислотных положениях с 231 по 239 изменены, чтобы тем самым уменьшить способность антитела фиксировать комплемент. WO 94/29351.

В некоторых вариантах выполнения изобретения Fc с уменьшенной фиксацией комплемента имеет аминокислотные замены A330S и P331S. Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289.

Для применений, в которых следует избегать эффекторной функции, напр., когда только связывание антигена достаточно для получения желаемого терапевтического эффекта, а эффекторная функция лишь приводит (или увеличивает риск) к нежелательным побочным эффектам, могут использоваться антитела IgG4 или могут быть созданы антитела или фрагменты, в которых отсутствует область Fc или ее существенная часть, или Fc может быть мутирован для полного устранения гликозилирования (напр., N297A). Альтернативно, была создана гибридная конструкция

человеческого IgG2 (домен C_H1 и шарнирная область) и человеческого IgG4 (домены C_H2 и C_H3), которая лишена эффекторной функции, лишена способности связываться с FcγR (подобно IgG2) и неспособна активировать комплемент (подобно IgG4). Rother *et al.* (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:1256. См. также Mueller *et al.* (1997) *Mol. Immunol.* 34:441; Labrijn *et al.* (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479 (обсуждение модификаций Fc для снижения эффекторной функции в целом).

В других вариантах выполнения изобретения область Fc изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, чтобы уменьшить всю эффекторную функцию(ии) антитела. Например, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, можно заменить другим аминокислотным остатком так, что антитело имеет пониженную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, к которому изменяется аффинность, может представлять собой, напр., рецептор Fc (остатки 234, 235, 236, 237, 297) или компонент C1 комплемента (остатки 297, 318, 320, 322). Патенты США No. 5,624,821 и 5,648,260, оба авторства Winter *et al.*

В WO 88/007089 предложены модификации IgG в области Fc для уменьшения связывания с FcγRI для уменьшения ADCC (234A; 235E; 236A; G237A) или блокирования связывания с компонентом C1q комплемента для устранения CDC (E318A или V/K320A и K322A/Q). См. также Duncan & Winter (1988) *Nature* 332:563; Chappel *et al.* (1991) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 88:9036; и Sondermann *et al.* (2000) *Nature* 406:267 (обсуждается влияние этих мутаций на связывание с FcγRIII).

Модификации Fc, снижающие эффекторную функцию, также включают замены, вставки и делеции в положениях 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325 и 328, такие как 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L и 328R. Вариант Fc может содержать 236R/328R. Другие модификации для уменьшения взаимодействий FcγR и комплемента включают замены 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331 S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P и 234V. Эти и другие модификации рассмотрены в Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20: 685-691. Эффекторные функции (как ADCC, так и активация комплемента) могут быть снижены при поддержании связывания с неонатальным FcR (поддержание периода полужизни) путем мутации остатков IgG в одном или нескольких положениях 233-236 и 327-331, таких как E233P, L234V, L235A необязательно G236Δ, A327G, A330S и P331S в IgG1; E233P, F234V, L235A, необязательно G236Δ в IgG4; и A330S и P331S в IgG2. См. Armour *et al.* (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2613; WO 99/58572. Другие мутации, которые снижают эффекторную функцию, включают L234A и L235A в

IgG1 (Alegre *et al.* (1994) *Transplantation* 57:1537); V234A и G237A в IgG2 (Cole *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:3613; см. также Пат. США No. 5,834,597); и S228P и L235E для IgG4 (Reddy *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:1925). Другая комбинация мутаций для снижения эффекторной функции человеческого IgG1 включает L234F, L235E и P331S. Oganessian *et al.* (2008) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 64:700. См., в целом, Labrijn *et al.* (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479. Обнаружено, что дополнительными мутациями, снижающими эффекторную функцию в контексте слитого белка Fc (IgG1) (абатацепт), являются C226S, C229S и P238S (нумерация остатков по EU). Davis *et al.* (2007) *J. Immunol.* 34:2204.

Другие варианты Fc, имеющие пониженную ADCC и/или CDC, описаны у в Glaesner *et al.* (2010) *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26:287 (F234A и L235A для уменьшения ADCC и ADCP в IgG4); Hutchins *et al.* (1995) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 92:11980 (F234A, G237A и E318A в IgG4); An *et al.* (2009) *MAbs* 1:572 и Публ. Пат. Заявки США 2007/0148167 (H268Q, V309L, A330S и P331S в IgG2); McEarchern *et al.* (2007) *Blood* 109:1185 (C226S, C229S, E233P, L234V, L235A в IgG1); Vafa *et al.* (2014) *Methods* 65:114 (V234V, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S в IgG2).

В определенных вариантах выполнения изобретения выбран Fc, который по существу не имеет эффекторной функции, т.е., он имеет пониженное связывание с FcγR и пониженную фиксацию комплемента. Типичный Fc, напр., Fc IgG1, который не содержит эффекторов, содержит следующие пять мутаций: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S. Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289. Эти пять замен могут быть объединены с N297A, чтобы также устранить гликозилирование.

Усиление Эффекторной Функции

Альтернативно, активность ADCC может быть увеличена путем модификации области Fc. Что касается активности ADCC, человеческий IgG1 $\geq$ IgG3 $\gg$ IgG4 $\geq$ IgG2, так что константная область IgG1, а не IgG2 или IgG4, может быть выбрана для применения в лекарственном средстве, где требуется ADCC. Альтернативно, область Fc может быть модифицирована для повышения антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или для повышения сродства к рецептору Fcγ путем модификации одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430,

433, 434, 435, 436, 437, 438 или 439. См. WO 2012/142515; см. также WO 00/42072. Типичные замены включают 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D и 332E. Типичные варианты включают 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T и 267E/268F/324T. Например, было показано, что человеческие IgG1Fc, содержащие вариант G236A, который может необязательно комбинироваться с I332E, увеличивают отношение аффинности связывания FcγIIA/FcγIIb приблизительно в 15 раз. Richards *et al.* (2008) *Mol. Cancer Therap.* 7:2517; Moore *et al.* (2010) *mAbs* 2:181. Другие модификации для усиления взаимодействия FcγR и комплемента включают, но не ограничиваются ими, замены 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I и 396L. Эти и другие модификации рассмотрены в Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. В частности, и ADCC, и CDC могут быть усилены путем изменений в положении E333 IgG1, напр., E333A. Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591. Использование мутаций P247I и A339D/Q для усиления эффекторной функции в IgG1 раскрыто в WO 2006/020114, а D280H, K290S ± S298D/V раскрыто в WO 2004/074455. Было показано, что варианты K326A/W и E333A/S усиливают эффекторную функцию в человеческом IgG1 и E333S в IgG2. Idusogie *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:2571.

В частности, были картированы сайты связывания на человеческом IgG1 для FcγR1, FcγRII, FcγRIII и FcRn, и были описаны варианты с улучшенным связыванием. Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604. Было показано, что специфические мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII, включая комбинационные мутанты T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A (имеющие усиленное связывание с FcγRIIIa и активность ADCC). Были идентифицированы другие варианты IgG1 с сильно усиленным связыванием с FcγRIIIa, включая варианты с мутациями S239D/I332E и S239D/I332E/A330L, которые показали наибольшее увеличение сродства к FcγRIIIa, снижение связывания FcγRIIb и сильную цитотоксическую активность у яванских макаков. Lazar *et al.* (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005; Awan *et al.* (2010) *Blood* 115:1204; Desjarlais & Lazar (2011) *Exp. Cell Res.* 317:1278. Введение тройных мутаций в антитела, такие как алемтузумаб (CD52-специфическое), трастузумаб (HER2/neu-специфическое), ритуксимаб (CD20-специфическое) и цетуксимаб (EGFR-специфическое), транслировалось в значительно усиленную активность ADCC *in vitro*, и вариант S239D/I332E показал усиленную способность истощать В-клетки у обезьян. Lazar *et al.* (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005. Кроме того, были идентифицированы мутанты IgG1, содержащие мутации L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L, которые проявляли усиленное связывание

с FcγRIIIa и одновременно усиленную активность ADCC у трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий FcγRIIIa, в моделях злокачественных опухолей В-клеток и рака молочной железы. Stavenhagen *et al.* (2007) *Cancer Res.* 67:8882; Пат. США No. 8,652,466; Nordstrom *et al.* (2011) *Breast Cancer Res.* 13:R123.

Различные изотипы IgG также проявляют дифференциальную активность CDC (IgG3>IgG1>>IgG2≈IgG4). Dangi *et al.* (1988) *EMBO J.* 7:1989. Для применений, в которых требуется усиленная CDC, также возможно введение мутаций, которые увеличивают связывание с C1q. Способность рекрутировать комплемент (CDC) может быть усилена мутациями в K326 и/или E333 в IgG2, такими как K326W (которая снижает активность ADCC) и E333S, для повышения связывания с C1q, первым компонентом каскада комплемента. Idusogie *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:2571. Введение S267E / H268F / S324T (отдельно или в любой комбинации) в человеческий IgG1 усиливает связывание с C1q. Moore *et al.* (2010) *mAbs* 2:181. Область Fc гибридного IgG1/IgG3 изотипического антитела “113F” согласно Natsume *et al.* (2008) *Cancer Res.* 68:3863 (фигура 1) также обеспечивает усиленную CDC. См. также Michaelsen *et al.* (2009) *Scand. J. Immunol.* 70:553 и Redpath *et al.* (1998) *Immunology* 93:595.

Дополнительные мутации, которые могут увеличивать или уменьшать эффекторную функцию, описаны в Dall’Acqua *et al.* (2006) *J. Immunol.* 177:1129. См. также Carter (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6:343; Presta (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:460.

Варианты Fc, которые усиливают аффинность к ингибирующему рецептору FcγRIIb, также можно использовать, напр., для усиления индуцирующей апоптоз или адьювантной активности. Li & Ravetch (2011) *Science* 333:1030; Li & Ravetch (2012) *Proc. Nat’l Acad. Sci (USA)* 109:10966; Публ. Пат. Заявки США 2014/0010812. Такие варианты могут обеспечивать антитело с иммуномодулирующими активностями, связанными с клетками FcγRIIb⁺, включая, напр., В-клетки и моноциты. В одном варианте выполнения изобретения варианты Fc обеспечивают селективно усиленную аффинность к FcγRIIb относительно одного или нескольких активирующих рецепторов. Модификации для изменения связывания с FcγRIIb включают одну или несколько модификаций в положении, выбранном из группы, состоящей из 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 и 332 в соответствии с индексом EU. Типичные замены для усиления аффинности FcγRIIb включают, но не ограничиваются ими, 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y и 332E. Типичные замены включают 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W и 328Y. Другие варианты Fc для усиления связывания с FcγRIIb включают 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E,

267E/268D, 267E/268E и 267E/328F. В частности, варианты S267E, G236D, S239D, L328F и I332E, включая двойной вариант S267E + L328F, человеческого IgG1 имеют особое значение для специфического усиления сродства к ингибирующему рецептору FcγRIIb. Chu *et al.* (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926; Публ. Пат. Заявки США 2006/024298; WO 2012/087928. Усиленная специфичность для FcγRIIb (в отличие от FcγRIIaR131) может быть получена путем добавления замены P238D. Mimoto *et al.* (2013) *Protein. Eng. Des. & Selection* 26:589; WO 2012/115241.

Гликозилирование

Гликозилирование антитела модифицируется для увеличения или уменьшения эффекторной функции. Например, может быть получено агликозилированное антитело, которому не хватает всей эффекторной функции, путем мутации консервативного остатка аспарагина в положении 297 (напр., N297A), тем самым устраняя связывание комплемента и FcγRI. Bolt *et al.* (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:403. См. также Tao & Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595 (применение N297Q в IgG1 для устранения гликозилирования в положении 297).

Хотя у агликозилированных антител обычно отсутствует эффекторная функция, могут быть введены мутации для восстановления этой функции. Агликозилированные антитела, напр., антитела, полученные в результате мутаций N297A/C/D/ или H или продуцируемые в системах (напр., *E.coli*), которые не гликозилируют белки, могут быть дополнительно мутированы для восстановления связывания FcγR, напр., S298G и/или T299A/G/ или H (WO 2009/079242) или E382V и M428I (Jung *et al.* (2010) *Proc. Nat'l Acad. Sci (USA)* 107:604).

Кроме того, антитело с усиленной ADCC может быть получено путем изменения гликозилирования. Например, было показано, что удаление фукозы из Asn297-связанных олигосахаридов с тяжелой цепью усиливает ADCC, основываясь на улучшенном связывании с FcγRIIIa. Shields *et al.* (2002) *JBC* 277:26733; Niwa *et al.* (2005) *J. Immunol. Methods* 306: 151; Cardarelli *et al.* (2009) *Clin. Cancer Res.* 15:3376 (MDX-1401); Cardarelli *et al.* (2010) *Cancer Immunol. Immunotherap.* 59:257 (MDX-1342). Такие антитела с низким содержанием фукозы могут продуцироваться, напр., в нокаутированных клетках яичника Китайского хомяка (CHO), лишенных фукозилтрансферазы (*FUT8*) (Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614) или в других клетках, которые генерируют афукозилированные антитела. См., напр., Zhang *et al.* (2011) *mAbs* 3:289 и Li *et al.* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210 (оба описывают продуцирование антител в гликосконструированных *Pichia pastoris*); Mossner *et al.*

(2010) *Blood* 115:4393; Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733; Shinkawa *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278:3466; EP 1176195B1. ADCC также может быть усилено, как описано в Публикации PCT WO 03/035835, где раскрыто использование варианта клеточной линии CHO, Lec13, со пониженной способностью присоединять фукозу к связанным с Asn(297) углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Альтернативно, аналоги фукозы могут быть добавлены в культуральную среду во время продуцирования антитела для того, чтобы ингибировать включение фукозы в углевод в антителе. WO 2009/135181.

Увеличение бисектирования структур GlcNac в связанных с антителами олигосахаридах также усиливает ADCC. В Публикации PCT WO 99/54342 Umana *et al.* описываются клеточные линии, сконструированные для экспрессии модифицирующих гликопротеин гликозилтрансфераз (напр., бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)) так, что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, проявляют повышенное бисектирование структур GlcNac, что приводит к увеличению активности ADCC антител (см. также Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180).

Были разработаны дополнительные варианты гликозилирования, которые не содержат остатков галактозы, сиаловой кислоты, фукозы и ксилозы (так называемые гликоформы GNGN), которые демонстрируют усиленные ADCC и ADCP, но сниженную CDC, а также другие, которые не содержат сиаловой кислоты, фукозы и ксилозы (так называемые гликоформы G1/G2), которые демонстрируют усиленные ADCC, ADCP и CDC. Публ. Пат. Заявки США No. 2013/0149300. Антитела, имеющие эти паттерны гликозилирования, необязательно продуцируются в генетически модифицированных растениях *N. benthamiana*, у которых эндогенные ксилозные и фукозилтрансферазные гены были нокаутированы.

Гликоконструирование также может быть использовано для модификации противовоспалительных свойств конструкции IgG путем изменения содержания α 2,6-сиалила в углеводных цепях, присоединенных в Asn297 областей Fc, где увеличение доли α 2,6-сиалированных форм приводит к усилению противовоспалительных эффектов. См. Nimmerjahn *et al.* (2008) *Ann. Rev. Immunol.* 26:513. И наоборот, снижение доли антител, имеющих α 2,6-сиалированные углеводы, может быть полезным в тех случаях, когда противовоспалительные свойства не нужны. Способы модификации содержания α 2,6-сиалированных антител, например, путем селективной очистки 2,6-сиалированных форм или путем ферментативной модификации, раскрыты в Публ. Пат.

Заявки США No. 2008/0206246. В других вариантах выполнения изобретения аминокислотная последовательность области Fc может быть модифицирована так, чтобы имитировать эффект α 2,6-сиалирования, например, путем включения модификации F241A. WO 2013/095966.

Антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать один или несколько сайтов гликозилирования в вариабельной области легкой или тяжелой цепи. Такие сайты гликозилирования могут приводить к повышенной иммуногенности антитела или изменению рК антитела вследствие измененного связывания антигена (Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J. Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Известно, что гликозилирование происходит в мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T.

Биологический период полужизни

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело модифицировано для повышения его биологического периода полужизни. Возможны разные подходы. Например, это может быть сделано путем повышения аффинности связывания области Fc для FcRn. В одном варианте выполнения изобретения антитело изменяют в пределах области CH1 или CL так, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора реутилизации, взятый из двух петель домена CH2 области Fc IgG, как описано в Патентах США No. 5,869,046 и 6,121,022 Presta *et al.* Другие типичные варианты Fc, которые увеличивают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают замены в положениях 259, 308 и 434, включая, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y и 434M. Другие варианты, которые увеличивают связывание Fc с FcRn, включают: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton *et al.*, 2004, *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6216, Hinton *et al.* 2006 *Journal of Immunology* 176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 311A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H (Del' Acqua *et al.* *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180, Dall' Acqua *et al.*, 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524). См. Пат. США No. 8,367,805.

В качестве способа повышения сродства к FcRn была предложена модификация некоторых консервативных остатков в Fc IgG (I253/H310/Q311/H433/N434), таких как вариант N434A (Yeung *et al.* (2009) *J. Immunol.* 182:7663), тем самым увеличивая период

полужизни антитела в кровотоке. WO 98/023289. Было показано, что комбинированный вариант Fc, включающий M428L и N434S, увеличивает связывание FcRn и увеличивает период полужизни в сыворотке вплоть до пяти раз. Zalevsky *et al.* (2010) *Nat. Biotechnol.* 28:157. Комбинированный вариант Fc, содержащий модификации T307A, E380A и N434A, также увеличивает период полужизни антител IgG1. Petkova *et al.* (2006) *Int. Immunol.* 18:1759. Кроме того, было показано, что комбинированные варианты Fc, содержащие варианты M252Y/M428L, M428L/N434H, M428L/N434F, M428L/N434Y, M428L/N434A, M428L/N434M и M428L/N434S, увеличивают период полужизни. WO 2009/086320.

Кроме того, вариант Fc комбинации, включающей M252Y, S254T и T256E, увеличивает период полужизни почти в 4 раза. Dall'Acqua *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281:23514. Связанная модификация IgG1, обеспечивающая повышенную аффинность к FcRn, но сниженную зависимость от pH (M252Y / S254T / T256E / H433K / N434F), была использована для создания конструкции IgG1 («MST-HN Abdeg») для применения в качестве конкурента для предотвращения связывания других антител с FcRn, что приводит к увеличению клиренса этого другого антитела, либо эндогенного IgG (напр., в аутоиммунной среде), либо другого экзогенного (терапевтического) mAb. Vaccaro *et al.* (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1283; WO 2006/130834.

Другие модификации для повышения связывания с FcRn описаны в Yeung *et al.* (2010) *J. Immunol.* 182:7663-7671; 6,277,375; 6,821,505; WO 97/34631; WO 2002/060919.

В определенных вариантах выполнения изобретения гибридные изотипы IgG могут быть использованы для повышения связывания с FcRn и потенциально для повышения периода полужизни. Например, гибридный вариант IgG1/IgG3 может быть сконструирован путем замены положений IgG1 в области CH2 и/или CH3 аминокислотами из IgG3 в положениях, где два изотипа различаются. Таким образом, может быть сконструировано гибридное вариантное антитело IgG, которое содержит одну или несколько замен, напр., 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. В других вариантах выполнения изобретения, описанных в настоящем документе, гибридный вариант IgG1/IgG2 может быть сконструирован путем замены положений IgG2 в области CH2 и/или CH3 аминокислотами из IgG1 в положениях, где два изотипа различаются. Таким образом, может быть сконструировано гибридное вариантное антитело IgG, которое включает одну или несколько замен, напр., одну или несколько следующих аминокислотных замен: 233E, 234L, 235L, -236G (что относится к вставке глицина в положении 236), и 327A. См. Пат. США No. 8,629,113. Был создан гибрид последовательностей IgG1/IgG2/IgG4, который предположительно увеличивает

период полужизни в сыворотке и улучшает экспрессию. Пат. США No. 7,867,491 (в нем порядковый номер 18).

Период полужизни в сыворотке антител по настоящему изобретению также может быть увеличен путем пэгилирования. Антитело может быть пэгилировано, например, для повышения биологического (напр., сывороточного) периода полужизни антитела. Для пэгилирования антитела антитело или его фрагмент обычно подвергают взаимодействию с полиэтиленгликолем (ПЭГ) реагентом, таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, в которых одна или несколько групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно, пэгилирование проводят посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Используемый в настоящем документе термин «полиэтиленгликоль» предназначен для охвата любой из форм ПЭГ, которые были использованы для дериватизации других белков, таких как моно (C1-C10) алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, подлежащее пэгилированию, представляет собой агликозилированное антитело. Способы пэгилирования белков известны в данной области и могут применяться к антителам, описанным в настоящем документе. См., например, EP 0154316 Nishimura *et al.* и EP 0401384 Ishikawa *et al.*

Альтернативно, при некоторых обстоятельствах может быть желательно уменьшить период полужизни антитела по настоящему изобретению, а не увеличить его. Модификации, такие как I253A (Hornick *et al.* (2000) *J. Nucl. Med.* 41:355) и H435A/R I253A или H310A (Kim *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 29:2819) в Fc человеческого IgG1 могут уменьшать связывание с FcRn, таким образом уменьшая период полужизни (увеличивая клиренс) для использования в ситуациях, когда предпочтительным является быстрый клиренс, например, при медицинской визуализации. См. также Kenanova *et al.* (2005) *Cancer Res.* 65:622. Другие способы усиления клиренса включают форматирование антигенсвязывающих доменов по настоящему изобретению в виде фрагментов антител, не обладающих способностью связываться с FcRn, таких как фрагменты Fab. Такая модификация может сократить период полужизни в кровотоке антитела от пары недель до нескольких часов. Селективное ПЭГилирование фрагментов антител можно затем использовать для точной настройки (повышения) периода полужизни фрагментов антител, если это необходимо. Chapman *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:780. Фрагменты антител также могут быть слиты с человеческим

сывороточным альбумином, напр., в конструкции слитого белка для увеличения периода полужизни. Yeh *et al.* (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 89:1904. Альтернативно, биспецифическое антитело может быть сконструировано с первым антигенсвязывающим доменом по настоящему изобретению и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывается с человеческим сывороточным альбумином (HSA). См. Межд. Публ. Пат. Заявки WO 2009/127691 и цитируемые там ссылки на патенты. Альтернативно, специализированные полипептидные последовательности могут быть добавлены к фрагментам антител для повышения периода полужизни, напр., полипептидные последовательности "XTEN". Schellenberger *et al.* (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:1186; Межд. Публ. Пат. Заявки WO 2010/091122.

Стабильность

Потенциальный сайт расщепления протеазой в шарнире конструкций IgG1 может быть устранен модификациями D221G и K222S, увеличивая стабильность антитела. WO 2014/043344.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитела, описанные в настоящем документе, не содержат сайтов изомерии аспарагина. Деамидирование аспарагина может происходить в последовательностях N-G или D-G и может приводить к образованию остатка изоаспарагиновой кислоты, который может ввести излом в полипептидную цепь и может снизить ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты).

Каждое антитело будет иметь уникальную изоэлектрическую точку (pI), которая обычно находится в диапазоне pH от 6 до 9,5. Значение pI для антитела IgG1 обычно находится в диапазоне pH 7-9,5, а значение pI для антитела IgG4 обычно находится в диапазоне pH 6-8. Существует предположение, что антитела с pI вне нормального диапазона могут иметь некоторое разворачивание и нестабильность в условиях *in vivo*. Таким образом, предпочтительно иметь антитело, которое содержит значение pI, которое находится в нормальном диапазоне. Это может быть достигнуто либо путем отбора антител с pI в нормальном диапазоне, либо путем мутации заряженных поверхностных остатков.

Каждое антитело будет иметь характерную температуру плавления, причем более высокая температура плавления указывает на большую общую стабильность *in vivo* (Krishnamurthy R and Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Как правило, предпочтительно, чтобы T_м (температура начального разворачивания) была выше чем 60°C, предпочтительно выше чем 65°C, еще более предпочтительно выше чем 70°C.

Температуру плавления антитела можно измерить, используя дифференциальную сканирующую калориметрию (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) или циркулярный дихроизм (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

В предпочтительном варианте выполнения изобретения выбираются антитела, которые не деградируют быстро. Деградация антитела может быть измерена с использованием капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander A J and Hughes D E (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

При использовании константного домена IgG4 обычно предпочтительно включать замену S228P, которая имитирует последовательность шарнира в IgG1 и тем самым стабилизирует молекулы IgG4, напр., снижает обмен плечом Fab между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 у пациента, которого лечат. Labrijn *et al.* (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:767; Reddy *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:1925. Аналогичным образом, в шарнире IgG2, содержащем антитела, мутация C219S и/или C220S стабилизирует антитело, содержащее шарнир IgG2.

Агрегация

В другом предпочтительном варианте выполнения изобретения выбирают антитела, которые имеют минимальные агрегационные эффекты, которые могут приводить к запуску нежелательного иммунного ответа и/или измененных или неблагоприятных фармакокинетических свойств. Обычно, антитела являются приемлемыми с агрегацией 25% или менее, предпочтительно 20% или менее, еще более предпочтительно 15% или менее, еще более предпочтительно 10% или менее и еще более предпочтительно 5% или менее. Агрегация может быть измерена несколькими методиками, включая колоночную гель-хроматографию (SEC), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и рассеяние света.

V. Белки, не принадлежащие к антителам, и производные антител

Описанное в настоящем документе изобретение также может быть применено к молекулам, которые не являются полноразмерными антителами, при условии, что они содержат шарнир. Например, могут быть получены слитые белки IgG с повышенной биологической активностью или отсутствием эффекторной функции. Соответственно, в настоящем документе представлены слитые белки, содержащие активный фрагмент, связанный, напр., ковалентно связанный, с константной областью IgG, напр., областью Fc, содержащей шарнир IgG2 и, необязательно, домены CH2 и CH3 или их части, или

связанный с IgG (напр., IgG1) или его частью с пониженной эффекторной функцией, напр., содержащей мутацию в P238, напр., P238K. Fc может представлять собой любой Fc модифицированной константной области тяжелой цепи, описанной в настоящем документе, такой как участки Fc модифицированной константной области тяжелой цепи, указанные в Таблицах 5, 6 или в Таблице Последовательностей.

Антитела, описанные в настоящем документе, также могут быть использованы для образования биспецифических молекул или молекул для терапии CAR-T. Антитело или его антигенсвязывающие части могут быть дериватизированы или связаны с другой функциональной молекулой, напр., другим пептидом или белком (напр., другим антителом или лигандом для рецептора) так, чтобы генерировать биспецифическую молекулу, которая связывается по меньшей мере с двумя различными связывающими сайтами или молекулами-мишенями. Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть дериватизированы или связаны с более чем одной другой функциональной молекулой для генерации мультиспецифических молекул, которые связываются с более чем двумя различными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; предполагается, что такие мультиспецифические молекулы также охватываются термином «биспецифическая молекула», как используется в настоящем документе. Для того чтобы создать биспецифическую молекулу, антитело, описанное в настоящем документе, может быть функционально связано (напр., путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или миметик связывания так, что получается биспецифическая молекула.

VI. Композиции

Кроме того, изобретение относится к композициям, напр., фармацевтическим композициям, содержащим одно или комбинацию антител, или их антигенсвязывающую часть (части), описанные в настоящем документе, составленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать одно или комбинацию (напр., двух или более разных) антител или иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, описанных в настоящем документе. Например, фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов, или биспецифических агентов), которые связываются с различными эпитопами на антигене-мишени или которые обладают комплементарной активностью.

В определенных вариантах выполнения изобретения композиция содержит антитело, описанное в настоящем документе, в концентрации по меньшей мере 1 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл, 150 мг/мл, 200 мг/мл, 1-300 мг/мл или 100-300 мг/мл.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, также можно вводить в составе комбинированной терапии, т.е., в сочетании с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать антитело, описанное в настоящем документе, в сочетании с по меньшей мере одним другим противораковым и/или стимулирующим Т-клетки (напр., активирующим) агентом. Примеры терапевтических агентов, которые могут быть использованы в комбинированной терапии, более подробно описаны ниже в разделе, относящемся к применению антител, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах выполнения изобретения терапевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, могут включать другие соединения, лекарственные средства и/или агенты, применяемые для лечения рака. Такие соединения, лекарственные средства и/или агенты могут включать, например, химиотерапевтические лекарственные средства, низкомолекулярные лекарственные средства или антитела, которые стимулируют иммунный ответ на данный рак. В некоторых случаях терапевтические композиции могут включать, например, одно или несколько из антитела к CTLA-4, антитела к PD-1, антитела к PDL-1, антитела к OX40 (также известного как CD134, TNFRSF4, ACT35 и/или TXGP1L) или антитела к LAG-3.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно, носитель пригоден для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (напр., путем инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения активное соединение, т.е., антитело, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, может быть покрыто материалом для того, чтобы защитить соединение от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения, описанные в настоящем документе, могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. «Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая сохраняет требуемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает нежелательного токсического действия

(см., напр., Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Примеры таких солей включают соли присоединения кислот и соли присоединения оснований. Кисотно-аддитивные соли включают соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как хлороводородная, азотная, фосфорная, серная, бромоводородная, иодоводородная, фосфористая и тому подобных, а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты и тому подобных. Основно-аддитивные соли включают соли, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и тому подобных, а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и тому подобных.

Фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, также может включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобные; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобные; и (3) хелатирующие металл агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобные.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобные) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Требуемая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как процедурами стерилизации, *supra*, так и включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и тому подобных. Кроме того, может быть желательно включать в композиции изотонические агенты, такие как

сахара, хлорид натрия и тому подобные. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть осуществлена путем включения в композицию агентов, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением тех случаев, когда обычные среды или агент несовместимы с активным соединением, их применение в фармацевтических композициях возможно. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно составить в форме раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и подходящими их смесями. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть осуществлена путем включения в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей фильтрующей микростерилизацией. Обычно, дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Количество активного ингредиента, который может быть объединен с материалом-носителем для получения разовой лекарственной формы, будет изменяться в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, который может быть объединен с материалом-носителем для получения разовой лекарственной формы, как правило, будет количеством композиции, которое дает терапевтический эффект. Как правило, из ста процентов это количество будет составлять от около 0,01 процента до около девяноста девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от около 0,1 процента до около 70 процентов, наиболее предпочтительно от около 1 процента до около 30 процентов активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Режимы дозирования регулируют так, чтобы обеспечить оптимальный желаемый ответ (напр., терапевтический ответ). Например, можно вводить единственный болюс, можно вводить несколько разделенных доз в течение времени или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с остротой терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно составлять парентеральные композиции в дозированной единичной форме для простоты введения и однородности дозы. Единичная дозированная форма, как используется в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве унифицированных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит предопределенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация для единичных дозированных форм, описанных в настоящем документе, диктуется и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который нужно достичь, и (b) ограничений, присущих в данной области техники для компаундирования такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

Для введения антитела дозировка составляет от около 0,0001 до 100 мг/кг и более обычно от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или в пределах 1-10 мг/кг. Типичный режим лечения включает введение один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели, один раз в месяц, один раз каждые 3 месяца или один раз каждые три-б месяцев. Предпочтительные схемы дозирования антитела, описанного в настоящем документе, включают 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела при внутривенном

введении, причем антитело вводят с использованием одного из следующих режимов дозирования: (i) каждые четыре недели для шести дозировок, затем каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) 3 мг/кг массы тела один раз, затем 1 мг/кг массы тела каждые три недели.

В некоторых способах два или более моноклональных антител с различной специфичностью связывания вводят одновременно, в этом случае дозировка каждого вводимого антитела попадает в указанные диапазоны. Антитело обычно вводят несколько раз. Интервалы между однократными дозами могут составлять, например, еженедельно, ежемесячно, каждые три месяца или ежегодно. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровня антител в крови к целевому антигену у пациента. В некоторых способах дозировку регулируют до достижения концентрации антител в плазме около 1-1000 мкг/мл, а в некоторых способах - около 25-300 мкг/мл.

Антитело можно вводить в виде препарата с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируются в зависимости от периода полужизни антитела у пациента. В целом, человеческие антитела показывают самый длинный период полужизни, за которыми следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и нечеловеческие антитела. Дозировка и частота введения могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических целях относительно низкие дозы вводятся с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. В терапевтических применениях иногда требуется относительно высокая доза с относительно короткими интервалами до тех пор, пока прогрессирование заболевания не уменьшится или не прекратится, и предпочтительно, пока пациент не покажет частичное или полное улучшение симптомов заболевания. После этого пациенту может быть назначен профилактический режим.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, можно варьировать так, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность используемых конкретных композиций по настоящему изобретению, или их сложного эфира, соли или амида, способ введения, время введения, скорость экскреции конкретного

используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в сочетании с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента, подлежащего лечению, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

«Терапевтически эффективная дозировка» антитела, описанного в настоящем документе, предпочтительно приводит к уменьшению выраженности симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов отсутствия симптомов заболевания или предотвращению нарушения или нетрудоспособности из-за заболевания. В контексте рака терапевтически эффективная доза предпочтительно предотвращает дальнейшее ухудшение физических симптомов, связанных с раком. Симптомы рака хорошо известны в данной области и включают, например, необычные признаки родинки, изменение внешнего вида родинки, включая асимметрию, границу, цвет и/или диаметр, новую пигментированную область кожи, аномальную родинку, затемненную область под ногтем, уплотнения молочной железы, изменения сосков, кисты молочной железы, боль в груди, смерть, потерю массы, слабость, чрезмерную усталость, трудности с питанием, потерю аппетита, хронический кашель, прогрессирование одышки, кашель с кровью, кровь в моче, кровь при дефекации, тошноту, рвоту, метастазы в печени, метастазы в легких, метастазы в костях, ощущение переполнения желудка, вздутие живота, жидкость в брюшной полости, вагинальное кровотечение, запор, вздутие живота, перфорацию толстой кишки, острый перитонит (инфекция, лихорадка, боль), боль, рвоту кровью, сильное потоотделение, лихорадку, высокое кровяное давление, анемию, диарею, желтуху, головокружение, озноб, мышечные спазмы, метастазы в толстой кишке, метастазы в легких, метастазы в мочевом пузыре, метастазы в печени, метастазы в кости, метастазы в почках и метастазы в поджелудочной железе, трудности с глотанием и тому подобное.

Терапевтически эффективная доза может предотвратить или отсрочить возникновение рака, что может быть желательным, если присутствуют ранние или предварительные признаки заболевания. Лабораторные тесты, используемые в диагностике рака, включают химию, гематологию, серологию и радиологию. Соответственно, любой клинический или биохимический анализ, который мониторит любое из вышеперечисленного, может использоваться для определения того, является ли конкретное лечение терапевтически эффективной дозой для лечения рака. Специалист в данной области сможет определить такие количества на основе таких

факторов, как размер субъекта, тяжесть симптомов субъекта и конкретная композиция или выбранный способ введения.

Композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в данной области техники. Как будет понятно специалисту в данной области, путь и/или способ введения будут изменяться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения антител, описанные в настоящем документе, включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза «парентеральное введение» означает способы введения, отличные от энтерального и топического введения, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию.

Альтернативно, антитело, описанное в настоящем документе, можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или слизистый путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или топически.

Активные соединения могут быть приготовлены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, такие как составы с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или общеизвестны специалистам в данной области. См., напр., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в данной области техники. Например, в предпочтительном варианте выполнения изобретения терапевтическую композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить с помощью устройства для безыгольной подкожной инъекции, такого как устройства, раскрытого в Пат. США No. 5,399,163; 5,383,851;

5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; или 4,596,556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей для применения с антителами, описанными в настоящем документе, включают: Пат. США No. 4,487,603, в котором раскрыт имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарственного средства с контролируемой скоростью; Пат. США No. 4,486,194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; Пат. США No. 4,447,233, в котором раскрыт инфузионный насос для доставки лекарственного средства с точной скоростью инфузии; Пат. США No. 4,447,224, в котором раскрыто имплантируемое инфузионное устройство с переменным потоком для непрерывной доставки лекарственного средства; Пат. США No. 4,439,196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарств, имеющая многокамерные отделения; и Пат. США No. 4,475,196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственных средств. Эти патенты включены в настоящий документ посредством ссылки. Многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули известны специалистам в данной области.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитела, описанные в настоящем документе, могут быть составлены для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для того чтобы гарантировать, что терапевтические соединения, описанные в настоящем документе, пересекают BBB (если требуется), их можно составлять, например, в липосомах. Способы производства липосом, см., напр., в Патентах США No. 4,522,811; 5,374,548 и 5,399,331. Липосомы могут содержать один или более остатков, которые селективно транспортируются в специфические клетки или органы, таким образом повышая целевую доставку лекарственного средства (см., напр., Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). Типичные нацеливающие фрагменты включают фолат или биотин (см., напр., Патент США 5,416,016 Low *et al.*); маннозиды (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); поверхностно-активный рецептор протеина A (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

VII. Применения и Способы

Антитела, композиции антител и способы, описанные в настоящем документе, имеют множество применений *in vitro* и *in vivo*, включая, например, лечение различных

расстройств, напр., рака. Например, антитела, описанные в настоящем документе, можно вводить в клетки в культуру, *in vitro* или *ex vivo*, или людям, напр., *in vivo*. Соответственно, изобретение относится к способам лечения субъекта, включающим введение субъекту антитела, содержащего модифицированную константную область тяжелой цепи, так что наступает лечение. Изобретение относится также к способам модификации иммунного ответа у субъекта, включающим введение субъекту антитела таким образом, что иммунный ответ у субъекта модифицируется. Предпочтительно, ответ усиливается, стимулируется или активируется. Однако в других вариантах выполнения изобретения иммунный ответ ингибируется.

Предпочтительные субъекты включают пациентов-людей, у которых было бы желательно усиление иммунного ответа. Способы особенно подходят для лечения пациентов-людей, имеющих расстройство, которое можно лечить путем усиления иммунного ответа (напр., опосредованного Т-клетками иммунного ответа). В конкретном варианте выполнения изобретения способы особенно подходят для лечения рака *in vivo*. В одном варианте выполнения изобретения субъект является субъектом, несущим опухоль, и иммунный ответ против опухоли стимулируется. Опухоль может быть солидной опухолью или опухолью жидких тканей, напр., гематологическим злокачественным новообразованием. В определенных вариантах выполнения изобретения опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. В определенных вариантах выполнения изобретения опухоль не является иммуногенной. В определенных вариантах выполнения изобретения опухоль является PD-L1-положительной. В определенных вариантах выполнения изобретения опухоль является PD-L1-отрицательной. Субъект также может быть носителем вируса, и иммунный ответ против вируса стимулируется.

Кроме того, предложены способы ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающие введение субъекту антитела, описанного в настоящем документе, таким образом, что рост опухоли ингибируется у субъекта. Изобретение также относится к способам лечения вирусной инфекции у субъекта, включающим введение субъекту антитела, описанного в настоящем документе, таким образом, что вирусная инфекция у субъекта лечится.

В настоящем документе также охватываются способы истощения Treg-клеток из микроокружения опухоли субъекта, имеющего опухоль, напр., раковую опухоль, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела, описанного в настоящем документе, которое содержит Fc, который стимулирует истощение T_{reg}-клеток в микроокружении опухоли. Fc может, напр., представлять собой

Fc с эффекторной функцией или усиленной эффекторной функцией, такой как связывание или усиленное связывание с одним или несколькими активирующими рецепторами Fc.

В определенных вариантах выполнения изобретения антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, связывается со стимулирующей молекулой и ингибирует ее активность, т.е., является антагонистом стимулирующей молекулы, или антитело связывается с ингибирующей молекулой и стимулирует ее активность, т.е., является агонистом ингибирующей молекулы. Такие антитела можно применять для лечения заболеваний, при которых иммунная система или иммунный ответ должны быть подавлены, напр., аутоиммунных заболеваний, или для предотвращения отторжений трансплантата.

Рак

В настоящем документе представлены способы лечения субъекта, имеющего рак, включающие введение субъекту антитела, описанного в настоящем документе, таким образом, что субъект подвергается лечению, напр., таким образом, что рост раковых опухолей ингибируется или уменьшается и/или что опухоли регрессируют. Например, активация GITR антителами к GITR может усиливать иммунный ответ на раковые клетки у пациента. Антитело можно применять отдельно для ингибирования роста раковых опухолей. Альтернативно, антитело можно использовать в сочетании с другим агентом, напр., другими иммуногенными агентами, стандартными схемами лечения рака или другими антителами, как описано ниже.

Злокачественные новообразования, рост которых можно ингибировать с применением антител, описанных в настоящем документе, включают злокачественные опухоли, обычно реагирующие на иммунотерапию. Неограничивающие примеры рака для лечения включают плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), не-NSCLC, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, почный рак (напр., светлоклеточный рак), рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки (напр., карцинома клеток почки (RCC)), рак предстательной железы (напр., гормонорезистентная аденокарцинома предстательной железы), рак щитовидной железы, нейробластома, рак поджелудочной железы, глиобластома (мультиформную глиобластома), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, карциному толстой кишки и рак головы и шеи (или карцинома), рак желудка, герминогенный рак, саркому детского возраста, синоназальный естественный

киллер, меланому (напр., метастатическую злокачественную меланому, такую как кожная или внутриглазная злокачественная меланома), рак кости, рак кожи, рак матки, рак анальной области, рак яичка, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному вагины, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, солидные опухоли детского возраста, рак мочеочника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (CNS), первичную лимфому CNS, опухолевый ангиогенез, опухоль оси позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркома Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, рак, вызванный окружающей средой, включая рак, вызванный асбестом, рак, связанный с вирусом (напр., опухоль, связанная с вирусом папилломы человека (HPV)), и гематологические злокачественные новообразования из любой из двух основных линий клеток крови, то есть, линии миелоидных клеток (которая продуцирует гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или линии лимфоидных клеток (которая продуцирует В, Т, NK и плазматические клетки), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, напр., острые, хронические, лимфоцитарные и/или миелогенные лейкозы, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфолейкоз (CLL) и хронический миелогенный лейкоз (CML), недифференцированный AML (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с созреванием клеток), промиелоцитарный лейкоз (M3 или вариант M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), изолированная гранулоцитарная саркома и хлором; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмоцитоидная лимфома, моноцитоидная В-клеточная лимфома, лимфома слизисто-ассоциированной лимфоидной ткани (MALT), анапластическая (напр., Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых, мантийноклеточная лимфома, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, кишечная Т-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, предшественник Т-лимфобластной лимфомы, Т-лимфобластная; и лимфома/лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическая Т-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома, посттрансплантационная лимфопролиферативная патология, истинная гистиоцитарная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная эффузионная

лимфома, лимфобластная лимфома (LBL), гематопоэтические опухоли лимфоидного происхождения, острый лимфобластный лейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, диффузная гистиоцитарная лимфома (DHL), иммунобластная крупноклеточная лимфома, предшественник В-лимфобластной лимфомы, кожная Т-клеточная лимфома (CTLC) (также называемая фунгоидным микозом или синдромом Сезари) и лимфоплазмоцитонидная лимфома (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как миелома IgG, миелома легких цепей, несекреторная миелома, вялотекущая миелома (также называемая индолентной миеломой), солитарная плазмочитома и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфома волосатых клеток; гематопоэтические опухоли миелоидного происхождения, опухоли мезенхимного происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; семиному, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, в том числе астроцитомы, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному, гематопоэтические опухоли лимфоидной линии, например опухоли Т-клеток и В-клеток, включая, но не ограничиваясь этим, нарушения Т-клеток, такие как пролимфоцитарный лейкоз Т-клеток (Т-PLL), в том числе мелкоклеточного и церебриформного типа; крупногранулярный лимфоцитарный лейкоз (LGL) преимущественно Т-клеток; а/д Т-NHL гепатоспленальную лимфому; периферическую/посттимусную Т-клеточную лимфому (плеоморфный и иммунобластный подтипы); ангиоцентрическую (назальную) Т-клеточную лимфому; рак головы или шеи, рак почки, рак прямой кишки, рак щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных видов рака. Способы, описанные в настоящем документе, могут также применяться для лечения метастатических видов рака, рефрактерных видов рака (напр., видов рака, резистентных к предшествующей иммунотерапии, напр., блокирующим антителом к CTLA-4 или PD-1), и рецидивирующих видов рака.

Комбинированные Терапии

В дополнение к терапиям, раскрытым выше, антитела, описанные в настоящем документе, также могут применяться в комбинации с другой терапией. Например, для лечения рака антитело, описанное в настоящем документе, может быть введено

субъекту, который также получает другое лечение рака, такое как химиотерапия, радиационная терапия, хирургическое вмешательство или генная терапия.

Способы лечения могут включать совместное введение антитела, описанного в настоящем документе (напр., антагонистического антитела, агонистического антитела и ADC, имеющего модифицированную константную область тяжелой цепи), с другой молекулой, напр., антителом (напр., антагонистическим антителом, агонистическим антителом и ADC). Описанное в настоящем документе антитело, которое стимулирует иммунную систему, может вводиться с другой молекулой, которая стимулирует иммунную систему, напр., с молекулой, которая является агонистом костимулирующей молекулы или ингибитором ингибирующей молекулы.

Антитело, как описано в настоящем документе, отдельно или с одним или несколькими дополнительными иммуностимулирующими антителами (напр., блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) можно комбинировать со стандартным лечением рака. Например, антитело, описанное в настоящем документе, отдельно или с одним или несколькими дополнительными антителами, можно эффективно комбинировать с химиотерапевтическими режимами. В этих случаях может быть возможно уменьшить дозу другого химиотерапевтического реагента, вводимого с помощью комбинации по настоящему изобретению (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является комбинация антитела, описанного в настоящем документе, с дополнительным антителом или без него, дополнительно в комбинации с декарбазином или IL-2 для лечения меланомы.

Описанное в настоящем документе антитело может быть объединено с антинеопластическим антителом, таким как Rituxan® (ритуксимаб), Herceptin® (трастузумаб), Vectra® (тоситумомаб), Zevalin® (ибритумомаб), Campath® (алемтузумаб), Lymphocide® (эпртузумаб), Avastin® (бевацизумаб) и Tarceva® (эрлотиниб) и тому подобными. Антитела, описанные в настоящем документе, также могут быть объединены с одним или несколькими из следующих химиотерапевтических агентов: камптотецин (CPT-11), 5-фторурацил (5-FU), цисплатин, доксорубицин, иринотекан, паклитаксел, гемцитабин, цисплатин, паклитаксел, карбоплатин-паклитаксел (Taxol), доксорубицин, 5-fu или камптотецин + apo21/TRAIL (комбинация 6X)); ингибитор протеасомы (напр., бортезомиб или MG132); ингибитор Bcl-2 (напр., BH3I-2' (ингибитор bcl-x1), ингибитор индоламиндиоксигеназы-1 (IDO1) (напр., INCB24360), AT-101 (производное R-(-)-госсипола), ABT-263 (малая молекула), GX-15-070 (обатоклак) или MCL-1 (антагонисты белка-1 клеточной дифференциации миелоидной лейкемии), антагонисты iAP (ингибитора белка апоптоза) (напр., smac7,

smac⁴, малая молекула миметика smac, синтетические пептиды smac (см. Fulda *et al.*, *Nat Med* 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторы HDAC (гистондеацетилазы), антитела к CD20 (напр., ритуксимаб), ингибиторы ангиогенеза (напр., бевацизумаб), антиангиогенные агенты, нацеленные на VEGF и VEGFR (напр., Avastin), синтетические тритерпеноиды (см. Hyer *et al.*, *Cancer Research* 2005;65:4799-808), модуляторы c-FLIP (клеточного FLICE-ингибирующего белка) (напр., природные и синтетические лиганды PPAR γ (рецептора γ , активируемого пероксисомным пролифератором), 5809354 или 5569100), ингибиторы киназы (напр., Сорафениб), Трастузумаб, Цетуксимаб, Темсиролимус, ингибиторы mTOR, такие как рапамицин и темсиролимус, Бортезомиб, ингибиторы JAK2, ингибиторы HSP90, ингибиторы PI3K-AKT, Леналидомид, ингибиторы GSK3 β , ингибиторы IAP и/или генотоксичные лекарственные средства.

Описанные в настоящем документе способы лечения антителами и комбинациями антител могут дополнительно применяться в сочетании с одним или несколькими антипролиферативными цитотоксическими агентами. Классы соединений, которые могут быть использованы в качестве антипролиферативных цитотоксических агентов, включают, но не ограничиваются ими, следующее:

Алкилирующие агенты (включая, без ограничения, азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): Урациловый иприт, Хлорметин, Циклофосфамид (CYTOXANTM) фосфамид, Мелфалан, Хлорамбуцил, Пипоброман, Триэтиленмеламин, Триэтилентioфосфорамин, Бусульфан, Кармустин, Ломустин, Стрептозоцин, Дакарбазин и Темозоломид.

Антиметаболиты (включая, без ограничения, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндеаминазы): Метотрексат, 5-Фторурацил, Флоксуридин, Цитарабин, 6-Меркаптопурин, 6-Тиогуанин, Флударабина фосфат, Пентостатин и Гемцитабин.

Подходящие антипролиферативные агенты для комбинирования с антителами, описанными в настоящем документе, без ограничения, таксаны, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен как TAXOLTM), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), Пелорузид А, эпотилоны, эпотилон А, эпотилон В, эпотилон С, эпотилон D, эпотилон Е, эпотилон F, фураноэпотилон D, дезоксиэпотилон B1, [17]-дегидродезоксиэпотилон В, [18]дегидродезоксиэпотилоны В, C12,13-циклопропил-эпотилон А, C6-C8 мостиковый эпотилон А, транс-9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-десметилэпотилон В, эпотилон B10, дискодермолид, патупилон (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, ХАА296А (Дискодермолид), TZT-

1027 (соблидотин), ILX-651 (гидрохлорид тасидотина), Галихондрин В, мезилат Эрибулина (E-7389), гемиастерлин (HTI-286), E-7974, Циртофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты Майтанзиноида (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (испинесиб), SB-743921, MK-0731, STA-5312, элеутеробин, 17-бета-ацетокси-2-этокси-6-оксо-В-гомоэстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклострептин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-дидеметил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1 в дополнение к другим стабилизирующим микротрубочки агентам, известным в данной области техники.

Комбинированные схемы введения можно вводить одновременно или последовательно. В определенных примерах комбинации представляют собой комбинации с фиксированной дозой.

В случаях, когда желательно сделать аберрантно пролиферативные клетки находящимися в покое в сочетании с лечением или до лечения антителами, описанными в настоящем документе, пациенту могут быть также введены гормоны и стероиды (включая синтетические аналоги), такие как 17 α -Этинилэстрадиол, Диэтилстилбестрол, Тестостерон, Преднизон, Флуоксиместерон, Дромостанолонпропионат, Тестолактон, Мегестролацетат, Метилпреднизолон, Метил-тестостерон, Преднизолон, Триамцинолон, Хлортрианизен, Гидроксипрогестерон, Аминоглутетимид, Эстрамустин, Медроксипрогестеронацетат, Лейпролид, Флутамид, Торемифен, ZOLADEX™. При использовании способов или композиций, описанных в настоящем документе, также могут вводиться по желанию другие агенты, применяемые для модуляции роста опухоли или метастазирования в клинических условиях, такие как антимиметики.

Способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических агентов известны специалистам в данной области. Кроме того, их введение описано в обычной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических агентов описано в справочнике врача Physicians' Desk Reference (PDR), напр., 1996 г. издания (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки на него.

Химиотерапевтический агент(ы) и/или радиотерапию можно вводить в соответствии с терапевтическими протоколами, хорошо известными в данной области. Специалистам в данной области будет очевидно, что введение химиотерапевтического агента(ов) и/или радиотерапии может варьироваться в зависимости от заболевания, подлежащего лечению, и известного влияния химиотерапевтического агента(ов) и/или радиотерапии на это заболевание. Кроме того, в соответствии со знаниями квалифицированного клинициста, терапевтические протоколы (напр., количества доз и

количество раз введения) могут варьироваться с учетом наблюдаемого воздействия вводимых терапевтических агентов на пациента и с учетом наблюдаемых реакций заболевания для назначаемых терапевтических агентов.

Настоящее раскрытие дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не следует рассматривать как дополнительное ограничение. Содержание всех фигур и всех ссылок, последовательностей Genbank, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в настоящей заявке, специально включено в настоящий документ посредством ссылки. В частности, описания заявок WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546, WO 09/054863, PCT/US2013/072918, PCT/US15/61632 и Патентная Публикации США No. 2011/0150892 специально включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Усиленная интернализация антител против CD73 с шарниром IgG2 относительно тех же антител с шарниром, не относящимся к IgG2.

Было отмечено, что полученное из гибридомы антитело 11F11 против CD73, которое имеет константную область IgG2, является более эффективным в клеточных анализах ингибирования CD73, чем антитело 11F11, в качестве IgG1 или IgG1.1 (IgG1 без эффектора), и более эффективно, чем другие антитела к CD73, имеющие константные области IgG1. На основании по меньшей мере этого наблюдения было высказано предположение, что повышенная ингибирующая активность антител против CD73, имеющих шарниры IgG2 относительно тех, которые имеют шарниры, не относящиеся к IgG2, такие как шарниры IgG1, обусловлена повышенной интернализацией антител. Для того чтобы проверить эту гипотезу, антитела к CD73, имеющие константные области IgG1 или IgG2 или их части, тестировали в анализах интернализации.

Использованные антитела перечислены в Таблице 7, в которой приведены идентификаторы каждого из доменов константных областей (все человеческие) каждого антитела, включая специфические мутации, если они присутствуют.

Таблица 7

Название антитела	VH	CH1	Шарнир	CH2	CH3	HC SEQ ID NO ¹	LC SEQ ID NO ²
11F11	11F11	IgG2	IgG2	IgG2	IgG2	44	72

4C3	4C3	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	45	73
6D11	6D11	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	46	74
CD73.10-IgG2-C219S	CD73.10	IgG2	IgG2 (C219S)	IgG2	IgG2	47	72
CD73.10-IgG2-C219S-IgG1.1	CD73.10	IgG2	IgG2 (C219S)	IgG1.1 (A330S/P331S)	IgG2	48	72
CD73.10-IgG1.1	CD73.10	IgG1.1	IgG1.1 (L234A/L235E/G237A)	IgG1.1 (A330S/P331S)	IgG1.1	49	72
CD73.4-IgG2-C219S	CD73.10	IgG2	IgG2 (C219S)	IgG2	IgG2	50	72
CD73.3-IgG1.1	CD73.3	IgG1.1	IgG1.1 (L234A/L235E/G237A)	IgG1.1 (A330S/P331S)	IgG1.1	51	73

¹SEQ ID NO полноразмерной тяжелой цепи

²SEQ ID NO полноразмерной легкой цепи

Антитела были получены путем экспрессии тяжелых и легких цепей в клетках HEK293-6E, а культуральную среду собирали через 5 дней после трансфекции.

Измеряли связывание конструкций с FcγR. Данные по связыванию hCD64 и hCD32a-H131 для молекул IgG1.1 и IgG2 соответствовали ожидаемым значениям для различных Fc. IgG1.1f является наиболее инертным Fc. IgG2 и IgG2-C219S показали типичное связывание FcR для IgG2. Как и ожидалось, данные для IgG2-C219S-G1.1f предполагают значительно более слабое связывание, чем для IgG1 или IgG2 дикого типа, но повышенное связывание по сравнению с IgG1.1f.

Аффинность антител к человеческому CD73 измеряли, чтобы определить, влияет ли на них изменение константной области. Аффинности определяли Поверхностным Плазмонным Резонансом (SPR) следующим образом. Кинетику связывания CD73 и аффинность изучали поверхностным Плазмонным резонансом (SPR) с использованием прибора Biacore T100 (GE Healthcare) при 25°C. В этом эксперименте проверялось связывание N-концевого домена hCD73 (состоящего из остатков 26 - 336 человеческого CD73; называемого N-hCD73) с антителами, которые были захвачены на поверхностях

иммобилизованного белка А. Для этих экспериментов белок А (Pierce) иммобилизовали до плотности 3000-4000 RU на проточных ячейках 1-4 сенсорного чипа CM5 (GE Healthcare) с использованием стандартной химии этил(диметиламинопропил)карбодиимид (EDC)/N-гидроксисукцинимид (NHS) с блокированием этаноламином в рабочем буфере 0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% об./об. tween 20. Кинетические эксперименты проводили путем первого захвата антител (5-10 мкг/мл) на поверхностях белка А с использованием времени контакта 30 с при 10 мкл/мин со связыванием 600, 200, 66,7, 22,2, 7,4 и 2,5 нМ N-hCD73-his, используя время ассоциации 180 с и время диссоциации 360 с при скорости потока 30 мкл/мин. Рабочий буфер для кинетических экспериментов представляет собой 10 мМ фосфат натрия, 130 мМ хлорид натрия, 0,05% tween 20, pH 7,1. Поверхности регенерировали после каждого цикла с использованием двух импульсов в 30 сек 10 мМ глицина, pH 1,5 при скорости потока 30 мкл/мин. Данные сенсограммы были дважды стандартизованы и затем адаптированы к модели Ленгмюра 1:1 с использованием оценочного программного обеспечения Biacore T100 v2.0.4 для определения константы скорости ассоциации (k_a), константы скорости диссоциации (k_d) и константы равновесной диссоциации (KD).

Результаты приведены в Таблице 8. В таблице собраны данные из разных экспериментов. Для антител, для которых показаны два набора чисел, каждый набор соответствует данным, полученным в отдельном эксперименте.

Таблица 8

mAb	Fc	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	KD (нМ)
11F11	IgG2	2.6E+05	4.2E-04	1.6
		2.9 E+05	1.6 E-04	0.56
4C3	IgG1	2.2E+04	2.4E-03	110
		2.4 E+04	2.2 E-03	92
6E11	IgG1	5.7E+04	1.4E-03	25
CD73.10	IgG1.1	2.7 E+05	1.3 E-03	4.7
CD73.10	IgG2-C219S	2.2 E+05	1.4 E-03	6.2
		2.2 E+05	1.8 E-03	8.3
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1	2.4 E+05	1.4 E-03	5.7
		2.3 E+05	1.60E-03	6.8
CD73.4	IgG2-C219S	2.9 E+05	1.6 E-04	0.55

		2.8 E+05	3.3 E-04	1.2
		2.9 E+05	3.7 E-04	1.3
CD73.3	IgG1.1	1.6 E+04	3.6 E-03	220

Результаты показывают, что присутствие различных константных областей в антителе, напр., CD73.10, не изменяет аффинность антитела к человеческому CD73.

Интернализацию антител против CD73 измеряли в двух разных анализах.

А. Анализ интернализации с высоким содержанием (анализ с фиксированным временем 2 часа)

Антитела к CD73 использовали для тестирования зависимой от антитела к CD73 интернализации CD73 в клетках Calu6 путем оценки клеточной экспрессии после 2 часов инкубации антител. Клетки (2000 клеток/лунка) в 20 мкл полной среды (Gibco RPMI Media 1640 с 10% инактивированной теплом фетальной бычьей сывороткой) высевали на 384-луночный планшет Falcon и выращивали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Антитела к CD73 серийно разводили буфером PBS, содержащим 0,2% BSA, и добавляли в количестве 5 мкл/лунка в клеточный планшет. Клетки инкубировали с антителами в течение 2 часов при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности, после чего один раз промывали буфером PBS. Формальдегид (конечный 4% в PBS) затем добавляли в клеточный планшет в количестве 20 мкл/лунка, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого всю жидкость аспирировали и клетки промывали один раз 30 мкл PBS. Детектируемое антитело (2,5 мкл/лунка анти-CD73 Ab CD73.10. IgG2C219S) IgG2C219S) добавляли в количестве 15 мкл/лунка в фиксированный клеточный планшет. Клетки инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день планшет дважды промывали буфером PBS с последующим добавлением вторичного антитела, содержащего Alexa-488 козы против человека и DAPI, окрашенного в течение 1 часа при комнатной температуре. После 3 промывок в буфереом PBS планшет визуализировали на Arrayscan Vti (Cellomics, Pittsburgh, PA). Измеряли IC₅₀ и Y_{max}. Y_{max} определяли, сравнивая с 100 нМ дозой 11F11 в качестве внутреннего максимума. Все расчеты были определены как процент интернализации по сравнению с этим контролем, который был установлен на 100%.

Результаты представлены в Таблице 9.

Таблица 9

mAb	Константная область	Эпитопная группа	EC50 (нМ)	Ymax
11F11	IgG2	1	0.58	98
4D4	IgG2	1	0.38	104
10D2	IgG1	1	ND	29
24H2	IgG1	1	8.2	51
7A11	IgG1	1	2.59	50
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1	1	1.2	97
CD73.10	IgG1.1	1	6.18	64
CD73.10	IgG2-C219S	1	0.67	99
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1	1	0.87	99

ND = Не Обнаружено

NA = Не Применимо

Результаты показывают, что антитела к CD73, имеющие шарнир IgG2, имеют более низкий EC50 и более высокий Ymax.

Для оценки скорости интернализации были проведены кинетические исследования интернализации. Было протестировано несколько клеточных линий: клетки H2228, клетки HCC15, клетки Calu6 и NCI-H2030. Клетки (2000 клеток/лунка) в 20 мкл полной среды (Gibco RPMI Media 1640 с 10% инактивированной теплом фетальной бычьей сывороткой) высевали на 384-луночный планшет Falcon и выращивали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Антитела к CD73 разводили до 10 мкг/мл буфером PBS, содержащим 0,2% BSA, и добавляли в количестве 5 мкл/лунка в клеточный планшет. Клетки инкубировали с антителами в течение 0-2 часов при 37°C с последующей промывкой один раз буфером PBS. Затем клетки фиксировали формальдегидом (конечный 4% в PBS) при комнатной температуре в течение 10 минут, а затем один раз промывали 30 мкл PBS. Детектируемое антитело (2,5 мкл/лунка, анти-CD73 Abs CD73.10.IgG2C219S) разбавляли буфером PBS, содержащим 0,2% BSA, и добавляли в количестве 15 мкл/лунка в фиксированный клеточный планшет. Планшет инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день после 3 промывок в буфере PBS, добавляли Вторичное антитело Alexa488 козы против человека с DAPI. Клетки окрашивали в течение 60 минут при комнатной температуре, после 3 промывок изображения получали с использованием Arrayscan Vti (Cellomics, Pittsburgh, PA).

Результаты представлены на Фигурах 1А-Ж и в Таблицах 10 и 11. Значения в Таблице 10 получены из данных, показанных на фигурах 1А - Ж.

Таблица 10

Линия клеток	11F11(IgG2) T _{1/2} (мин)	6E11(IgG1) T _{1/2} (мин)	CD73.10.IgG1.1f T _{1/2} (мин)
Calu6	3.9	60.9	14.4
HCC44	3.3	27.9	23.5
H2030	3.3	40.3	18.3
H647	45.7	N/A	N/A
H2228	10.9	36.5	35.7
HCC15	2.2	84.4	37.9
SKLU1	6.8	18.0	17.2
SKMES1	2.2	62.8	32.3
SW900	10.3	94.9	43.4

Таблица 11: T_{1/2} и% интернализация антител к CD73 в 4 клеточных линиях человека

	клетки H228		клетки HCC15		клетки Calu6		клетки H2030	
	T _{1/2} мин	% интер- нализации	T _{1/2} мин	% интер- нализации	T _{1/2} мин	% интер- нализации	T _{1/2} мин	% интер- нализации
CD73.11-IgG2CS	-	-	-	-	4.1	89	4.6	85
CD73.10-IgG2CS	9.7	93	2.6	91	3.0	91	3.3	85
CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f	9.4	92	3.0	91	3.1	91	4.3	87
CD73.4-IgG2CS	13.8	94	3.1	94	6.5	88	3.7	89
CD73.10-IgG1.1f	35.7	33	37.9	71	14.4	63	18.3	67
CD73.3-IgG1.1f	16.5	-47	>240	38	111.4	79	>120	27

11F11	10.9	96	2.2	94	3.9	87	3.3	90
4C3	7.6	-48	141.5	28	0.6	-6	>120	-34
6E11	36.5	13	84.4	64	107.4	68	40.32	51

Результаты показывают, что 11F11 (антитело IgG2) интернализируется в течение нескольких минут, достигая плато за 30 минут, тогда как 6E11 (антитело IgG1) интернализируется медленнее, достигая плато через около 1 ч (Фигуры 1A-J). Аналогично, 11F11 с константной областью IgG1 интернализируется медленнее, чем 11F11 с константной областью IgG2. Эта тенденция наблюдалась в нескольких клеточных линиях (Таблицы 10 и 11 и Фигуры 1A-J).

В. Интернализация, измеренная с помощью проточной цитометрии

Опосредованная антителом против CD73 интернализация CD73 также тестировалась с помощью проточной цитометрии. Указанные клетки инкубировали с 10 мкг/мл указанного антитела в течение 30 минут на льду, несколько раз промывали и переносили в 37°C на указанное время. Клетки собирали в одно и то же время после указанного времени инкубации. Клетки снова окрашивали первичным антителом (тем же антителом, которое использовалось для начальной инкубации), а затем вторичным антителом против человека. Затем клетки анализировали на экспрессию CD73 с помощью проточной цитометрии.

Результаты, которые показаны на Фигуре 1E и в Таблице 11, согласуются с результатами, полученными в анализах интернализации, описанных выше, и показывают, что все антитела с шарниром IgG2 и CH1 индуцировали быструю и полную интернализацию. Уровни CD73 оставались низкими после 22 часов после вымывания, что указывает на длительную интернализацию.

Аналогичные результаты, показанные на Фигуре 1F и в Таблице 11, были получены для клеточной линии NCI-H292, в которой антитело поддерживалось в культуре в течение времени инкубации (без вымывания). Опять же, эти данные указывают на быструю и значительную интернализацию и поддержание подавления эндогенного CD73.

Анализ интернализации также проводили с человеческими клетками SNU-C1 (клеточная линия рака толстой кишки) и NCI-H1437 (клеточная линия немелкоклеточного рака легкого). Результаты, которые показаны на Фигурах 1I и J, также указывают на быструю интернализацию с максимальным уровнем, достигнутым в течение 5 часов, и максимальным уровнем интернализации около 50% для CD73.4.IgG2-

C219S-IgG1.1f в SNU-C1 и 60% для клеток NCI-H1437. Фигуры 1G и H показывают сходную кинетику интернализации CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f в клетках Calu6 и NCI-H292. Для графиков, которые показывают % интернализованного CD73, это число было получено следующим образом:

$$\% \text{ интернализованного } CD73 = 100 - \left(\frac{MFI_{t=x} - MFI_{\text{фон}}}{MFI_{t=0} - MFI_{\text{фон}}} \times 100 \right)$$

где для каждого антитела $MFI_{t=x}$ представляет собой MFI в данный момент времени, а $MFI_{t=0}$ представляет собой максимальную флуоресценцию при $t=0$, а $MFI_{\text{фон}}$ представляет собой MFI только вторичного Ab.

Таблица 12: EC₅₀ опосредуемой антителами интернализации CD73 в нескольких клеточных линиях (данные с Фигур 1G-I)

	Calu6		NCI-H292		SNU-C1		SNU-C1 (без отмывки)		NCI-H1437		NCI-H1437 (без отмывки)	
	Ym ax (%)	T _{1/2} (ч)	Ym ax (%)	T _{1/2} (ч)	Ym ax (%)	T _{1/2} (ч)	Ym ax (%)	T _{1/2} (ч)	Ym ax (%)	T _{1/2} (ч)	Ym ax (%)	T _{1/2} (ч)
mAb- CD73. 4- IgG2- IgG1. 1f	76.8	0.56 61	77.6	0.26 33	48.9	0.49 54	38.3	1.0 25	63.1	0.31 64	62.7	0.34 18
mAb- CD73. 4- IgG2	75.5 9	0.60 03	78.4 2	0.27 66	-	-	-	-	-	-	-	-
mAb- CD73. 4-	44.9 9	1.73 7	51.4 9	0.20 87	30.5 8	0.99 15	33.1 6	2.3 3	49.7 6	0.49 15	49.9 5	0.53 84

IgG1. 1f												
-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Таким образом, антитела к CD73 с шарниром IgG2 усваиваются быстрее и в большей степени по сравнению с антителами против CD73 с шарниром IgG1.

Пример 2: Усиленная агонистическая активность антител к GITR с шарниром IgG2 относительно тех же антител с шарниром IgG1

Этот Пример демонстрирует, что антитела к GITR, содержащие шарнир IgG2, обладают повышенной способностью индуцировать секрецию IL-2 и IFN- γ Т-клетками по сравнению с теми же антителами, которые имеют шарнир IgG1.

В анализах CHO-ОКТ3 и 3A9, описанных выше, наблюдалось, что антитела, полученные из гибридомы, имеющие константную область IgG2, более эффективны в стимуляции секреции цитокинов, чем те же антитела, в которых константная область тяжелой цепи была переключена на область IgG1 или IgG1 без эффектора (IgG1.1). Следовательно, влияние константной области или шарнира IgG2 дополнительно тестировали на антителах к GITR в этих анализах.

Вариабельная область тяжелой цепи антитела к GITR человека (SEQ ID NO: 75) была связана с константными областями тяжелой цепи, показанными в Таблице 13. Легкая цепь антител к GITR содержала SEQ ID NO: 77. В Таблице 13 показана идентичность каждого домена константных областей:

Таблица 13: Константные области тяжелой цепи антител, использованных в этом Примере

Название антитела	CH1	Шарнир	CH2	CH3	SEQ ID NO*
анти-GITR	IgG2 SEQ ID NO:7	IgG2 SEQ ID NO:8	IgG2 SEQ ID NO:9	IgG2 SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:52
анти-GITR - IgG2	IgG2 SEQ ID NO:7	IgG2 SEQ ID NO:8	IgG2 SEQ ID NO:9	IgG2 SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:52

анти-GITR - IgG1	IgG1 SEQ ID NO:2	IgG1 SEQ ID NO:3	IgG1 SEQ ID NO:4	IgG1 SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:53
анти-GITR - IgG1.1	IgG1.1 SEQ ID NO:2	IgG1.1 (L234A/L235E/G237A) SEQ ID NO:25	IgG1.1 (A330S/P331S) SEQ ID NO:24	IgG1.1 SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:54
анти-GITR - IgG2-IgG1 или анти- GITR.g2.g1	IgG2 SEQ ID NO:7	гибрид IgG2/IgG1 SEQ ID NO:22	IgG1 SEQ ID NO:4	IgG1 SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:55
анти-GITR - IgG2-IgG1.1 или анти- GITR.g2.g1.1	IgG2 SEQ ID NO:7	IgG2 SEQ ID NO:8	IgG1.1 (A330S/P331S) SEQ ID NO:24	IgG1 SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:56

*SEQ ID NO полноразмерной константной области тяжелой цепи

Во-первых, аффинность связывания этих антител к GITR сравнивали с аффинностями связывания антител к GITR, имеющих шарнир IgG1. Аффинности связывания антител к GITR с растворимым GITR определялась с помощью Biacore следующим образом. Антитела к GITR были захвачены на покрытых чипах каппа-цепи человека (~ 5KRU; Southernbiotech cat#2060-01), и рекомбинантный человеческий GITR (rHGITR/Fc: R&D systems, CAT#689-GR) был пропущен через чип в концентрациях 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62 нМ и 31 нМ. Концентрация захвата mAb/объем составляла 2-40 мкг/мл (5 мкл при 10 мкл/мин). Время ассоциации антигена составляло 5 минут при 15 мкл/мин, время диссоциации антигена составляло 6 минут, и регенерацию проводили с помощью 50 mM HCl / 50 mM NaOH (12 мкл каждый при 100 мкл/мин).

Результаты, показанные на Фигуре 2, указывают, что все три антитела к GITR, имеющие шарнир IgG2, имеют сходные аффинности к активированным Т-клеткам, поскольку антитела к GITR имеют константную область IgG1 или IgG1.1.

Затем тестировали способность антител к GITR, имеющих константную область IgG1 или шарнир IgG2/домен Fc IgG1, индуцировать секрецию IL-2 и IFN-γ из донорных Т-клеток человека, стимулированных анти-CD3scFv (ОКТ3)-экспрессирующими

клетками CHO. Клетки CHO экспрессировали низкие уровни ОКТЗ так, чтобы промотировать субоптимальную стимуляцию, чтобы иметь возможность наблюдать агонизм антителами к GITR. CD4⁺ Т-клетки от донора стимулировали экспрессирующими ОКТЗ клетками CHO и антителом к GITR, и измеряли секрецию IL-2 и IFN- γ . Эксперименты проводили следующим образом. Для экспериментов с CD4⁺ Т-клетками получали CD4⁺ Т-клетки из PBMC человека с коктейлем, обогащенным CD4⁺ Т-клетками человека RosetteSep (StemCell Technology#15062) в соответствии с протоколом производителя. Клетки CHO, экспрессирующие анти-CD3scFv (ОКТЗ) (CHO-ОКТЗ), дважды промывали средой RPMI и подвергали облучению с дозой 50К Рад. Клетки собирали и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640 с добавлением 10% Фетальной Бычьей Сыворотки, 2 mM L-глутамин, 55 nM β -Меркаптоэтанол, 1 mM пирувата натрия и 100Ед/мл Пенициллина/стрептомицина) при концентрации $2,5 \times 10^5$ /мл. Высекали $2,5 \times 10^4$ клеток CHO-ОКТЗ и 1×10^5 Т-клеток на лунку в 96-луночный планшет с плоским дном класса TC (Costar). Клетки инкубировали с 8-точечным, 4-кратным титрованием антител к GITR, начиная с 40 мкг/мл. Нерелевантный hIgG1 добавляли с концентрацией 40 мкг/мл в качестве контроля изотипа. Образец только с клетками был включен для того, чтобы показать исходную активность без какой-либо обработки. Супернатант из каждого образца собирали в день 2 для измерения IL-2 (только для анализов с CD4⁺ Т-клетками) (набор BD opt EIA Human IL-2 ELISA; BD Bioscience # 555190) и в день 3 для измерения IFN- γ (Набор BD optEIA human IFN-g ELISA; BD Bioscience # 555142).

Как показано на Фигурах 3А и В, антитело с шарниром IgG2/доменом Fc IgG1 (анти-GITR.g2.g1) индуцирует секрецию как IL-2, так и IFN- γ Т-клетками в большей степени, чем антитело с константной областью IgG1 (анти-GITR.g1). Аналогичные результаты были получены с безэффекторными версиями этих константных доменов (Фигура 3С).

Для дальнейшего подтверждения повышенной активации Т-клеток антителами к GITR, содержащими шарнир IgG2, тестировали секрецию IL-2 в другом экспериментальном формате. В этом эксперименте способность антител к GITR индуцировать секрецию IL-2 из клеток 3А9-hGITR (клеточная линия гибридомы 3А9 Т-клеток мыши, эктопически экспрессирующая человеческий GITR) была протестирована следующим образом. Клеточную линию гибридомы 3А9 Т-клеток мыши, которая эктопически экспрессирует человеческий GITR (3А9-hGITR), культивировали на планшетах, покрытых моноклональными антителами против CD3, в присутствии увеличивающихся количеств указанных антител. 5×10^4 клеток 3А9-hGITR

культивировали на планшетах, покрытых 1 мкг/мл антитела к CD3 (Клон 145-2C11; BD Biosciences), и обрабатывали указанными концентрациями антител в течение 7 часов.

Как показано на Фигуре 4, все антитела, имеющие шарнир IgG2 (анти-GITR.g2, анти-GITR.g2.g1f и анти-GITR.g2.g1.f), индуцировали секрецию IL-2 из клеток 3A9-hGITR до более высокой степени, чем их аналоги (анти-GITR.g1f и анти-GITR.g1.1f), содержащие константные области IgG1.

Эти результаты в целом предполагают, что антитела к GITR, имеющие шарнир IgG2 и константные области g1 или g1.1, являются более сильнодействующими, чем те же антитела, имеющие шарнир IgG1.

Пример 3: Влияние различных комбинаций шарнир/Fc на размер комплексов антитело/антиген

Как показано в приведенных выше Примерах, антитела к CD73 с шарниром IgG2 являются лучшими ингибиторами клеточной активности CD73 и лучше интернализуются, чем те же антитела с шарниром IgG1, а антитела к GITR с шарниром IgG2 являются более сильными агонистами, чем те же антитела с шарниром IgG1. На основании этого наблюдения и того факта, что шарнир IgG2 является более жестким, чем шарнир IgG1, было выдвинуто предположение, что между антигеном и антителами, имеющими шарнир IgG2, образуются более крупные комплексы по сравнению с антителами, имеющими шарнир IgG1. Для анализа этой гипотезы был проведен следующий эксперимент.

Структуру и олигомерное состояние комплексов CD73/антитело в растворе исследовали с помощью SEC-MALS и DLS. Для этих исследований антитела, содержащие либо константную область IgG1, либо IgG2, смешивали при различных молярных отношениях с рекомбинантными белками, содержащими либо полноразмерный внеклеточный домен человеческого CD73, содержащий C-концевую полигистидиновую метку (аминокислотные остатки 26 - 546 человеческого CD73, обозначен hCD73-his), либо фрагмент, соответствующий N-концевому домену человеческого CD73 (аминокислотные остатки 26 - 336, обозначен N-hCD73-his).

Олигомерное состояние комплексов CD73/антитело исследовали с помощью эксклюзионной хроматографии, соединенной со встроенным многоугловым детектором рассеяния света (SEC-MALS). Изократические разделения проводили на колонке Shodex PROTEIN KW-803, подключенной к Prominence Shimadzu UFLC в буфере, содержащем 200 мМ K₂HPO₄, 150 мМ NaCl, pH 6,8, содержащем 0,02% азида Na (отфильтрованный через 0,1 мкм), со скоростью 0,5 мл/мин. Образцы вводили в колонку с использованием

автосамплера SIL-20AC Prominence Shimadzu, и данные получали с трех онлайн-детекторов, подключенных последовательно: UV-спектрофотометр с диодной матрицей UV/vis Prominence SPD-20AD, затем Многоугловой Детектор Светорассеяния Wyatt miniDAWN™ TREOS, затем Детектор Показателя Преломления Wyatt Optilab T-rEX. Данные собирали и анализировали с использованием программного обеспечения Astra (Wyatt) и Labsolutions (Shimadzu).

Исследования динамического рассеяния света (DLS) проводили на планшетном ридере Wyatt DynaPro в 384-луночных планшетах при 25°C. Экспериментальными параметрами были 20 сборов по 5 сек на каждое измерение, и измерения были записаны по четырем экземплярам, при этом сообщалось среднее и стандартное отклонение. Автокорреляционные функции интенсивности подбирались с использованием алгоритма «Регуляризация» в программном обеспечении Dynamics (Wyatt Technologies).

Краткое описание SEC-MALS и DLS представлено на Фигурах 6 и Фигуре 7. Анализ отдельных антител показывает время удерживания (около 16-17 мин), массы (140-150 кДа) и гидродинамические радиусы (5,0-5,4 нм) для каждого антитела, которые типичны для мономерного моноклонального антитела. Данные для белка hCD73-his соответствуют белку, принимающему ожидаемую димерную структуру в растворе; в частности, масса, определенная по данным SEC-MALS (120 кДа), согласуется с ожидаемой для димера CD73-his (117 кДа) и не согласуется с тем, что можно ожидать для мономера hCD73-his (58,5 кДа). Данные для N-hCD73 согласуются с тем, что рекомбинантный белок N-домена является мономерным в растворе (измеренная масса SEC-MALS = 38 кДа по сравнению с ожидаемой массой мономера = 35,0 кДа), что ожидается из-за того, что область полноразмерного внеклеточного домена CD73, который отвечает за димеризацию белка, содержится в С-концевом домене без вклада остатков N-домена.

Обнаружено, что эквимоллярные смеси данного антитела с N-hCD73-his элюируются в SEC как единственный вид с более коротким временем удержания, чем антитело или только N-hCD73-his, а также с большими гидродинамическими радиусами (Rh) по DLS, что согласуется с образованием комплексов. Данные MALS указывают массы для этих комплексов приблизительно 210 кДа. Это согласуется с тем, что одна молекула N-hCD73-his связана с каждым из двух доменов Fab данного антитела с образованием комплекса 1:2 антитело:N-hCD73-his.

Данные SEC-MALS для смесей антител против CD73 с димером hCD73-his показывают, что смесь элюируется раньше, чем hCD73-his или одно антитело, что позволяет предположить, что комплексы образуются. Сравнение данных для mAb,

которые содержат одну и ту же варибельную область, но разные константные домены, показывает, что времена элюирования для комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константные домены IgG2 (IgG2-C219S, IgG2-C219S-IgG1.1f), являются более ранними, чем для комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константный домен IgG1.1f. Кроме того, определенные по MALS массы для комплексов hCD73-his с mAb, содержащих константный домен IgG2, больше, чем для комплексов hCD73-his с mAb, содержащих константный домен IgG1. Данные DLS также показывают, что гидродинамический радиус комплексов hCD73-his с mAb, содержащих константный домен IgG2, больше, чем у комплексов hCD73-his с mAbs, содержащих константный домен IgG1. Например, данные SEC-MALS и DLS для CD73.4 с тремя разными константными областями (IgG2-C219S, IgG2-C219S-IgG1.1f или IgG1.1f) показаны на Фигуре 5. На ней можно увидеть, что комплекс hCD73-his с CD73.4, содержащий константный домен IgG2, имеет более короткое время удерживания (Фигура 5A), большие гидродинамические радиусы (Фигура 5B) и большие массы, определенные по MALS (Фигура 5C), по сравнению с комплексами hCD73-his с CD73.4-IgG1.1f. На основе масс по MALS схематическая модель структуры и стехиометрии комплексов между hCD73-his и антителами показана на Фигуре 5D, где комплексы, содержащие CD73.4-IgG1.1f, преимущественно образуют меньшие 2:2 (пик 1 = ~ 550 кДа) или 4:4 димерные комплексы mAb/CD73 (пик 2 = ~ 1300 кДа), тогда как CD73.4-IgG2-C219S или CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f образуют гораздо более крупные комплексы (> 3000 кДа) с hCD73-his, для которого точная структура и стехиометрия не могут быть уверенно смоделированы.

В совокупности, данные SEC-MALS и DLS демонстрируют, что более крупные комплексы образуются между hCD73-his и mAb, содержащими шарнирную область IgG2 (IgG2-C219S или IgG2-C219S-IgG1.1f), по сравнению с теми, которые содержат шарнирную область IgG1 (IgG1.1f).

Пример 4: CH1 изотипа IgG2 дополнительно улучшает опосредованную антителами интернализацию CD73

Дополнительные анализы интернализации были проведены в клетках Calu6 и H292 для дальнейшего определения роли изотипа в интернализации. Анализы интернализации проводили, как описано в Примерах 1A и 1B (протокол проточной цитометрии без стадии вымывания антител), а антитела различных гибридных изотипов, показанные в Таблице 14, выдерживали в культуре при 10 мкг/мл в течение времени инкубации. Для экспериментов с проточной цитометрией способ из Примера 1B был

адаптирован для анализа с высокой пропускной способностью в 96-луночных планшетах (в отличие от 48-луночных планшетов) и с 50000 клеток на лунку.

Таблица 14: Константные области, протестированные с переменными областями CD73.4:

<u>Конструкции</u>	<u>SEQ ID NO</u>	<u>Описание</u>
	<u>константной области</u>	
IgG1f	78	IgG1f дикого типа
IgG1.1f	83	стандартный инертный IgG1.1f
IgG2.3	79	IgG2 А-форма (C219S)
IgG2.5	82	IgG2 В-форма (C131S)
IgG2.3G1-KH	81	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 из IgG2.3, все другие IgG1f
IgG2.5G1-KH	90	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 из IgG2.5, все другие IgG1f
IgG2.3G1-AY	80	CH1 и верхний шарнир IgG2.3, все другие IgG1f
IgG2.5G1-AY	89	CH1 и верхний шарнир IgG2.5, все другие IgG1f
IgG1-G2.3G1-KH	93	CH1 из IgG1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 из IgG2.3, все другие IgG1f
IgG1-G2.3G1-AY	92	CH1 из IgG1, верхний шарнир IgG2.3, все другие IgG1f
IgG2.3G1.1f-KH	84	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 из IgG2.3, все другие IgG1.1f
IgG2.5G1.1f-KH	88	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 из IgG2.5, все другие IgG1.1f
IgG1-deltaTHT	85	IgG1 с последовательностью THT, удаленной из шарнира
IgG2.3-plusTHT	86	IgG2.3 с последовательностью THT (из IgG1), добавленной в шарнир
IgG2.5-plusTHT	91	IgG2.5 с последовательностью THT (из IgG1), добавленной в шарнир
IgG2.3-plusGGG	87	IgG2.3 с гибкой последовательностью GGG, добавленной в шарнир

Было показано, что связывание FcγR является ожидаемым для каждой конструкции, т.е., связывание FcγR обусловлено нижним шарниром/областью CH2.

Результаты показаны на Фигурах 8А, В и С, а также в Таблицах 15 и 16. Данные, показанные в Таблице 15, были получены с использованием того же протокола, описанного в Примере 1В (без вымывания антител). Данные, показанные в Таблице 16, были получены с использованием того же протокола, который описан в Примере 1А.

Таблица 15: Y_{max} и T_{1/2} опосредованной антителами интернализации CD73 в клетках Calu6 и NCI-292

	Calu6		NCI-H292	
	Y _{max} (%)	T _{1/2} (ч)	Y _{max} (%)	T _{1/2} (ч)
mAb-CD73.4-IgG1f/LC-11F11-Vk2	55.72	0.8452	73.05	0.5014
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-AY-pTT5-SP	85.07	0.3326	90.25	0.272
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-KH	81.62	0.3962	91.61	0.2801
mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-AY	72.7	0.4229	84.51	0.3083
mAb-CD73.4-IgG1-deltaTHT	69.27	0.5652	83.63	0.3441
mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-KH	65.67	0.5674	83.29	0.343
mAb-CD73.4-IgG2.3-plusTHT	81.19	0.3551	91.41	0.2935
mAb-CD73.4-IgG2.3-plusGGG	81.72	0.3355	91.6	0.2712
mAb-CD73.4-IgG2.5	78.98	0.3485	89.56	0.3057
mAb-CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH	79.63	0.3527	90.86	0.2993
mAb-CD73.4-IgG2.5G1-AY	81.91	0.2901	91.3	0.2452

mAb-CD73.4-IgG2.5G1-KH	76	0.2837	90.75	0.256
mAb-CD73.4-IgG2.5plusTHT/LC	80.15	0.2869	89.6	0.2565
mAb-CD73.4-IgG2-C219S/LC	82.35	0.3725	88.91	0.2866
mAb-CD73.4-IgG2-C219S/LC	82.54	0.3639	87.66	0.2845
mAb-CD73.4-IgG1.1f+K/LC	57.07	1.519	70.4	0.4969
mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	80.98	0.3508	90.35	0.2764

Таблица 16: Характеристики интернализации CD73.4 с различными константными областями в клетках Calu6

CD73_mAb_Clones	Интернализация	
	Max	Скорость
CD73.4-IgG1f/LC-11F11-Vk2	+	+
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-AY-pTT5-SP5	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-KH	++++	+++
CD73.4-Vh-hHC-G1-G2.3-G1-AY	++	++
CD73.4-Vh-hHC-G1-G2.3-G1-KH	++	++
CD73.4-Vh-hHC-IgG1-deltaTHT	++	+++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-plusTHT	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-plusGGG	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1.1f-KH	++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1-AY	+++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1-KH	+++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5plusTHT/LC	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/LC	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/LC	++++	++++
CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f+K/LC	+	+

CD73.4-Vh-hCh-IgG2-C219S-IgG1.1f	++++	++++
----------------------------------	------	------

На Фигурах 8А-С и в Таблицах 15 и 16 показано, что антитела, имеющие шарнир и домен CH1 изотипа IgG2, наиболее эффективны для стимулирования интернализации CD73, тогда как антитела, имеющие шарнир IgG1 и домен IgG1, соответствуют нижним кривым на фигуре, т.е., более низкой степени интернализации. Кроме того, антитела только с шарниром из IgG2 имеют повышенную интернализацию по сравнению с шарниром человеческого IgG1. Таким образом, антитела, имеющие шарнир и домен CH1 изотипа IgG2, имеют превосходные характеристики интернализации по сравнению с антителами с изотипом IgG1.

Таким образом, антитело против CD73 mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (имеющее шарнир IgG2 с заменой C219S и домен CH1 IgG2) вызывало быструю интернализацию в зависимости от тестируемой клеточной линии. $T_{1/2}$ для интернализации варьировался от минут до часа. Большинство протестированных клеточных линий имели $T_{1/2}$ менее 10 минут. Для некоторых клеточных линий была индуцирована почти полная интернализация, и у большинства протестированных наблюдалось снижение экспрессии CD73 на поверхности по меньшей мере на 50%, которое обычно достигало максимальных уровней к 5 часам, в некоторых случаях значительно короче.

Пример 5: CH1 IgG2 усиливает индуцированную GITR Ab секрецию IL-2 CD4+ Т-клетками

В этом Примере показано, что домен CH1 изотипа IgG2 усиливает индуцированную антителом к GITR активность Т-клеток по сравнению с антителом с доменом CH1 изотипа IgG1.

Те же самые модифицированные константные области тяжелой цепи, которые использовались в Примере 4, были связаны с переменными областями антитела к GITR (Примера 2). Донорные CD4+ Т-клетки инкубировали с клетками CHO, экспрессирующими OKT3-scFv, и различными антителами к GITR, и измеряли уровень секретируемого IL-2. Это было проведено, как описано в Примере 2.

Результаты, показанные на Фигуре 9, указывают на то, что все антитела к GITR, имеющие домен CH1 изотипа IgG2, в дополнение к шарниру изотипа IgG2, более эффективны в стимуляции секреции IL-2 из CD4+ Т-клеток, чем антитела, имеющие шарнир IgG1 и CH1.

Таким образом, этот Пример показывает, что присутствие шарнира IgG2 и домена CH1 IgG2 в агонистическом антителе к GITR дополнительно усиливает агонистическую активность антитела по отношению к тому же антителу, которое не имеет шарнира и/или домена CH1 изотипа IgG2. Антитело, имеющее как шарнир, так и домен CH1 изотипа IgG2, обладает более сильным агонистическим эффектом по сравнению с антителом, имеющим шарнир, но не CH1, изотипа IgG2. Кроме того, антитело с доменом CH1 из IgG2 обладает более сильной агонистической активностью, чем антитело с доменом CH1 из изотипа IgG1. Антитело с шарниром из IgG2 и доменом CH1 из IgG1 обладает более сильной агонистической активностью, чем антитело с CH1 и шарниром из изотипа IgG1.

Пример 6: Роль определенных аминокислотных остатков в CH1 IgG2 и шарнир в улучшении опосредованной антителами интернализации CD73

Антитела к CD73 (CD73.4) с константными областями тяжелой цепи, показанными в Таблице 17, получали и тестировали, как описано выше в анализах интернализации CD73, опосредованных антителами.

Таблица 17: Константные области тяжелой цепи, которые были слиты с переменными областями анти-CD73

<u>Описание</u>	<u>Конструкции</u>	<u>SEQ ID NO константной области</u>
Домен CH1 из IgG2 со всеми другими IgG1. Также мутант Cys>Ser для снижения потенциальной дисульфидной гетерогенности:	G2-G1-G1-G1	94
	G2.5-G1-G1-G1	95
Домен CH1 из IgG1 со всеми другими IgG2.3:	G1-G2.3-G2-G2	96
Замена областей CH1 в IgG1 на такие же из IgG2 либо по-отдельности, либо вместе:	G1-KRGE GSSNLF	97
	G1-KRGE GS	98
	G1-SNLF	99
	IgG1-ITNDRTPR	100
	G1-SNLFPR	101
	G2-RKEGSGNSFL	102

Замена областей CH1 в IgG2 на такие же из IgG1 либо по-отдельности, либо вместе:	G2-RKEGSG	103
	G2-NSFL	103
	IgG2-TIDNTRRP	105
	G2-NSFLRP	106
IgG1 с остатками домена CH2 из IgG2:	G1-G1-G2-G1-AY	107
	G1-G1-G2-G1-KH	108
IgG2 с остатками домена CH2 из IgG1:	G2-G2.3-G1-G2-KH	109
	G2.5-G2.3-G1-G2-KH	110
	G2-G2.3-G1-G2-AY	111
	G2.5-G2.3-G1-G2-AY	112
Замена областей шарнира между IgG1 и IgG2:	G1-G2.3-G1-G1-KH	113
	G2-G1-G2-G2-AY	114
	G2.5-G1-G2-G2-AY	115
	G1-G2-G1-G1-AY	116
	G2-G1-G2-G2-KH	117
	G2.5-G1-G2-G2-KH	118
Усечения шарнира	IgG1-deltaHinge	119
	IgG2-deltaHinge	120
	IgG2.5-deltaHinge	121
	IgG1-deltaG237	122
	IgG2-plusG237	123
Другое	IgG2.4	124
	IgG2.3/4	125

Результаты, показанные на Фигуре 10, предоставляют следующую информацию в контексте интернализации CD73:

- домен CH2 не оказывает влияния, как показано с помощью
 - о а) наблюдалась очень небольшая разница в способности к интернализации между антителами, содержащими модифицированную константную область тяжелой цепи с форматом «AY» (имеющими шарнир IgG2 ERKCCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 8), по сравнению с антителами с форматом «KH» (ERKCCVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 22) (Набор 5, 6 и 7);
 - о б) замены CH2 сопоставимы с дикими типами G1 или G2 (Наборы 5 и 6); и

о с) остаток 237 не оказывает влияния на интернализацию: ни добавление остатка «G» к шарниру IgG2, ни удаление С-концевого «G» в шарнире IgG1 не влияют на интернализацию (Набор 9).

Это говорит о том, что домен CH2 не влияет на интернализацию (т.е., домен CH2 может быть из IgG1 или IgG2);

- Замена областей CH1, указанных в Наборе 3 (KRGE GSSNLF; KRGE GS; SNLF; ITNDRTPR и SNLFPR) в IgG1, на те же IgG2 обеспечивает небольшое преимущество, т.е., интернализация остается сходной с интернализацией IgG1; см. Набор 3);
- Замена областей CH1, указанных в Наборе 4 (RKEGSGNSFL; RKEGSG; NSFL; TIDNTRRP и NSFLRP) в IgG2, на те же IgG1 имеет переменное влияние: изменение NSFL не оказывает влияния, в то время как другие 2 области (RKEGSG & RP) участвуют (см. Набор 4). Исходя из результатов Наборов 3 и 4, представляется, что существует взаимодействие между областью CH1 и шарниром, причем области RKEGSG и RP более важны, чем область NSFL;
- Шарнирная область влияет на интернализацию, т.е., шарнир IgG2 обеспечивает лучшую интернализацию по сравнению с шарниром IgG1 (см. Наборы 7 и 8). Кроме того, IgG1 с делецией (G1-дельта-шарнир) улучшает интернализацию по сравнению с IgG1. IgG2 с делецией (G2-дельта-шарнир) обеспечивает аналогичный уровень интернализации по сравнению с таковым у шарнира IgG2. Это говорит о том, что шарнирная область влияет на интернализацию, эффект которой усиливается с помощью CH1 IgG2 (G2-G1-G2-G2-AY сравним с G1-G2-G1-G1-AY);
- IgG2.4 (C220S) имеет сходную или пониженную интернализацию по сравнению с IgG2.3 (C219S). IgG2.3/4 (C219S/C220S) имеет значительно сниженную интернализацию по сравнению с одним IgG2.3 или IgG2.4 (см. Набор 10). Это говорит о том, что интернализация антитела с шарниром IgG2 и C219S примерно такая же, как и у шарнира IgG2 с C220S, оба из которых намного лучше, чем у шарнира IgG2 с C219S и C220S;
- IgG2.5 (мутация C131S) имеет меньшую интернализацию по сравнению с конструкциями с C131 (см. Наборы 1, 6 и 7).

Таким образом, эти результаты показывают, что домен CH1 и шарнир оба имеют отношение к интернализации CD73, опосредованной антителом, и что антитело, имеющее последовательности IgG2 из этих доменов, интернализируется с большей эффективностью по сравнению с антителом, имеющим эти области из IgG1.

Пример 7. Антитела, имеющие шарнир IgG2 и/или домен CH1, образуют комплексы с высокой молекулярной массой

Антитела к CD73.4, имеющие константные области тяжелой цепи, указанные в Таблице 14, также тестировали на образование комплексов с высокой молекулярной массой в экспериментах SEC-MALS и DLS, как описано в Примере 3.

Три из 16 антител в этом исследовании были протестированы ранее: CD73.4-IgG1.1f, CD73.4-IgG2-C219S CD73.4-IgG1.1f, CD73.4-IgG2-C219S (также называемое CD73.4-IgG2.3) и CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f (также называемое CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH). Данные SEC-MALS и DLS только для антител показали времена удерживания, массы и гидродинамические радиусы для каждого антитела, которые типичны для мономерного моноклонального антитела. Эквимоллярные комплексы каждого антитела (5,5 мкМ) с hCD73-his (5,5 мкМ) показали более медленные времена удерживания для всех комплексов по сравнению с антителом или только hCD73-his, что указывает на образование комплексов. Наложение данных хроматограммы SEC для каждого из 16 комплексов показано на Фигуре 11A. Данные хроматограммы можно разделить на 4 отдельных пика, которые показаны на Фигуре 11B. Пик 1 содержит самые крупные виды, причем определенные с помощью MALS массы указывают на комплексы с эквивалентной массой более 4:4 hCD73-his:mAb комплексы. Пик 2 содержит виды с определенными с помощью MALS массами, что предполагает наличие комплексов около 2:2 hCD73-his:mAb комплексов. Пик 3 является второстепенным видом с низким сигналом и определенными с помощью MALS массами, предполагающими комплексы около 1:1 hCD73-his:mAb. Пик 4 соответствует элюированию только mAbs с определенными с помощью MALS массами, соответствующими свободному антителу. Для количественного определения относительных количеств каждого вида 4 пика каждой хроматограммы интегрировали в виде пика 1 (<12,9 мин), пика 2 (12,9-15,1 мин), пика 3 (15,1-16,7 мин), пика 4 (16,7-19,3 мин). Интеграция также включала дополнительный интегрированный диапазон, называемый пиком 5 (> 19,3 мин), для учета любых низкомолекулярных частиц, которые оказались незначительными (<3,5% для всех комплексов). Процент каждого вида из этой интеграции представлен в Таблице 18. Все комплексы содержали одинаковый небольшой процент пика 3 (около 6-9%), но различные количества других пиков. Наиболее примечательно то, что все комплексы между hCD73-his и антителами, содержащими домен CH1 из hIgG1, имели значительно больший процент более мелких комплексов (пик 2), тогда как те, которые содержали домен CH1 из hIgG2, имели больший процент более крупных комплексов (пик 1) (Таблица 18 и Фигура 11C). Это говорит о важной роли не только шарнирной области, но и домена CH1 в формировании комплекса более высокого порядка.

Таблица 18: Времена удерживания антител к CD73.4 с модифицированными константными областями тяжелой цепи

	% UV				
	Пик1	Пик2	Пик3	Пик4	Пик5
Комплексы	<12.9 мин	12.9-15.1 мин	15.1-16.7 мин	16.7-19.3 мин	>19.3 мин
CD73.4-IgG2.3 + hCD73-his	37.0	23.8	7.7	28.6	2.9
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH + hCD73-his	36.0	23.8	7.9	29.3	3.0
CD73.4-IgG1.1f + hCD73-his	28.4	36.2	7.4	25.6	2.3
CD73.4-IgG1f + hCD73-his	26.0	36.5	7.5	27.8	2.2
CD73.4-IgG2.3G1-AY + hCD73-his	30.2	24.3	8.1	34.4	3.0
CD73.4-IgG2.3G1-KH + hCD73-his	34.9	23.4	7.9	30.7	3.0
CD73.4-IgG1-G2.3G1-AY + hCD73-his	14.6	29.2	6.4	48.3	1.6
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH + hCD73-his	23.8	32.6	7.0	34.5	2.1
CD73.4-IgG1-deltaTHT + hCD73-his	28.3	35.4	7.0	26.9	2.4
CD73.4-IgG2.3-plusTHT + hCD73-his	30.6	24.3	8.3	33.7	3.2
CD73.4-IgG2.3-plusGGG + hCD73-his	30.0	23.9	8.2	34.9	2.9
CD73.4-IgG2.5 + hCD73-his	31.7	24.4	8.4	32.5	3.1
CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH + hCD73-his	30.7	24.3	8.9	32.7	3.4
CD73.4-IgG2.5G1-AY + hCD73-his	26.3	24.8	8.1	38.3	2.6
CD73.4-IgG2.5G1-KH + hCD73-his	21.4	24.1	7.0	45.6	1.9
CD73.4-IgG2.5-plusTHT + hCD73-his	32.6	23.5	8.3	32.6	3.0

Пример 8. Связывание с Рецептором Fc для антител со сконструированными константными доменами

Этот Пример демонстрирует, что антитела, имеющие модифицированные константные области тяжелой цепи, включающие CH1 и шарнир IgG2, связываются с FcγR, когда они содержат домены CH2 и CH3 IgG1.

Помимо связывания антигена вариабельными доменами, антитела могут взаимодействовать с рецепторами Fc-гамма (FcγR) посредством взаимодействия с константными доменами. Эти взаимодействия опосредуют эффекторные функции, такие как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Активность функции эффектора высокая для изоформа IgG1, но очень низкая или отсутствует для IgG2 и IgG4 из-за того, что эти изоформы имеют

более низкую аффинность к FcγR. Кроме того, эффекторная функция IgG1 может быть модифицирована путем мутации аминокислотных остатков в пределах константных областей для изменения аффинности и селективности FcγR.

Связывание антител с рецепторами Fc-гамма (FcγR или FcγR) изучали с использованием биосенсорных технологий, включая поверхностный плазмонный резонанс Biacore (SPR) и Биослойную Интерферометрию Fortebio (BLI). Исследования SPR проводились на приборе Biacore T100 (GE Healthcare) при 25°C. Фрагмент Fab из мышиного антитела против анти-6xHis иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с использованием EDC/NHS до плотности ~ 3000 RU. Различные FcγR с меткой his (7 мкг/мл) захватывали через C-концевую метку his, используя время контакта 30 с при 10 мкл/мин, и связывание антитела с концентрацией 1,0 мкМ оценивали в рабочем буфере 10 мМ NaPO₄, 130 мМ NaCl, 0,05% p20 (PBS-T) pH 7,1. FcγR, использованные для этих экспериментов, включали CD64 (FcγRI), CD32a-H131 (FcγRIIa-H131), CD32a-R131 (FcγRIIa-R131), CD32b (FcγRIIb), CD16a-V158 (FcγRIIIa-V158), CD16b-NA1 (FcγRIIIb-NA1) и CD16B-NA2 (FcγRIIIb-NA2). Эксперименты BLI проводили на приборе Fortebio Octet RED (Pall, Fortebio) при 25°C в 10 мМ NaPO₄, 130 мМ NaCl, 0,05% p20 (PBS-T) pH 7,1. Антитела захватывали из неразбавленных супернатантов экспрессии на сенсорах, покрытых белком A, с последующим связыванием аналитов 1 мкМ hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158 или 0,1 мкМ hCD64.

Сначала были получены антитела, связывающиеся с различными мишенями, которые содержат модифицированные домены Fc IgG1, включая замены S267E (SE) и S267E/L328F (SELF), а также различные комбинации мутаций P238D, P271G, H268D, A330R, G237D, E233D, упоминаемые как V4, V7, V8, V9 и V12. Связывание этих антител изучали с помощью Biacore SPR в сравнении с антителами IgG1f, IgG2.3 (IgG2-C219S) и IgG4.1 (IgG4-S228P), а также с антителом IgG1.1f, которое было разработано для уменьшения связывания со всеми FcγR. Результаты, которые показаны на Фигуре 12, демонстрируют ожидаемые свойства связывания FcγR для IgG1f, IgG2.3 и IgG4.1 и мутированных антител IgG1, включая повышенное связывание с CD32a-H131, CD32a-R131 и CD32b для SE и SELF, а также повышенную селективность мутантов V4, V7, V8, V9 и V12 в отношении CD32b по сравнению с CD32a-H131 и CD32a-R131, Фигура 12.

Следующий набор конструкций был использован для конструирования эффекторной функции в отрицательный изотип IgG2 эффекторной функции. Для этого исследования описанные выше мутации были введены в контексте константной области IgG2.3 или гибрида IgG2.3/IgG1f, названного IgG2.3G1-AY, Таблица 19. Антитела в небольшом масштабе экспрессировали в виде супернатантов и тестировали на

связывание с FcgR с использованием технологии Интерферометрического биосенсора Fortebio Octet BioLayer. Поскольку антитела присутствовали в супернатантах с низкой концентрацией, эксперимент проводили путем захвата антител из супернатантов с использованием сенсоров, покрытых белком А, с последующим связыванием аналитов FcgR в растворе. Очищенный и супернатантный контрольный IgG1f, включающий антитела IgG1, SE, P238D, V4 и V12 дикого типа, также были включены для сравнения, и каждое из этих контрольных антител продемонстрировало ожидаемые свойства связывания с FcgR, Фигура 13. Антитело IgG2.3 также продемонстрировало ожидаемый профиль связывания с заметным связыванием только с CD32a-H131. Однако все мутации для введения мутаций S267E, L328F, P238D, P271G, H268D, A330R, G237D или E233D в IgG2.3 не смогли воспроизвести аффинность FcgR соответствующих сконструированных mAb IgG1, Фигура 13. Напротив, конструкция IgG2.3G1-AY была способна полностью сохранять FcgR-связывающие свойства IgG1 дикого типа, в то же время сохраняя CH1 и шарнирные области IgG2.3. Кроме того, все мутанты IgG2.3G1-AY, содержащие S267E, L328F, P238D, P271G, H268D, A330R, G237D и E233D, продемонстрировали свойства связывания с FcgR, сравнимые с mAb версии IgG1, содержащими те же мутации, Фигура 13. Это демонстрирует успешное конструирование антител с CH1 и шарнирными участками IgG2 в сочетании с эффекторной функцией дикого типа или мутантного IgG1.

Таблица 19: Сконструированные конструкции IgG2

Набор	ID	Конструкция	Seq ID#
1	IgG2.3	hHC-IgG2-C219S	
	IgG2.3-V13	hHC-IgG2-C219S – P238D	
	IgG2.3-V14	hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G	
	IgG2.3-V15	hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G	
	IgG2.3-V16	hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G,A330R	
	IgG2.3-V17	hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G, A330R	
	IgG2.3-V18	hHC-IgG2-C219S – S267E	
	IgG2.3-V19	hHC-IgG2-C219S – S267E,L328F	
2	IgG2.3G1	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f	
	IgG2.3G1-AY-V20	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D	

	IgG2.3G1-AY-V21	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f P238D,P271G	–	
	IgG2.3G1-AY-V22	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f P238D,H268D,P271G	–	
	IgG2.3G1-AY-V23	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f P238D,P271G,A330R	–	
	IgG2.3G1-AY-V24	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f P238D,H268D,P271G,A330R	–	
	IgG2.3G1-AY-V25	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	–	
	IgG2.3G1-AY-V26	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f E233D,G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	–	
	IgG2.3G1-AY-V27	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – S267E		
	IgG2.3G1-AY-V28	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f S267E,L328F	–	

Эта инжиниринговая стратегия была дополнительно изучена путем получения других антител, отформатированных с помощью IgG2.3G1-AY, IgG2.3G1-AY-S267E (IgG2.3G1-AY-V27), а также вариантов формы IgG2-B (IgG2.5G1-AY и IgG2.5G1-AY-V27) и других гибридных антител, содержащих различные комбинации константных доменов IgG1 и IgG2, и тестирования связывания этих антител с анти-his Fab, захватывающими меченные his FcgR с использованием технологии Biacore SPR. В соответствии с данными супернатанта Octet данные SPR показали, что антитела IgG2.3G1-AY и IgG2.3G1-AY-V27 обладали сопоставимыми свойствами связывания FcgR с IgG1f и IgG1f-S267E соответственно, несмотря на то что они содержали области CH1 и шарнирные области антитела А-формы IgG2 (IgG2.3) (Фигура 14А и В и Таблица 20). Аналогичные данные были также получены с использованием антител IgG2.5G1-AY и IgG2.5G1-AY-V27, демонстрирующих успешное конструирование антител В-формы IgG2 (содержащих мутацию C131S, называемые IgG2.5), имеющих IgG1f или модифицированные подобные IgG1f эффекторные функции. Данные для нескольких других антител с константными областями IgG2.3G1-AY, IgG2.3G1-AY-V27, IgG2.5G1-AY или IgG2.5G1-AY-V27, но с различными переменными областями, показывают, что эта инженерная стратегия широко применима к другим антителам, независимым от переменных доменов (Фигура 14А и В и Таблица 20). Другими конструкциями,

которые демонстрируют свойства связывания FcγR, подобного IgG1f, являются IgG1-G2.3G1-AY и IgG1deltaTHT, тогда как некоторые из модифицированных конструкций константной области были неспособны сохранять свойства связывания подобного IgG1f FcγR, включая конструкции IgG2.3G1-KH, IgG2.5G1-KH, IgG2.3plusTHT, IgG2.5plusTHT и IgG2.3plusGGG (Фигура 14А и В и Таблица 20).

Таблица 20: Значения %Rmax для 1 мкМ антител, связывающихся с захваченными анти-his Fab белками FcγR-his

mAb	hCD64	hCD32a-H131	hCD32a-R131	hCD32b	hCD16a-V158	hCD16B-NA2
mAb8-IgG1f	80%	82%	51%	27%	51%	21%
mAb9-IgG1f	70%	33%	19%	4%	28%	10%
CD73.4-IgG1f	65%	46%	26%	6%	43%	17%
GITR.6-IgG1f	66%	35%	25%	8%	41%	19%
CD73.4-IgG1.1f	2%	0%	2%	1%	0%	0%
GITR.6-IgG1.1f	2%	0%	3%	1%	0%	0%
mAb11-IgG2.3	2%	44%	17%	5%	1%	0%
CD73.4-IgG2.3	3%	48%	11%	1%	1%	0%
mAb6-IgG2.3	3%	66%	14%	3%	1%	0%
GITR.6-IgG2.3	4%	40%	10%	1%	2%	0%
mAb4-IgG2.3	1%	39%	6%	1%	1%	0%
mAb5-IgG2.3	6%	100%	30%	4%	3%	0%
mAb12-IgG2.3	2%	39%	7%	1%	1%	0%
mAb13-IgG2.3	2%	40%	7%	1%	1%	0%
mAb11-IgG2.5	0%	40%	13%	3%	0%	-1%
mAb7-IgG2.5	4%	72%	19%	2%	2%	0%
mAb8-IgG2.5	3%	59%	14%	3%	2%	0%
mAb10-IgG2.5	1%	29%	5%	1%	1%	0%
CD73.4-IgG2.5	3%	40%	7%	1%	1%	0%
mAb6-IgG2.5	3%	75%	17%	4%	2%	0%
GITR.6-IgG2.5	4%	43%	13%	2%	2%	1%

mAb4-IgG2.5	2%	46%	8%	1%	1%	0%
mAb5-IgG2.5	6%	89%	26%	5%	4%	1%
mAb12-IgG2.5	1%	36%	6%	1%	1%	0%
mAb13-IgG2.5	-2%	39%	4%	-2%	0%	-2%
mAb8-IgG2.3G1-AY	77%	61%	38%	10%	38%	13%
mAb10-IgG2.3G1-AY	67%	23%	14%	4%	24%	8%
CD73.4-IgG2.3G1-AY	65%	38%	20%	5%	38%	14%
GITR.6-IgG2.3G1-AY	66%	43%	33%	16%	42%	21%
mAb7-IgG2.5G1-AY	80%	73%	45%	12%	47%	19%
mAb8-IgG2.5G1-AY	77%	70%	45%	17%	48%	22%
CD73.4-IgG2.5G1-AY	65%	43%	24%	7%	40%	16%
GITR.6-IgG2.5G1-AY	65%	38%	27%	10%	41%	19%
CD73.4-IgG2.3G1-KH	2%	15%	2%	0%	2%	0%
GITR.6-IgG2.3G1-KH	3%	13%	3%	0%	3%	1%
CD73.4-IgG2.5G1-KH	2%	17%	2%	0%	3%	0%
GITR.6-IgG2.5G1-KH	2%	15%	3%	0%	3%	1%
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH	1%	10%	1%	0%	1%	0%
GITR.6-IgG2.3G1.1f-KH	2%	9%	2%	0%	1%	0%

CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH	1%	6%	1%	0%	1%	0%
GITR.6-IgG2.5G1.1f-KH	3%	15%	4%	0%	2%	0%
mAb7-IgG2.3G1-AY-V27	84%	68%	92%	76%	26%	7%
mAb8-IgG2.3G1-AY-V27	78%	67%	80%	67%	24%	7%
mAb10-IgG2.3G1-AY-V27	69%	24%	57%	40%	12%	3%
mAb7-IgG2.5G1-AY-V27	81%	74%	89%	84%	32%	9%
mAb8-IgG2.5G1-AY-V27	77%	76%	79%	77%	33%	10%
CD73.4-IgG1-G2.3G1-AY	66%	50%	31%	10%	48%	23%
GITR.6-IgG1-G2.3G1-AY	66%	36%	25%	7%	42%	19%
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH	2%	18%	2%	0%	4%	1%
GITR.6-IgG1-G2.3G1-KH	2%	21%	2%	0%	5%	1%
CD73.4-IgG1deltaTHT	65%	43%	23%	6%	42%	17%
GITR.6-IgG1deltaTHT	66%	57%	42%	17%	48%	27%

CD73.4- IgG2.3plusTHT	3%	42%	8%	1%	1%	0%
GITR.6- IgG2.3plusTHT	6%	45%	17%	2%	3%	1%
CD73.4- IgG2.5plusTHT	2%	34%	7%	1%	1%	0%
GITR.6- IgG2.5plusTHT	5%	44%	15%	2%	3%	1%
CD73.4- IgG2.3plusGGG	3%	43%	8%	1%	1%	0%
GITR.6- IgG2.3plusGGG	6%	45%	17%	2%	3%	1%

Взятые вместе, эти данные показывают, что последовательность, непосредственно С-концевая с консервативным мотивом CPPCPAP в шарнирной области, придает опосредованную FcγR эффекторную функцию, тогда как CH1 и верхние части шарнира антитела могут быть заменены IgG2 или модифицированными последовательностями IgG2 для потенциального комбинирования эффекторных функций IgG1 и модифицированного IgG1 с превосходными интернализирующими или сигнальными свойствами антител, содержащих CH1 и/или шарнирные области IgG2.

Пример 9: Интернализация агонистических Ab к GITR усиливается в антителах, имеющих шарнир IgG2 и домен CH1

Для индукции экспрессии GITR клетки инкубировали в течение 72 часов при 37°C с 20 нг/мл анти-CD3 + 1000 нг/мл CD28. В качестве альтернативного способа активации Т-клеток большие партии активированных CD4⁺ Т-клеток готовили по трехстадийному протоколу культивирования. Вкратце, CD4⁺ Т-клетки стимулировали связанным с планшетом CD3 (1,5 мкг/мл), дополненным 1 мкг/мл растворимого CD28 в течение 72 часов при 37°C, размножали в культуре в течение 14 дней в присутствии 20 ед/мл IL2 и, наконец, подвергали воздействию другого цикла активации путем добавления 10 мкг/мл РНА, 2 мкг/мл IL2 и 1 мкг/мл CD28 в течение 72 часов при 37°C. Стимулированные Т-клетки высевали в 384-луночные планшеты для визуализации PDL в течение 2 часов для прикрепления клеток, охлаждали в течение 15 мин при 4°C, а затем отдельно добавляли

меченные Alexa 488 антитела к GITR в течение 1 ч. Наконец, планшеты визуализировали с помощью HCS, и данные были представлены как общая интенсивность на клетку.

Три различных антитела к GITR были оценены с использованием вышеупомянутых способов активации Т-клеток. Они представляют собой антитело к GITR.6 в качестве изотипа G1 и инертного (IgG1.1) изотипа, неспособного связываться с рецепторами Fc, а также химеры с шарниром IgG2 вместо шарнира IgG1.

Индукцию антителами к GITR интернализацию оценивали в стимулированных CD3 CD4⁺ Т-клетках с использованием формата анализа гашения Alexa. Свежеполученные положительные по CD4 Т-клетки инкубировали в соответствии с описанным выше для того, чтобы вызвать экспрессию GITR. После стимуляции клетки ресуспендировали в свежую среду и высевали для анализа на интернализацию следующим образом. Клетки инкубировали с антителом, как описано выше, промывали теплой средой и инкубировали при 37°C в течение указанного времени перед фиксацией и гашением. Интернализованное антитело измеряли как повышенную флуоресценцию выше небольшого негасимого сигнала, наблюдаемого в нулевой момент времени, а затем нормализовали по отношению к общей флуоресценции «негасимого контроля», первоначально связанного с клетками. Как показано на Фигуре 15, лигирование GITR приводило к быстрой интернализации с пиками между 30-60 минутами для каждого тестируемого антитела, тогда как было обнаружено, что контрольные антитела поддерживают локализацию на плазматической мембране. Результаты показывают, что шарнирная область IgG2 усиливает интернализацию, индуцированную лигированием GITR.

Для дальнейшего изучения детальных механизмов интернализации и связанных динамик был проанализирован эндоцитоз и доставка антител в ранние компартменты эндосом. В этом эксперименте клетки подвергали пульс-чейз анализу с немечеными антителами. После фиксации клетки пермеабелизовали и окрашивали ранним эндосомным маркером EEA1 (технология передачи сигналов клеток), промывали и затем детектировали с помощью вторичного анти-кроличьего антитела, конъюгированного с Alexa fluor-488 (EEA1), и анти-человеческого антитела, конъюгированного с Alexa fluor-647 (GITR). Пластины визуализировали на конфокальной системе Орега с 60-кратным водноиммерсионным объективом. Результаты показали четкую сегрегацию между окрашиванием мембраносвязанных антител к GITR и внутриклеточным сигналом EEA1. При нагревании культур была обнаружена кластеризация для некоторых антител, которые, по-видимому, совместно локализуются с эндосомальными белками. Количественную оценку эндосомальной совместной локализации проводили с

использованием Программного обеспечения HCS Studio, и результаты наносили на график как отношение интенсивности солокализованного пикселя к общему окрашиванию (Фигура 16). Солокализация антитела к GITR и ранней эндосомы наиболее выражена через 30 минут. В этот тестируемый момент времени GITR.6.G2.G1f показало более высокую солокализованную фракцию, чем антитело GITR.6.G1f. Результаты солокализации коррелируют с наблюдениями, сделанными с использованием описанного выше способа гашения Alexa, и подтверждают модель, предполагающую, что шарнир G2 обладает потенциальным преимуществом по сравнению с G1 для индуцирования интернализации GITR.

Пример 10: Передача сигналов агонистических Ab к GITR в CD4+ и CD8+ Т-клетках, активированных Т-клеточным рецептором, усиливается в антителах, имеющих шарнир IgG2 и домен CH1

Для того чтобы дополнительно исследовать механизмы для агонистических антител к GITR, контролировали несколько сигнальных путей, вовлеченных в активацию Т-клеток, таких как сигнальные пути NFκB и P38.

CD4+ и CD8+ Т-клетки от здорового донора (M6576) активировали планшетом, покрытым 0,4 мкг/мл анти-CD3 и 0,4 мкг/мл анти-CD28. Через 3 дня клетки собирали и высевали на 384-луночные планшеты для изображения для активации сигнализирования. После того как клетки оседали в планшете в течение 2 часов, их обрабатывали антителами к GITR в течение 15 минут, и события передачи сигналов прекращали, добавляя формальдегид в аналитический планшет до конечных 10%. Затем клетки пермеабелизировали и окрашивали антителом фосфор-p65 NFκB для обнаружения сигналов. Как показано на Фигуре 17 антитела GITR.6.G2 и GITR.6.G2.G1f имели более высокие сигнальные ответы по сравнению с GITR.6.G1f как в CD4+, так и в CD8+ Т-клетках. Хотя прямых доказательств связывающей интернализации и активации сигнального пути нет, интересно отметить, что изотип G2, по-видимому, улучшает оба аспекта функциональной активности антител по сравнению с IgG1 для GITR.6.

Для количественной оценки сигнальных активностей для каждого антитела были рассчитаны как EC50, так и Emax для каждого антитела, поскольку оба параметра являются критическими для захвата полной степени сигнального события. Уровень ответа GITR.6.G2.G1f выбран в качестве 100%-ного контроля, и все другие антитела были нормализованы против него. Как показано в Таблице 21 для обеих популяций CD4+ и CD8+ Т-клеток, активированных антителами к CD3 и CD28, существует целый ряд активностей для антител к GITR с точки зрения как потенции (EC50), так и

эффективности ($E_{max}\%$). Хотя GITR.6.G2, GITR.6.G2.G1f и GITR.6.G1f продемонстрировали сходные потенции (EC_{50}) в диапазоне 10 нМ, эффективность (E_{max}) была довольно разной для разных изоформ, предполагая, что антитело к G1 не передает сигнал так же эффективно, как G2 или химерные изоформы.

Таблица 21. Краткая информация о Сигнальных активностях GITR HuMab NFkB в Активированных TCR CD4+ и CD8+ Т-клетках

Антитело	CD4+ Т-клетки		CD8+ Т-клетки	
	EC_{50} (нМ)	E_{max} (%)	EC_{50} (нМ)	E_{max} (%)
GITR.6.G2	12.8	69	9.00	85
GITR.6.G2.G1f	9.00	100	3.77	92
GITR.6.G1f	7.3	10.8	20.05	27
Изотипический Контроль hIgG1	Неактивно	4	Неактивно	6

Для дальнейшего подтверждения, ограничивается ли различие сигнализации GITR.6.G2 и GITR.6.G2.G1f по сравнению с GITR.6.G1f только передачей сигналов NFkB или это верно и для других событий сигнализации, было исследовано считывание сигналов P38MAPK. Как показано на Фигуре 18, антитела GITR.6.G2 и GITR.6.G2.G1f имели более высокие сигнальные ответы по сравнению с антителом GITR.6.G1f в анализе активации p38 MAPK клеток CD4+. Следовательно, лучшая сигнальная активность для изоформы GITR.6 G2 по сравнению с изоформой G1 не ограничивается только передачей сигналов NFkB.

В дополнение к повышенной агонистической активности и интернализации было также показано, что модифицированные константные области тяжелой цепи могут придавать усиленную ADCC (напр., агонисту стимулирующего рецептора), а также придавать новую активность антителу. Например, было обнаружено, что изменение константного домена тяжелой цепи антитела, которое связывается с ингибирующей молекулой клеточной поверхности и предотвращает ингибирующую активность молекулы клеточной поверхности (антагониста) в отношении модифицированной константной области тяжелой цепи, описанной в настоящем документе, приводило к тому, что антитело теряет способность быть антагонистом и вместо этого наделяет его агонистической активностью (ингибирующей активностью).

Пример 11: Подтверждение дисульфидных связей конструкций IgG2.3 и IgG2.5.

Структуры дисульфидной связи в антителе, содержащем константный домен IgG2.3 (форма А), IgG2.3G1 (форма А) и IgG2.5 (форма В), были подтверждены как правильные при сравнении невосстановленного и восстановленного гидролизата Lys-C.

Образцы антител переваривали с помощью Lys-C, который специфически расщепляет пептидные связи на карбоксильной концевой стороне остатков Лизина (K, Lys). Пептиды в гидролизате разделяли с использованием колонки Waters ACQUITY VEN C18, 1,7 мкм, 2,1×150 мм, обращенно-фазовой колонки HPLC, и детектировали с помощью ультрафиолетового (УФ) детектора при 214 нм и масс-спектрометра Thermo LTQ.

Ферментативное переваривание с помощью Lys-C и восстановление дисульфидных связей: В пробирку, содержащую 100 мкг образца антитела, добавляли 120 мкл денатурирующего буфера, в результате чего получали 3,7 М раствор GuHCl, 0,2 М Tris pH 7,0. Смесь инкубировали при 55°C в течение 30 минут. Алкилирование белка осуществляли добавлением 1 мкл 50 мМ Йодацетамида в вышеупомянутый раствор, затем инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут. Алкилированный образец разбавляли 80 мкл dH₂O и добавляли Wako Lys-C при соотношении фермента к субстрату 1:10. Антитела переваривали в течение ночи в темноте при комнатной температуре. После расщепления из переваренного с помощью Lys-C образца удаляли аликвоту 100 мкл и добавляли 10 мкл 0,5 М DTT. Этот образец инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа для уменьшения дисульфидных связей.

Полученные результаты следующие:

Дисульфидная структура антител IgG2.3 и IgG2.3G1 (форма А): В пределах области Fab тяжелой цепи Cys22 (H) связан с Cys98 (H), а Cys151 (H) связан с Cys 207(H). В области Fc тяжелой цепи Cys265 (H) связан с Cys325 (H), а Cys371 (H) связан с Cys429 (H). В области Fab легкой цепи Cys23 (L) связан с Cys88 (L), а Cys134 (L) связан с Cys194 (L). С-конец легкой цепи Cys214 (L) связан с тяжелой цепью в Cys138 (H). Шарнирная область тяжелой цепи содержит три остатка цистеина Cys227 (H), Cys230 (H) и Cys233 (H), которые обеспечивают три межцепные дисульфидные связи. Наиболее вероятная связь представляет собой Cys227 (H) с Cys227 (H), Cys230 (H) с Cys230 (H) и Cys233 (H) с Cys233 (H), что является правильным теоретическим дисульфидным расположением IgG2 формы А.

Дисульфидная структура антитела IgG2.5 (форма В): В области Fab тяжелой цепи Cys22 (H) связан с Cys98 (H), а Cys151 (H) связан с Cys 207 (H). В области Fc тяжелой цепи Cys264 (H) связан с Cys324 (H), а Cys370 (H) связан с Cys428 (H). В области Fab легкой цепи Cys23 (L) связан с Cys88 (L), а Cys134 (L) связан с Cys194 (L). Шарнирная область тяжелой цепи содержит четыре цистеиновых остатка Cys226 (H), Cys227 (H), Cys230 (H) и Cys233 (H). С-конец легкой цепи Cys214 (L) связан с остатком цистеина тяжелой цепи в шарнирной области, а остальные три остатка цистеина обеспечивают три мецепные дисульфидные связи. Наиболее вероятной является связь Cys214 (L) с Cys226 (H), затем Cys227 (H) с Cys227 (H), Cys230 (H) с Cys230 (H) и Cys233 (H) с Cys233 (H), что является правильным теоретическим дисульфидным расположением IgG2 формы В. Кроме того, дисульфидные связи в шарнирной области были подтверждены с помощью тандемной масс-спектрометрии, иницируемой диссоциацией с переносом электронов (ETD), с использованием масс-спектрометра с ионной ловушкой.

Пример 12: Релевантность определенных аминокислотных остатков в СН1 IgG2 и шарнире в улучшении агонизма GITR на Т-клетках

Антитела к GITR (GITR.6) с константными областями тяжелой цепи, показанными в Таблице 17, получали и тестировали в анализах продукции IL-2, как описано в Примере 2, но в которых супернатанты собирали не через 48 часов, а через 40 часов.

Результаты, которые показаны на Фигуре 20A-D, в основном, согласуются с результатами интернализации CD73 (см. Фигуру 10), полученными с антителами к CD73, имеющими те же константные области тяжелой цепи, что и используемые в этом Примере.

Пример 13: Устранение эффекторных функций с помощью мутации P238K

Вариабельные области антитела были слиты с Fc IgG1, который отличается от Fc IgG1 дикого типа одним аминокислотным остатком: P238K (SEQ ID NO: 198). При этой единственной мутации антитело продемонстрировало отсутствие эффекторной функции, по существу, не обнаруживая детектируемого сигнала связывания с низкоаффинными Fc γ R hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158 или hCD16b-NA2 (см. данные в Примере 14). Кроме того, антитело с IgG1 P238K показало значительное понижение аффинности связывания с высокоаффинным Fc γ R CD64 (см. данные в Примере 14). Связывание антитела с CD64 продемонстрировало более высокую

скорость смещения (константу диссоциации) по сравнению с антителами с константным доменом IgG1 дикого типа.

Отсутствие эффекторной функции Fc IgG1, имеющего мутацию P238K (SEQ ID NO: 198), также было продемонстрировано с вариантом антитела.

Таким образом, Fc человеческого IgG1 с единственной мутацией (P238K), напр., где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198, можно использовать в любых антителах, в которых эффекторные функции нежелательны.

Пример 14: Устранение эффекторных функций с помощью P238K и дополнительных мутаций

Дополнительные антитела были получены с Fc, имеющими мутацию(и), для дальнейшего понижения эффекторной функции, предпочтительно как ADCC, так и CDC. Мутанты были созданы для дальнейшего понижения связывания FcR, как показано в Таблице 22. В частности, как показано выше, P238K устраняет обнаруживаемое связывание с cFcR, за исключением CD64, поэтому целью было объединить P238K с дополнительными мутациями для уменьшения связывания с CD64. Мутации были протестированы в контексте форматов изотипа IgG1, изотипа IgG2.3 и IgG2.5 и изотипа IgG2.3G1. Fc, используемые в этих антителах, содержат одну из аминокислотных последовательностей, имеющих SEQ ID NO: 234-245 и 247-262.

Расположение мутаций показано на ФИГ. 21.

Связывание Fc γ R человека с антителами изучали методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы Biacore 8K (GE Healthcare). Для этих исследований белок A был иммобилизован на проточных ячейках 1-4 сенсорного чипа CM5 с использованием стандартного реактива этил(диметиламинопропил)карбодиимид (EDC)/N-гидроксисукцинимид (NHS) с блокированием этаноламином в рабочем буфере 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% сурфактанта p20, до плотности ~ 3000 RU. Очищенные антитела (10 мкг/мл) или экспрессионные супернатанты (разбавленные до ~ 10 мкг/мл) были захвачены на поверхности белка A до плотности ~ 1000 - 1200 RU, и связывание аналитов Fc γ R было протестировано в рабочем буфере, состоящем из 10 mM NaPO₄, 130 mM NaCl, 0,05% p20, буфера (PBS-T), pH 7,1 при 25°C, с использованием времени ассоциации 120 с и времени диссоциации 120 с при скорости потока 20 мкл/мин. Данные анализировали с использованием оценочного программного обеспечения Biacore 8K, определяя измеренный отклик связывания как процент от теоретического максимального отклика связывания для каждого антитела (%R_{max}),

основываясь на уровне захваченного антитела, предполагая 100% фракционную активность и принимая во внимание только белковую массу без гликозилирования, как указано далее. Для сравнения связывания с FcγR различных молекул данные связывания SPR анализировали путем расчета максимального отклика связывания в процентах от теоретического максимального отклика связывания (%Rmax), как в общем показано в Уравн. 1:

$$\%R_{\max} = \frac{(\text{Наблюдаемый Отклик Связывания Аналита})}{(\text{Теоретический Максимальный Отклик Связывания Аналита})} \quad \text{Уравн. 1}$$

В частности, %Rmax был рассчитан с использованием уравнения:

$$\%R_{\max} = \frac{(\text{Отклик Связывания Аналита})}{\left(\frac{(\text{Mw Аналит})}{(\text{Mw Лиганд})} \times (\text{Отклик Лиганда}) \times (\text{стехиометрия аналит:лиганд}) \right)} \quad \text{Уравн. 2}$$

где «Аналит» представляет собой антитело, а «Лиганд» представляет собой захваченный белок FcγR. Этот анализ не учитывает массу гликозилирования антитела или FcγR и предполагает 100% фракционную активность для захваченного лиганда.

«Анализ %Rmax» особенно полезен для оценки связывания FcγR с «низкими аффинностями», напр., hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158, hCD16a-F158, hCD16b-NA1 и hCD16b-NA2, которые имеют относительно высокие скорости ассоциации и диссоциации и аффинности вблизи или ниже тестируемой концентрации аналита (1 микромолярной (мкМ)), поэтому насыщение поверхности обычно не достигается в этих условиях. Напротив, «высокоаффинный» FcγR hCD64 связывается с более высокой аффинностью и более медленной кинетикой диссоциации, чем другие FcγR, особенно с IgG1 и IgG4, и, таким образом, эти изотипы обычно насыщают поверхность hCD64 при концентрациях микромолярного аналита и труднее дифференцировать аффинности, используя %Rmax. Для этих взаимодействий различия между антителами можно легко наблюдать путем сравнения скоростей диссоциации в данных сенсограммы.

Результаты показаны в Таблице 22, а типичные данные сенсограммы представлены на ФИГ. 21 A-L.

Таблица 22: Связывание антител с Fc дикого типа или с мутированным Fc с FcγR показано в процентах от R_{max}

Антитело	Образец	1 мкМ hCD64	10 мкМ hCD32a- H131	10 мкМ hCD32a- R131	10 мкМ hCD32b	10 мкМ hCD16a- V158	10 мкМ hCD16a- F158		0.1 мкМ hCD64	1 мкМ hCD32a- H131	1 мкМ hCD32a- R131	1 мкМ hCD32b	1 мкМ hCD16a- V158	1 мкМ hCD16a- F158
Ab1-hIgG1f	Очищен	126%	98%	93%	61%	116%	45%		126%	54%	43%	13%	81%	10%
Ab2-hIgG1f	Очищен	123%	98%	96%	73%	116%	65%		124%	65%	56%	20%	94%	17%
Ab1-NF	Очищен	125%	97%	98%	76%	124%	130%		125%	55%	59%	22%	123%	104%
Ab33-IgG2.3	Очищен	16%	100%	69%	29%	27%	4%		2%	60%	21%	7%	6%	2%
Ab4-hz1-P238K	Очищен	116%	0%	1%	1%	-1%	-1%		88%	0%	0%	0%	0%	0%
Ab2-IgG1.3f-P238K	супернатант	1%	1%	3%	2%	0%	0%		0%	1%	1%	1%	0%	0%
Ab2-IgG1f-P238K	супернатант	109%	-3%	-2%	-2%	-4%	-4%		89%	1%	1%	1%	0%	0%
Ab2-IgG1f-L235E-P238K	супернатант	11%	1%	3%	3%	0%	-1%		2%	0%	1%	1%	0%	0%
Ab2-IgG1f-L235E-P238K- K322A	супернатант	11%	2%	5%	3%	0%	0%		2%	1%	1%	1%	1%	0%
Ab2-IgG2.3G1.3f-P238K	супернатант	2%	1%	3%	1%	0%	0%		0%	0%	1%	1%	0%	0%
Ab2-IgG2.3G1-L235E-P238K	супернатант	16%	1%	4%	3%	1%	0%		2%	1%	1%	1%	1%	1%
Ab2-IgG2.3G1-L235E-P238K- K322A	супернатант	16%	2%	5%	3%	0%	0%		2%	1%	1%	1%	1%	0%
Ab2-IgG2.5G1.3f-P238K	супернатант	2%	1%	3%	2%	0%	0%		0%	1%	1%	1%	1%	1%
Ab2-IgG2.5G1-L235E-P238K- K322A	супернатант	15%	2%	5%	3%	0%	0%		2%	1%	1%	1%	1%	1%
Ab4-IgG1fa	супернатант	124%	99%	95%	71%	116%	59%		125%	63%	53%	19%	91%	15%
Ab4-IgG1.3fa	супернатант	7%	2%	29%	17%	4%	1%		1%	0%	4%	2%	1%	0%
Ab4-IgG1fa-P238K	супернатант	116%	1%	1%	1%	0%	0%		87%	1%	1%	1%	0%	0%
Ab4-IgG1fa-L235A-P238K	супернатант	51%	0%	1%	0%	-1%	-1%		10%	0%	0%	0%	0%	0%
Ab4-IgG1fa-L235E-P238K	супернатант	9%	0%	3%	2%	0%	0%		1%	0%	1%	1%	0%	0%
Ab4-IgG1.3fa-P238K	супернатант	1%	0%	2%	1%	0%	-1%		0%	0%	1%	0%	0%	0%
Ab4-IgG1fa-L235E-P238K- K322A	супернатант	11%	1%	4%	1%	-1%	-1%		2%	0%	1%	0%	0%	0%

Ab4-IgG2.3	супернатант	16%	98%	73%	31%	34%	4%		2%	66%	23%	6%	7%	2%
Ab4-IgG2.3-P238K	супернатант	1%	1%	2%	1%	0%	0%		0%	2%	2%	2%	1%	1%
Ab4-IgG2.3G1	супернатант	123%	95%	93%	72%	113%	62%		123%	62%	55%	21%	90%	16%
Ab4-IgG2.3G1-P238K	супернатант	116%	0%	1%	1%	-1%	-2%		91%	0%	0%	0%	0%	-1%
Ab4-IgG2.5G1-P238K	супернатант	118%	1%	2%	2%	0%	0%		94%	1%	1%	1%	1%	1%
Ab4-IgG2.3G1-L235E-P238K	супернатант	13%	0%	3%	3%	0%	0%		2%	0%	1%	1%	0%	0%

Как показано в Таблице 22 и на ФИГ. 22, комбинационные мутанты продемонстрировали очень слабое связывание с FcR. Добавление мутаций L235 к изотипу P238K снижало связывание с CD64 до уровней, аналогичных IgG1.3f. L235E превосходил мутацию L235A в уменьшении связывания с CD64. Добавление мутации P238K к IgG2 (IgG2.3-P238K) привело к полностью инертному изотипу, демонстрирующему отсутствие детектируемого связывания с каким-либо из белков FcR. Мутации также показали сходные тенденции в контексте форматов IgG1 и IgG2.xG1. Мутация K322A, которая снижает связывание с clq (активность CDC) и была добавлена в некоторые конструкции, оказала минимальное влияние на связывание с FcR, поэтому не наблюдалось значительного эффекта K322A.

Пример 14: Устранение эффекторных функций с помощью Fc IgG1.3

Этот Пример описан в Примерах 2 и 3 параллельно поданной заявки PCT того же заявителя, озаглавленной «MODIFIED IgG1 Fc DOMAINS AND ANTI-CD40 DOMAIN ANTIBODY FUSIONS THEREWITH».

Этот Пример показывает, что антитело или полипептид с Fc IgG1.3 по существу лишены связывания с CD16, CD32a, CD32b и CD64. Это также наблюдалось, когда IgG1.3 Fc был связан с переменным доменом антител к TIM3 (см. WO2018/013818). IgG1.3 был получен из Fc «IgG1.1» («IgG1.1» представляет собой IgG1 с заменами L234A, L235E, G237A, A330S и P331S) путем удаления A330S и P331S, таким образом сохраняя 3 из 5 мутаций, т.е., L234A, L235E, G237A. Неожиданно было обнаружено, что отсутствие A330S и P331S в Fc IgG1.1 не оказывает значительного влияния на инертность этого Fc. Ниже приведены типичные измерения связывания с FcγR для IgG1.1 и IgG1.3 (и других Fc для сравнительных целей), содержащих антитела и слитые белки, сравнивая инертность IgG1.1 и IgG1.3 в отношении антитела, а также в контексте белка без антител.

Материалы и Способы, использованные в этом Примере, включают следующее.

Связывание с FcγR по SPR: Связывание с FcγR может быть измерено *in vitro* с использованием очищенных FcγR с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore™. В настоящем документе использовались два способа.

В одном способе проверяется связывание очищенных антител или белков dAb-Fc с белками FcγR, меченными His (FcγR-His («FcγR» используется взаимозаменяемо с «FcγR»), которые захватываются на иммобилизованном фрагменте Fab антитела анти-His. Эти эксперименты проводят на приборе Biacore™ T100 или Biacore™ T200 (GE Healthcare) при 25°C. Фрагмент Fab из мышиного антитела анти-6xHis (полученного своими силами) иммобилизуют на сенсорном чипе CM5 с использованием стандартного реактива этил(диметиламинопропил)карбодиимид (EDC)/N-гидроксисукцинимид (NHS) с блокированием этаноламином до плотности ~ 3000 Резонансных Единиц RU в рабочем буфере из 10 миллимолярного (мМ) HEPES pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% поверхностно-активного вещества p20 (HBS-EP+). Все остальные исследования выполняются с использованием рабочего буфера 10 мМ NaPO₄, 130 мМ NaCl, 0,05% p20 (PBS-T) при pH 7,1.

Различные белки FcγR, содержащие С-концевую 6-кратную полигистидиновую метку (полученные своими силами), были захвачены на этой поверхности (обычно с использованием концентрации белка FcγR-His ~ 7 мкг/мл) при времени контакта 30 секунд (с) при 10 мкл/мин. Различные концентрации очищенных антител или белков dAb-Fc тестируют на связывание, например, используя время ассоциации 120 секунд при 30 мкл/мин и время диссоциации 120 секунд при 30 мкл/мин. Белки FcγR, протестированные в этих исследованиях, включают «высокоаффинный» FcγR hCD64 (hFcγRI), а также «низкоаффинные» FcγR hCD32a-H131 (FcγRIIa-H131), hCD32a-R131 (FcγRIIa-R131), hCD32b (FcγRIIb), hCD16a-V158 (FcγRIIIa-V158), hCD16a-F158 (FcγRIIIa-F158), hCD16b-NA1 (FcγRIIIb-NA1) и hCD16b-NA2 (FcγRIIIb-NA2).

Для того чтобы количественно проанализировать реакции связывания и сравнить связывание с FcγR различных молекул, данные связывания SPR могут быть проанализированы путем расчета максимального ответа связывания в процентах от теоретического максимального ответа связывания (%Rmax), как в общем показано в Уравн. 1:

$$\%R_{\max} = \frac{(\text{Наблюдаемый Отклик Связывания Аналита})}{(\text{Теоретический Максимальный Отклик Связывания Аналита})} \quad \text{Уравн. 1}$$

В частности, %Rmax был рассчитан с использованием уравнения:

$$\%R_{\max} = \frac{(\text{Отклик Связывания Аналита})}{\left(\frac{(\text{Mw Аналит})}{(\text{Mw Лиганд})} \right) \times (\text{Отклик Лиганда}) \times (\text{стехиометрия аналит:лиганд})} \quad \text{Уравн. 2}$$

где «Аналит» представляет собой антитело или dAb-Fc, а «Лиганд» представляет собой захваченный белок FcγR. Этот анализ не учитывает массу гликозилирования антител, dAb-Fc или FcγR, и предполагает 100%-ную фракционную активность для захваченного лиганда.

«Анализ %Rmax» особенно полезен для оценки связывания FcγR с «низкой аффинностью», напр., hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158, hCD16a-F158, hCD16b-NA1 и hCD16b-NA2, которые имеют относительно высокие скорости ассоциации и диссоциации и аффинности вблизи или ниже тестируемой концентрации аналита (1 микромоль (мкМ)), поэтому насыщение поверхности обычно не достигается в этих условиях. В противоположность этому, «высокоаффинное» FcγR hCD64 связывается с более высокой аффинностью и более медленной кинетикой диссоциации, чем другие FcγR, в частности IgG1 и IgG4, и, таким образом, эти изотипы, как правило, насыщают поверхность hCD64 ниже микромолярных концентраций аналита, и является более трудным дифференцировать аффинности с использованием %Rmax. Для этих взаимодействий различия между антителами можно легко наблюдать путем сравнения скоростей диссоциации по данным сенсограммы.

Второй анализ SPR для тестирования взаимодействия между антителами или белками dAb-Fc с белками FcgR представляет собой способ захвата белка А. Эти эксперименты также проводят на приборе Biacore™ T100 или Biacore™ T200 (GE Healthcare) при 25°C. Для этих исследований белок А иммобилизуют на проточных ячейках 1-4 сенсорного чипа CM5 с использованием стандартного реагента этил(диметиламинопропил)карбодиимид (EDC)/N-гидроксисукцинимид (NHS) с блокированием этаноламином в рабочем буфере из 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% поверхностно-активного вещества p20, до плотности ~ 3000 RU. Антитела или белки dAb-Fc (обычно ~ 3-10 мкг/мл) захватываются на поверхности белка А, и связывание аналитов FcgR тестируют в рабочем буфере, состоящем из 10 mM NaPO₄, 130 mM NaCl, 0,05% p20, буфера (PBS-T) при pH 7,1 и при 25°C, используя, например, время ассоциации 120 секунд и время диссоциации 180 секунд при скорости потока 30 мкл/мин.

Анализ захвата белка А также можно использовать для анализа неочищенных супернатантов, содержащих молекулы антител или dAb-Fc. Для этого анализа антитела или белки dAb-Fc могут быть захвачены либо из неразбавленных супернатантов, либо из супернатантов, разведенных рабочим буфером. Для того чтобы количественно проанализировать реакции связывания и сравнить связывание с FcgR различных молекул, данные связывания SPR можно проанализировать, рассчитав %R_{max}, используя Уравн. 1, где Аналит представляет собой очищенный белок FcgR, а Лиганд представляет собой захваченное антитело или белок dAb-Fc.

В дополнение к анализу %R_{max} количественный анализ кинетики и аффинности связывания может быть выполнен путем тестирования титрования аналита FcgR для связывания с захваченными белком А антителами или белками dAb-Fc. Например, FcgR в серийном разведении 3:1 можно титровать от 10 мкМ до или 0,15 nM (hCD64), или 1,5 nM (все другие FcgR). Эти кинетические данные могут быть адаптированы либо к модели Ленгмюра 1:1, либо к модели стационарного связывания с использованием оценочного программного обеспечения Biacore™ T200 для получения значений кинетики и аффинности.

dAb-Fc: dAb-Fc, исследованные в этом примере, показаны в Таблице 23. В этих последовательностях остатки одного варибельного домена 3х56-269 представляют собой аминокислоты 1-118 (подчеркнуты). Линкер AST подчеркнут дважды.

Таблица 23

Seq #	ID Образца	Последовательность
263	3h56-269-IgG4.1 OR BMS-986090	<u>EVQLLES</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEMWWVRQAPG <u>KGLERVSA</u> <u>INPQGTR</u> TYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV <u>YYCAKLP</u>

Seq #	ID Образца	Последовательность
		<u>FRFSDRGQGT</u> <u>LVTVSS</u> <u>ASTE</u> SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLD SDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK
264	3h56-269-CT	<u>EVQ</u> <u>LLES</u> <u>GGGL</u> <u>VQPG</u> <u>SLRL</u> <u>SCAAS</u> <u>GFTFR</u> <u>DYEM</u> <u>WWVR</u> <u>QAPG</u> <u>KGLER</u> <u>VSA</u> <u>INPQ</u> <u>GTR</u> <u>TY</u> <u>YAD</u> <u>SVK</u> <u>GR</u> <u>FTIS</u> <u>RDNS</u> <u>KNT</u> <u>LYLQ</u> <u>MNS</u> <u>LRAED</u> <u>TAV</u> <u>YYCA</u> <u>KLP</u> <u>FRFSDRGQGT</u> <u>LVTVSS</u> <u>ASTE</u> PKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVF LFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPP VLDSGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
265	3h56-269-IgG1.1f	<u>EVQ</u> <u>LLES</u> <u>GGGL</u> <u>VQPG</u> <u>SLRL</u> <u>SCAAS</u> <u>GFTFR</u> <u>DYEM</u> <u>WWVR</u> <u>QAPG</u> <u>KGLER</u> <u>VSA</u> <u>INPQ</u> <u>GTR</u> <u>TY</u> <u>YAD</u> <u>SVK</u> <u>GR</u> <u>FTIS</u> <u>RDNS</u> <u>KNT</u> <u>LYLQ</u> <u>MNS</u> <u>LRAED</u> <u>TAV</u> <u>YYCA</u> <u>KLP</u> <u>FRFSDRGQGT</u> <u>LVTVSS</u> <u>ASTE</u> PKSCDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
266	3h56-269-IgG1.3f	<u>EVQ</u> <u>LLES</u> <u>GGGL</u> <u>VQPG</u> <u>SLRL</u> <u>SCAAS</u> <u>GFTFR</u> <u>DYEM</u> <u>WWVR</u> <u>QAPG</u> <u>KGLER</u> <u>VSA</u> <u>INPQ</u> <u>GTR</u> <u>TY</u> <u>YAD</u> <u>SVK</u> <u>GR</u> <u>FTIS</u> <u>RDNS</u> <u>KNT</u> <u>LYLQ</u> <u>MNS</u>

Seq #	ID Образца	Последовательность
		<u>LRAEDTAVYYCAKLPFRFSDRGQGTLVTVSSA</u> STEPKSCDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
267	3h56-269-IgG1-D265A	<u>EVQLLES</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYEMWWVRQAPG <u>KGLERVSAINPQGTRTYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMNS <u>LRAEDTAVYYCAKLPFRFSDRGQGTLVTVSSA</u> STEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

Последовательности IgG1.1f и IgG1.3f, каждая из которых начинается с «EPK» (т.е. последовательности в SEQ ID NO: 77 и 78), которые показаны в Таблице 23, идентичны последовательностям, начинающимся с EPK в SEQ ID NO 83 и 248 соответственно.

Контрольное mAb: Контрольное моноклональное антитело (1F4) также форматировали с аналогичными мутациями домена Fc. Последовательности отдельных цепей показаны в Таблице 24, включая последовательность (SEQ ID NO: 268) части тяжелой цепи 1F4, включая переменную область и область CH1. Эта последовательность подчеркнута в последовательностях тяжелых цепей (SEQ ID NO: 269-275). Пара последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи для каждого варианта 1F4 mAb показана в Таблице 25.

Таблица 24

Seq ID No.	Идентичность последовательности	Последовательность
268	1F4 Переменная область	<u>EVQLLES</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGKGLEWV <u>SAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDN</u> SKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>KVDYSNYLFFDYWGQGTLVTVSSA</u> STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG

Seq ID No.	Идентичность последовательности	Последовательность
	тяжелой цепи и CH1	CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
269	1F4 Вариабельная область легкой цепи и CL	<u>EIVLTQSPGTL</u> SLSPGERATLSCRASQSISSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG <u>ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL</u> TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPYTFGQ <u>GTKLEIKRTVAAPS</u> VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
270	1F4-IgG1f тяжелая цепь	<u>EVQLLES</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGKGLEWV <u>SAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDN</u> SKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>KVDYSNYLFFDYWGQGL</u> LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG <u>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV</u> EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
271	1F4-IgG4.1 тяжелая цепь	<u>EVQLLES</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGKGLEWV <u>SAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDN</u> SKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>KVDYSNYLFFDYWGQGL</u> LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG <u>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL</u> <u>GTKTYTCNV</u> DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLG
272	1F4-IgG1.1f тяжелая цепь	<u>EVQLLES</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGKGLEWV <u>SAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDN</u> SKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>KVDYSNYLFFDYWGQGL</u> LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG <u>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV</u> EPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

Seq ID No.	Идентичность последовательности	Последовательность
		PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
273	1F4-IgG1.3f тяжелая цепь	<u>EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGKGLEWV</u> <u>SAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDN SKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA</u> <u>KVDYSNYLFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG</u> <u>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV</u> EPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
274	1F4-D265A тяжелая цепь	<u>EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAGKGLEWVS</u> <u>AISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDN SKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAK</u> <u>VDYSNYLFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC</u> <u>LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV</u> EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
275	1F4-CT тяжелая цепь	<u>EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGKGLEWV</u> <u>SAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDN SKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCA</u> <u>KVDYSNYLFFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG</u> <u>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV</u> EPKSCDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE

Seq ID No.	Идентичность последовательности	Последовательность
		NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

Таблица 25

название mAb	HC	LC
1F4-IgG1f	SEQ #: 270	SEQ #: 269
1F4-IgG4.1	SEQ #: 271	SEQ #: 269
1F4-IgG1.1f	SEQ #: 272	SEQ #: 269
1F4-IgG1.3f	SEQ #: 273	SEQ #: 269
1F4-D265A	SEQ #: 274	SEQ #: 269
1F4-CT	SEQ #: 275	SEQ #: 269

Результаты: молекулы dAb-Fc были получены с мутациями в домене Fc для понижения связывания с FcγR. Конкретно, антитело 3h56-269 к домену CD40 было отформатировано со следующими вариантами домена Fc: IgG1.1f, IgG1.3f и IgG1-D265A. В каждом из 3h-56-269-IgG1.1f (SEQ ID NO: 77), 3h-56-269-IgG1.3f (SEQ ID NO: 78) и 3h-56-269-IgG1-D265A (SEQ ID NO: 79) аминокислоты 1-116 представляют собой 3h-56-269 dAb, аминокислоты 117-119 представляют собой линкер, а аминокислоты 120-351 представляют собой домен Fc.

Было подтверждено, что каждый из этих слитых белков dAb-Fc, а также каждый из 3h56-269-IgG4.1 и 3h56-269-CT связывается с высокой аффинностью с очищенным мономером человеческого CD40 (мономером hCD40, полученным своими силами), что измеряется с помощью SPR Biacore™. Как показано в Таблице 26, значения KD находятся в диапазоне от 7,3 нМ до 11,5 нМ для различных вариантов Fc. Каждая из молекул dAb-Fc также связывала CD40 человека с высокой авидностью, что измеряли с помощью SPR с использованием hCD40-Fc на поверхности сенсорного чипа и молекул dAb-Fc в качестве растворимых аналитов в растворе, где данные для 250 нМ и 25 нМ инъекций аналита dAb-Fc соответствовали модели Ленгмюра 1:1 с оценкой кажущихся значений KD, зависящих от авидности (KD_{очевидная}) для всех dAb-Fc как <1 нМ. См. Таблицу 26.

Таблица 26: данные SPR для связывания молекул dAb-Fc с CD40 человека.

Лиганд	связывание hCD40мономер с молекулами dAb-Fc, захваченными на иммобилизованной белком А поверхности (Аффинность)	связывание dAb-Fc с иммобилизованной поверхностью
--------	---	---

				hCD40-Fc (Авидность)
	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)	KD_{очевидная} (нМ)
3h56-269-IgG4.1	8.5E+03	9.7E-05	11.5	<1
3h56-269-CT	1.6E+04	1.3E-04	8.0	<1
	1.6E+04	1.2E-04	7.3	<1
3h56-269-CT (UCOE-CHO)*	1.6E+04	1.3E-04	7.7	<1
	1.9E+04	1.4E-04	7.0	<1
3h56-269-IgG1.1f	9.6E+03	1.0E-04	10.8	<1
3h56-269-IgG1.3f	9.9E+03	9.1E-05	9.2	<1
	1.1E+04	1.1E-04	9.8	<1
3h56-269-IgG1-D265A	1.1E+04	9.9E-05	9.0	<1

*3h-56-269-CT, экспрессированный и очищенный из клеток UCOE-CHO.

Свойства связывания с FcγR молекул dAb-Fc и различных контрольных моноклональных антител 1F4 были охарактеризованы с помощью SPR. Первый анализ включал связывание 1 мкМ или 10 мкМ dAb-Fc или контрольного человеческого антитела IgG1f (1F4-IgG1f) с поверхностями FcγR-His с захваченным анти-His Fab. Эти данные приведены в Таблице 27.

Таблица 27: данные %R_{max} для 1 мкМ или 10 мкМ dAb-Fc или 1F4-IgG1f контрольного антитела, связывающегося с белками hFcγR-His с захваченным анти-His Fab.

Образец	Конц (мкМ)	FcγR с захваченным Анти-His Fab					
		FcγR с Высокой Аффинностью	FcγR с Низкой Аффинностью				
			hCD64	hCD32a- H131	hCD32a- R131	hCD32b	hCD16a- V158
1F4-IgG1f	1	65%	31%	19%	5%	31%	13%
3h56-269-IgG4.1	1	68%	27%	30%	20%	6%	1%
3h56-269-IgG1-D265A	1	68%	7%	2%	0%	1%	0%
3h56-269-IgG1.1f	1	11%	1%	10%	3%	0%	0%

3h56-269-IgG1.3f	1	12%	1%	8%	3%	1%	0%
3h56-269-CT	1	72%	0%	1%	0%	1%	0%
1F4-IgG1f	10	65%	62%	51%	24%	52%	36%
3h56-269-IgG4.1	10	69%	65%	66%	57%	27%	9%
3h56-269-IgG1-D265A	10	69%	33%	17%	2%	2%	-1%
3h56-269-IgG1.1f	10	39%	6%	43%	21%	3%	2%
3h56-269-IgG1.3f	10	39%	6%	37%	19%	5%	4%
3h56-269-CT	10	70%	2%	10%	3%	6%	-1%

В другом анализе аналиты FcγR (в концентрации 1 мкМ или 10 мкМ) тестировали на связывание с поверхностями dAb-Fc с захваченным белком А (данные показаны в Таблице 28) и на связывание с поверхностями антител (данные показаны в Таблице 29).

Таблица 28: Данные %Rmax для 1 мкМ или 10 мкМ FcγR, связывающихся с белками dAb-Fc с захваченным белком А.

Образец	Конц (мкМ)	Белок dAb-Fc с захваченным Белком А				
		3h56-269-IgG4.1	3h56-269-IgG1-D265A	3h56-269-IgG1.1f	3h56-269-IgG1.3f	3h56-269-CT
hCD64	1	99%	41%	1%	2%	80%
hCD32a-H131	1	29%	3%	0%	1%	1%
hCD32a-R131	1	31%	1%	4%	5%	1%
hCD32b	1	19%	0%	1%	2%	1%
hCD16a-V158	1	12%	0%	0%	1%	1%
hCD16B-NA2	1	2%	0%	0%	0%	0%
hCD64	10	119%	85%	3%	7%	114%
hCD32a-H131	10	70%	18%	4%	6%	7%
hCD32a-R131	10	71%	4%	18%	26%	7%
hCD32b	10	59%	1%	9%	12%	4%

Образец	Конц (мкМ)	Белок dAb-Fc с захваченным Белком А				
		3h56- 269- IgG4.1	3h56- 269- IgG1- D265A	3h56- 269- IgG1.1f	3h56- 269- IgG1.3f	3h56- 269-CT
hCD16a-V158	10	47%	2%	2%	6%	7%
hCD16B-NA2	10	13%	0%	1%	3%	1%

Таблица 29: данные %Rmax для 1 мкМ или 10 мкМ FcgR, связывающихся с антителами с захваченным белком А.

Образец	Конц (мкМ)	Антитела с захваченным белком А					
		1F4- IgG1f	1F4- IgG4.1	1F4- D265A	1F4- IgG1.1f	1F4- IgG1.3f	1F4- CT
hCD64	1	138%	126%	96%	8%	5%	120%
hCD32a-H131	1	62%	29%	7%	2%	1%	2%
hCD32a-R131	1	48%	33%	3%	5%	3%	2%
hCD32b	1	11%	17%	1%	1%	1%	1%
hCD16a-V158	1	97%	15%	1%	3%	2%	2%
hCD16B-NA2	1	33%	4%	1%	4%	3%	0%
hCD64	10	155%	139%	131%	17%	14%	131%
hCD32a-H131	10	99%	79%	38%	7%	6%	11%
hCD32a-R131	10	101%	87%	17%	28%	24%	13%
hCD32b	10	55%	68%	4%	11%	12%	8%
hCD16a-V158	10	125%	59%	2%	5%	7%	11%
hCD16B-NA2	10	81%	16%	-2%	4%	6%	1%

На основании ответов связывания или их отсутствия в этих экспериментах была выбрана подгруппа взаимодействий dAb-Fc/FcgR или Ab/FcgR с более высокой аффинностью с наиболее сильными ответами связывания для характеристики кинетики/аффинности с использованием титрования аналитов (аналиты FcgR связываются с антителами или dAb-Fc с захваченным белком А). Эти данные представлены в Таблице 30.

Таблица 30: Значения KD (в нМ) для очищенных аналитов FcgR, связывающихся с антителами или dAb-Fc с захваченным белком А.

Образец						
---------	--	--	--	--	--	--

	hCD64	hCD32a-H131	hCD32a-R131	hCD32b	hCD16a-V158	hCD16b-NA2
1F4-IgG1f	0.2	920	1400	>5000	430	4800
1F4-IgG4.1	0.58	3700	2400	3100	>5000	>5000
3h56-269-IgG4.1	2.8	>5000	2200	>5000	>5000	>5000
3h56-269-IgG1-D265A	62					
3h56-269-IgG1.1f	>5000					
3h56-269-IgG1.3f	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000
3h56-269-CT	4.6	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000

В совокупности эти данные SPR связывания FcγR показывают, что молекулы изотипа IgG1f и IgG4.1 имеют значительно более высокую аффинность FcγR среди всех FcγR по сравнению с модифицированным вариантом Fc IgG1-D265A, IgG1.1f, IgG1.3f или молекулами CT. Из модифицированных вариантов Fc аффинность связывания hCD64 была самой сильной для 3h56-269-CT ($K_D = 4,6$ нМ), более слабой для 3h56-269-IgG1-D265A ($K_D = 62$ нМ) и самой слабой для 3h56-269-IgG1.1f и 3h56-269-IgG1.3f, для которых аффинность была слишком слабой для количественного определения в тестируемых условиях ($K_D > 5$ мкМ, что составляет половину самой высокой протестированной концентрации аналита). Все другие взаимодействия FcγR (hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158, hCD16b-NA2) для вариантов IgG1-D265A, IgG1.1f, IgG1.3f и CT также были слишком слабыми, чтобы получить достоверные значения K_D ($K_D > 5$ мкМ). Однако в данных %Rmax могут наблюдаться различия в относительных реакциях связывания. Например, вариант IgG1-D265A имеет более сильный ответ связывания для hCD32a-H131 по сравнению с вариантами IgG1.1f, IgG1.3f или CT (Таблица 28). Напротив, варианты IgG1.1f и IgG1.3f имеют более сильные ответы связывания для hCD32a-R131 по сравнению с вариантами IgG1-D265A и CT (Таблица 28).

IgG1.3, содержащие слитый белок или антитело, оценивали с помощью DSC, icIEF и масс-спектрометрии. Материалы и способы описаны ниже.

Дифференциальная Сканирующая Калориметрия: Эксперименты с DSC проводили на приборе MicroCal VP-Capillary DSC (Malvern Instruments, Malvern, UK) в 10 mM NaPO₄, 130 mM NaCl pH 7,1. Образцы 1 мг/мл dAb-Fc или антитела были протестированы с использованием диапазона сканирования 10-110°C и скорости сканирования 90°C/час. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения MicroCal-Origin 7.0.

Визуализированная Капиллярная Изoeлектрическая Фокусировка: Эксперименты icIEF проводились на ProteinSimple iCE3™ System (ProteinSimple, San Jose, CA). Для этих исследований образцы dAb-Fc или антитела, обычно в концентрации 2 мг/мл, смешивали с носителем из смеси амфолитов, состоящей из 2 М мочевины, 0,35% метилцеллюлозы, 1% Фармалита 5-8, 3% Фармалита

8-10,5, и маркеров pI 5,85 и 10,10 до конечной концентрации белка 0,20 мг/мл и анализировали с использованием времени предварительной фокусировки 1 мин при 1,5 кВ и времени фокусировки 10 мин при 3 кВ.

Масс-спектрометрия: Для масс-спектрометрического (масс-спек) анализа образцы восстанавливали с использованием 100 мМ DTT, и N-дегликозилирование проводили с пептидом: N-Гликозидазой (FPGaseF). Используемые приборы для жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC/MS) представляли собой Waters Synapt® G2 (Waters Corporation, Milford, MA) с Waters Acquity® UPLC (ультразэффективная жидкостная хроматография). Колонка UPLC представляла собой Waters Acquity® BEH (гибридная частица с этиленовым мостиком) C4 (2,1 × 150 мм, 300 Å, 1,7 мкм). Градиент составлял от 10% до 38% (Подвижная фаза В) в течение 10 мин при скорости потока 200 мкл/мин. Подвижная фаза А содержала 0,1% муравьиной кислоты в воде. Подвижная фаза В содержала 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Температура колонки составляла 60°C. Анализ данных проводился вручную с помощью программного обеспечения Waters MassLynx™; спектральная деконволюция была выполнена с помощью алгоритма MaxEnt1.

Ускоренные исследования стабильности: Ускоренные исследования стабильности проводились путем первого экстенсивного диализа молекул dAb-Fc в целевых рецептурных буферах при 4°C. Образцы отбирали и концентрировали, используя Ультрацентрибежные Фильтрующие Установки Amicon® (Merck KGaA, Germany), и готовили при различных целевых концентрациях в диализном буфере. Эти образцы инкубировали при различных температурах, обычно 4°C, 25°C, 32°C и/или 40°C, в течение нескольких недель, отбирая аликваты и анализируя с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии. Аналитическую эксклюзионную хроматографию проводили на Agilent 1260 HPLC, используя колонку Shodex™ K403-4F (Showa Denko America, Inc., New York, NY) в подвижной фазе из 100 мМ Фосфата Натрия, 150 мМ Хлорида Натрия, pH 7,3 скорость потока 0,3 мл/мин.

Результаты - Дифференциальная сканирующая калориметрия: DSC может использоваться для измерения термостабильности белка. Наилучшие значения Tm приведены в Таблице 31.

Таблица 31: Значения термической температуры плавления (Tm) для молекул dAb-Fc, определенные с помощью DSC.

Образец	Tm dAb и доменов CH2		Tm домена CH3 (°C)
	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	
3h56-269-IgG4.1	62.8		69.6
3h56-269-CT	55.4	60.4	83.2
3h56-269-IgG1.1f	59.0	61.6	82.3
3h56-269-IgG1.3f	57.0	62.8	81.9
3h56-269-IgG1-D265A	56.4	61.4	82.4

На основании характерных профилей термической денатурации для доменов Fc IgG переходу домена Fc CH3 для 3h56-269-IgG4.1 было присвоено значение перехода со средней точкой (T_m) 69,6°C; и домену Fc CH3 различных молекул IgG1 был присвоен переход с T_m вблизи ~ 82-83°C. Денатурация домена dAb и домена CH2 для dAb-Fc были отнесены к переходу(ам) ниже 65°C, которые отличаются между различными конструкциями, как по началу термической денатурации (T_{onset}), так и по форме разворачивающегося перехода, и лучше всего подходят значения T_m . Например, термический переход для доменов dAb и CH2 3h56-269-IgG4.1 проявляется как одиночный перекрывающийся или кооперативный переход со значением T_m 62,8°C. Все профили денатурации для доменов dAb и CH2 3h56-269-IgG1-D265A, 3h56-269-IgG1.1f и 3h56-269-IgG1.3f соответствуют более асимметричному переходу, который лучше всего описан двумя переходами, имеющими значения T_m между ~ 56 - 63°C. 3h56-269-CT имел самую низкую T_{onset} , начинающую разворачиваться около 40°C, с широким термическим переходом и самыми низкими установленными значениями T_m T_{m1} = 55,4°C и T_{m2} = 60,4°C.

Результаты - Визуализированная капиллярная изоэлектрическая фокусировка (icIEF): Визуализированная капиллярная изоэлектрическая фокусировка (icIEF) может использоваться для характеристики однородности или неоднородности образца. Способность генерировать однородный продукт является еще одним важным критерием развития. Следовательно, во время открытия и оптимизации нового белкового терапевтического средства различные аналитические способы используются для характеристики и количественного определения неоднородностей образца, а также для выбора наиболее гомогенных молекул.

Профили заряда для молекул dAb-Fc были охарактеризованы с помощью icIEF. Данные показаны на ФИГ. 23. Профили icIEF для 3h56-269-IgG4.1 (ФИГ. 23А), 3h56-269-IgG1.1f (ФИГ. 23Е) и 3h56-269-IgG1.3f (ФИГ. 23F) все относительно просты, причем каждый состоит из отчетливого основного пика с площадью 69-86% и между двумя и четырьмя вариантами заряда в более низкой представленности. Этот профиль icIEF аналогичен типичному профилю, полученному для антитела. Основным пиком для 3h56-269-IgG1-D265A (фиг. 23D) является несколько более низкая представленность (49%) с соответствующим более высоким уровнем кислых вариантов по меньшей мере с шестью обнаруживаемыми видами. Напротив, профиль для 3h56-269-CT (ФИГ. 23В) является высоко гетерогенным, состоящим по меньшей мере из 16 различных видов и без четкого основного пика. Профиль icIEF для 3h56-269-CT, экспрессируемый в другой клеточной линии (UCOE-CHO), был одинаково гетерогенным (ФИГ. 23С), хотя распределение вариантов заряда значительно отличалось от материала, экспрессированного НЕК293.

Результаты - Масс-спектрометрия: Типичное гликозилирование в домене Fc IgG или содержащих Fc белках представляет собой смесь G0F, G1F и некоторых видов G2F. Другие

гликоформы, такие как сialiрованные или нефукозилированные формы, как правило, обнаруживаются в значительно меньшей численности или на неопределяемых уровнях.

Для того чтобы охарактеризовать профили гликозилирования белков dAb-Fc и сравнить белки dAb-Fc с контрольными антителами с аналогичными мутациями Fc, были проведены масс-спектрометрические эксперименты. Данные приведены в Таблице 32.

Таблица 32. Обнаруживаемые гликоформы в молекулах dAb-Fc и антител, определенные способом масс-спектрометрии.

Образец	G0F	G1F	G2F	G2FS1	G2FS2
3h56-269-IgG4.1	67%	29%	4%		
3h56-269-IgG1.1f	32%	58%	9%		
3h56-269-IgG1.3f	42%	55%	3%		
3h56-269-IgG1-D265A	4%	37%	43%	13%	2%
1F4-IgG1f	68%	32%			
1F4-IgG1.3f	26%	64%	10%		
1F4-D265A	27%	40%	27%	4%	2%

Данные масс-спектрометрии для контрольных антител 1F4-IgG1f и 1F4-IgG1.3f, а также для антител dAb-Fc 3h56-269-IgG4.1, 3h56-269-IgG1.1f, 3h56-269-IgG1.3f, показали, что эти белки состоят из типичной смеси гликоформ G0F, G1F с более низким содержанием видов G2F.

Таким образом, IgG1.3 (константная область тяжелой цепи и Fc) по существу лишен связывания с CD16, CD32a, CD32b и CD64 и обладает хорошими биофизическими свойствами. Это также наблюдалось, когда Fc IgG1.3 был связан с вариабельным доменом антител к TIM3 (см. WO2018/013818). Было показано, что антитело к TIM3, содержащее IgG1.3, обладает хорошей термической стабильностью ($T_{m1} = 68,1^{\circ}\text{C}$, $T_{m2} = 80,3^{\circ}\text{C}$, $T_{m3} = 82,6^{\circ}\text{C}$) и термической обратимостью (95,6% при 74°C , 25,5% при 80°C), что говорит о том, что молекула сохраняет свою структурную целостность при термическом стрессе и обладает устойчивыми свойствами рефолдинга при снятии стресса.

ТАБЛИЦА 33 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Полноразмерный IgG1 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK

		DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	CH1 IgG1 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV
3	Шарнир IgG1 дикого типа	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
4	CH2 IgG1 дикого типа	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAK
5	CH3 IgG1 дикого типа	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6	Полноразмерный IgG2 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTV <u>ERKCCVECP</u> PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	CH1 IgG2 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTV
8	Шарнир IgG2 дикого типа	ERKCCVECPPCAPPVAG
9	CH2 IgG2 дикого типа	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNAKGLPAPIEKTISKTK
10	CH3 IgG2 дикого типа	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

11	Полноразмерный IgG3 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRV <u>ELKTPLGDTTHTCPRCPE</u> PKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTFRVVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNIFSCSVMEALHNRFQKSLSLSPGK
12	CH1 IgG3 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRV
13	Шарнир IgG3 дикого типа	ELKTPLGDTTHTCPRCPE
14	CH2 IgG3 дикого типа	PKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFK WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSIVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK
15	CH3 IgG3 дикого типа	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES SGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCS VMHEALHNRFQKSLSLSPGK
16	Полноразмерный IgG4 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN KPSNTKVDKRV <u>ESKYGPPCPSCPAPEFL</u> GGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
17	CH1 IgG4 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN KPSNTKVDKRV
18	Шарнир IgG4 дикого типа	ESKYGPPCPSCPAPEFLGG

19	CH2 IgG4 дикого типа	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKGLPSSIEKTISKAK
20	CH3 IgG4 дикого типа	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
21	Модифицированный IgG2 Шарнир (C219S)	ERK <u>S</u> CV E CP P CPAPPVAG
22	IgG2/IgG1 гибридный шарнир	ERKCCVECP P CPAPELLGG
23	IgG2 C219S/IgG1 гибридный шарнир	ERK <u>S</u> CV E CP P CPAPELLGG
24	Модифицированный CH2 IgG1 (A330S/P331S)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALP <u>S</u> IEKTISKAK
25	IgG1.1 Шарнир (L234A/L235E/G237A)	EPKSCDKTHTCP P CPAPE <u>A</u> E <u>G</u> A
26	IgG1-IgG2-IgG1 (IgG1- IgG2/IgG1(SEQ#22)- IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKK <u>VERKCCVECPPCPAPELLGG</u> PSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
27	IgG1-IgG2-IgG12 (IgG1-IgG2(SEQ#8)- IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKK <u>VERKCCVECPPCPAPPVAG</u> PSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

28	IgG2-IgG1 (IgG2-IgG2/IgG1(SEQ#22)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTV <u>ERKCCVECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	IgG2-IgG12 (IgG2-IgG2(SEQ#8)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTV <u>ERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	IgG1-IgG2-IgG1.1 (IgG1-IgG2(SEQ#8)-IgG1(A330S/P331S)-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKK <u>VERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	IgG2-IgG1.1 (IgG2-IgG2(SEQ#8)-IgG1(A330S/P331S)-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTV <u>ERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	IgG1-IgG2CS-IgG1 (IgG1-IgG2(C219S)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKK <u>VERKSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

		EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
33	IgG1-IgG2CS-IgG12 (IgG1-IgG2(C219S)- IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKK <u>VERK</u> SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
34	IgG2CS-IgG1 (IgG2-IgG2(C219S)- IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKT <u>VERK</u> SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
35	IgG2CS-IgG12 (IgG2-IgG2(C219S)- IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKT <u>VERK</u> SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
36	IgG1-IgG2CS-IgG1.1 (IgG1-IgG2(C219S)- IgG1(A330S/P331S)- IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKK <u>VERK</u> SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP <u>SS</u> IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

37	IgG2CS-IgG1.1 (IgG2-IgG2(C219S)- IgG1(A330S/P331S)- IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTV <u>ERK</u> SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP <u>SS</u> IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	Ab 11F11 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMHWVRQAPG KGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
39	Ab 4C3 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWKSGSIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCVKGYVILTGLDYWGQGTLLTVSS
40	Ab CD73.10 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA <u>A</u> SGFTFSNYGMHWVRQAP GKGLEWVAVI <u>WYDE</u> SNKYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
41	Ab CD73.3 VH (4C3 / V94A)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWKSGSIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDT <u>V</u> LYYCVKGYVILTGLDYWGQGTLLTVSS
42	Ab 6E11 VH	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGITWNSGGIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDRYYSSWLLFDNWGQGILVTVSS
43	Ab CD73.4 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAP GKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
44	Ab 11F11 полноразмерный HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMHWVRQAPG KGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTV <u>ERK</u> CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

		GQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
45	Ab 4C3 полноразмерный HC	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWKSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCVKGYVILTGLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	Ab 6E11 полноразмерный HC	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGITWNSGGIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDRYYSSWLLFDNWGQGILTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	Ab CD73.10-IgG2-C219S полноразмерный HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAP GKGLEWVAVI <u>WYDE</u> SNKYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGMVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKTV <u>ERKSC</u> VECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

48	Ab CD73.10-IgG2-C219S-IgG1.1 полноразмерный HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAP GKGLEWVAVI <u>WYDE</u> SNKYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKT <u>VERKSCVEC</u> PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
49	Ab CD73.10-IgG1.1 полноразмерный HC (IgG1.1 – IgG1.1(L234A/L235E/G2 37A)- IgG1.1(A330S/P331S)- IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAP GKGLEWVAVI <u>WYDE</u> SNKYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>AEG</u> APSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
50	Ab CD73.4-IgG2-C219S полноразмерный HC	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAP GKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN TKVDKT <u>VERKSCVEC</u> PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
51	Ab CD73.3-IgG1.1 полноразмерный HC	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWKSIGSYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDT <u>V</u> LYYCVKGYVILTGLDYWGQGTLLTVTVSSASTKGPS

	(IgG1.1 – IgG1.1(L234A/L235E/G2 37A)- IgG1.1(A330S/P331S)- IgG1.1)	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>AEG</u> APSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP <u>SSI</u> EKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRE <u>EM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
52	Полноразмерная константная область тяжелой цепи IgG2- IgG2-IgG2-IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	Полноразмерная константная область тяжелой цепи IgG1- IgG1-IgG1-IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE <u>EM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	Полноразмерная константная область тяжелой цепи IgG1- IgG1.1(L234A/L235E/G2 37A)-IgG1.1 (A330S/P331S)-IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>AEG</u> APSVFLFPPKPK DTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP <u>SSI</u> EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE <u>EM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
55	Полноразмерная константная область тяжелой цепи IgG2-	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

	IgG2/IgG1 hybrid-IgG1-IgG1	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
56	Полноразмерная константная область тяжелой цепи IgG2-IgG2-IgG1.1(A330/P331S)-IgG1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTV ER KCCVECP PC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP <u>SS</u> IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
57	Table 2 – шарнирный домен	VDKRV
58	Table 2 – шарнирный домен	VDKTV
59	Table 2 – шарнирный домен	EPKSCDKTHT
60	Table 2 – шарнирный домен	ERK
61	Table 2 – шарнирный домен	ELKTPLGDTTHT
62	Table 2 – шарнирный домен	EPKS
63	Table 2 – шарнирный домен	ESKYGPP
64	Table 2 – шарнирный домен	CPPCP
65	Table 2 – шарнирный домен	CCVECP PC P
66	Table 2 – шарнирный домен	CPRCP
67	Table 2 – шарнирный домен	EPKSCDTPPPCPRCP
68	Table 2 – шарнирный домен	CDTPPPCPRCP

69	Table 2 – шарнирный домен	CPSCP
70	Table 2 – шарнирный домен	APELLGG
71	Table 2 – шарнирный домен	APPVAG
72	Легкая цепь 11F11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
73	Легкая цепь 4C3	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
74	Легкая цепь 6D11	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QHYGSSFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
75	Анти-GITR AbVH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAWIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWGQGTTVTVS S
76	Анти-GITR Ab VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QFNSYPYTFGQGGTKLEIK
77	Анти-GITR Ab LC	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QFNSYPYTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV <u>CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTS</u> <u>SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
78	IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK

		DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
79	IgG2.3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
80	IgG2.3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
81	IgG2.3G1-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
82	IgG2.5	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

		EWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
83	IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QQNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
84	IgG2.3G1.1f-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
85	IgG1-deltaTHT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
86	IgG2.3-plusTHT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVETHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

87	IgG2.3-plusGGG	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKSCVEGGGCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
88	IgG2.5G1.1f-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
89	IgG2.5G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKCCVECPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
90	IgG2.5G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
91	IgG2.5-plusTHT	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKCCVETHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD

		TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
92	IgG1-G2.3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVERKSCVECPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
93	IgG1-G2.3G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVERKSCVECPAPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	G2-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTK VDKTVER KSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	G2.5-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV

		HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTK VDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
96	G1-G2.3-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV LHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
97	G1-KRGEGSSNLF	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW

		QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
98	G1-KRGEES	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
99	G1-SNLF	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
100	IgG1-ITNDRTPR	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTK VDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK

		EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
101	G1-SNLFPR	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVER KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
102	G2-RKEGSGNSFL	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNTK VDKTVR KSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
103	G2-RKEGSG	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTK VDKTVR

		KSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
104	G2-NSFL	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKTVR KSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	IgG2-TIDNTRRP	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

106	G2-NSFLRP	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKTVEP KSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
107	G1-G1-G2-G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGDSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
108	G1-G1-G2-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK

		EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
109	G2-G2.3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKTVR KSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
110	G2.5-G2.3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKTVR KSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
111	G2-G2.3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKTVR

		KSCVECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
112	G2.5-G2.3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTK VDKTVR KSCVECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
113	G1-G2.3-G1-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

114	G2-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	G2.5-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
116	G1-G2-G1-G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC

		LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
117	G2-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTK VDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
118	G2.5-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTK VDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
119	IgG1-deltaШарнир	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK

		EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	IgG2-deltaШарнир	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKTVR KCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
121	IgG2.5-deltaШарнир	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKTVR KCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
122	IgG1-deltaG237	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVS

		HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
123	IgG2-plusG237	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTK VDKTVR KSCVECPPCPAPPVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD DVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV LHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
124	IgG2.4	ASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCSVEC PPCAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSFLT VVHLDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
125	IgG2.3/4	ASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF

		GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKSSVEC PPCAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVSVSLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
126	Шарнир IgG2 C220S	ERKCSVECPPCPAPPVAG
127	IgG2/IgG1 гибридный шарнир C220S	ERKCSVECPPCPAPELLGG
128	Часть шарнира IgG2 дикого типа	ERKCCVECPPCPAP
129	IgG2 шарнирная часть C219S	ERKSCVECPPCPAP
130	IgG2 шарнирная часть C220S	ERKCSVECPPCPAP
131	IgG2 шарнирная часть C219X	ERKXCVECPPCPAP
132	IgG2 шарнирная часть C220X	ERKCXVECPPCPAP
133	IgG2 CH1+IgG2 шарнир (дикого типа)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG
134	IgG2 с C219X	ERKXCVECPPCPAPPVAG
135	IgG2 с C220X	ERKCXVECPPCPAPPVAG
136	IgG2/IgG1 гибрид с C219X	ERKXCVECPPCPAPELLGG
137	IgG2/IgG1 гибрид с C220X	ERKCVVECPPCPAPELLGG
138	IgG2/IgG1 гибрид deltaG	ERKCCVECPPCPAPELLG
139	IgG2/IgG1 гибрид с C219S deltaG	ERKSCVECPPCPAPELLG

140	IgG2/IgG1 гибрид с C220S deltaG	ERKCSVECPPCPAPPELLG
141	IgG2/IgG1 гибрид с C219X deltaG	ERKXCVECPPCPAPPELLG
142	IgG2/IgG1 hybrid with C220X deltaG	ERKCXVECPPCPAPPELLG
143	IgG2 дикого типа с C-концевым X	ERKCCVECPPCPAPPVAGX
144	IgG2 с C219S с C-концевым X	ERKSCVECPPCPAPPVAGX
145	IgG2 с C220S с C-концевым X	ERKCSVECPPCPAPPVAGX
146	IgG2 с C219X с C-концевым X	ERKXCVECPPCPAPPVAGX
147	IgG2 с C220X с C-концевым X	ERKCXVECPPCPAPPVAGX
148	IgG2 шарнирная часть	PVAG
149	IgG1 шарнирная часть	SCDKTHT
150	IgG1 шарнирная часть 1	ELLG
151	IgG1 шарнирная часть 2	ELLGG
152	IgG2.3-V13	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DH KPSNTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
153	IgG2.3-V14	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DH KPSNTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

154	IgG2.3-V15	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDEDGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
155	IgG2.3-V16	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPRPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
156	IgG2.3-V17	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDEDGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPRPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
157	IgG2.3-V18	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
158	IgG2.3-V19	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

		EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGFPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
159	IgG2.3G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKSCVECPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
160	IgG2.3G1-V20	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKSCVECPAPPELLGGDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
161	IgG2.3G1-V21	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKSCVECPAPPELLGGDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
162	IgG2.3G1-V22	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKSCVECPAPPELLGGDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

163	IgG2.3G1-V23	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
164	IgG2.3G1-V24	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
165	IgG2.3G1-V25	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
166	IgG2.3G1-V26	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPPCPAPDLLGDDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
167	IgG2.3G1-V27	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

		EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
168	IgG2.3G1-V28	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFAPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
169	IgG2.3G1-AY-V9-D270E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPAPPELLGDDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEEGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
170	IgG2.3G1-AY-V11	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPAPPELLGDDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
171	IgG2.5G1-AY-V9-D270E	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPAPPELLGDDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEEGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

172	IgG2.5G1-AY-V11	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKCCVECPKPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
173	IgG1f-GASDALIE	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPE EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
174	IgG1f-G236A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
175	IgG2.3G1-AY-G236A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPKPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
176	IgG2.3G1-AY- GASDALIE	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPKPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

		EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
177	IgG2.5G1-AY-G236A	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
178	IgG2.5G1-AY- GASDALIE	STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHK PSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
179	IgG2.3G1.1f-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKSCVECPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
180	IgG2.3G1.3f-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKSCVECPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

181	IgG2.3G1-AY-D265A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
182	IgG2.3G1-AY-N297A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
183	IgG2.5G1.1f-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
184	IgG2.5G1.3f-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
185	IgG2.5G1-AY-D265A	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

		EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
186	IgG2.5G1-AY-N297A	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKCCVECPPELGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
187	CT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKSCDKTHTSPSPAPELGGSSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
188	CTf	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKSCDKTHTSPSPAPELGGSSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
189	IgG2.3-CT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKSCVESPPSPAPELGGSSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

190	IgG2.5-CT	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKCCVESPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
191	IgG1fa-C226S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
192	IgG1fa-C229S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
193	IgG1fa-C226S,C229S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTSPSPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
194	IgG1fa-P238S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

		PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
195	IgG1fa-C226A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTAPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
196	IgG1fa-C229A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
197	IgG1fa-C226A,C229A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTAPPAPPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
198	IgG1fa-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

199	IgG2.3-R133K	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKSCVECPCPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
200	IgG2.3-E137G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGSTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVVERKSCVECPCPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
201	IgG2.3-S138G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSEGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVVERKSCVECPCPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
202	IgG2.3-E137G-S138G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVVERKSCVECPCPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
203	IgG2.3-T214R	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKRVERKSCVECPCPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

		EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
204	IgG2.3-R217P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVEPKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
205	IgG2.3-R217S	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVESKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
206	IgG2.3-V224A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKSCAECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
207	IgG2.3-E225A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKSCVACPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

208	IgG2.3-R133A	ASTKGPSVFPLAPCSASTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKSCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSFLTIVHQLDGLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
209	IgG2.3-E137D	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSDSTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVRKSCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSFLTIVHQLDGLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
210	IgG2.3-E137Q	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSQSTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVRKSCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSFLTIVHQLDGLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
211	IgG2.3-S138T	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSETTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKSCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSFLTIVHQLDGLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
212	IgG2.3-S138E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSEETAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKSCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

		EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
213	IgG2.3-E137A-S138I	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSAITAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
214	IgG2.3-E137I-S138A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSIATAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
215	IgG2.3-R217G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
216	IgG2.3-R217A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

217	IgG2.3-R217I	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVEIKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
218	IgG2.3-R217E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVEEKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
219	IgG2.3-R217K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVEKKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
220	IgG2.3-V224I	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKSCIECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
221	IgG2.3-E225D	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKSCVDCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

		EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
222	IgG2-G4.1-G4-G4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
223	IgG4-G2.3-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
224	IgG2-G4.1-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
225	IgG4-G2.3-G4-G4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

226	IgG2-G2.3-G4-G4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
227	IgG4-G4.1-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
228	IgG4-G4.1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
229	IgG4.1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
230	IgG4.1-R214T	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKTVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

		EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
231	IgG4.1-S217R	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKRVERKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
232	IgG4.1-S217P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKRVEPKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
233	IgG1fa	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
234	IgG1.3fa	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

235	IgG1fa-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGK S VFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
236	IgG1.3fa-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA E GAK S VFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
237	IgG1fa-L235E-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELEG G KSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
238	IgG1fa-L235A-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELA G GK S VFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
239	IgG1fa-L235E-P238K- K322A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELEG G KSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

		KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
240	IgG2.3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
241	IgG2.3-P238K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPVAGKSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
242	IgG2.3G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
243	IgG2.3G1-P238K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

244	IgG2.3G1-L235E-P238K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKSCVECPPELGGKSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
245	IgG2.5G1-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVKCCVECPPELGGKSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
246	hIgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
247	hIgG1f-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
248	hIgG1.3f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

		PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
249	hIgG1.3f-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA E G A KSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
250	hIgG1f-L235E-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE L E G G K SVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
251	hIgG1f-L235E-P238K- K322A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE L E G G K SVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK C A V SNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
252	IgG2.3G1.3f	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDK T VERK S C V ECPPCPAPEA E G A PSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT K PRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI E K T ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS D I A V EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ Q G N VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

253	IgG2.3G1.3f-P238K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPEA EGA KSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
244	IgG2.3G1-L235E-P238K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPELEGGKSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
254	IgG2.3G1-L235E-P238K- K322A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCPAPELEGGKSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
255	IgG2.5	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
256	IgG2.5-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCPAPPVAGKSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

		EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
257	IgG2.5G1	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKCCVECPPELGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
258	IgG2.5G1-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKCCVECPPELGGKSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
259	IgG2.5G1.3f	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKCCVECPPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
260	IgG2.5G1.3f-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKCCVECPPEAEAGAKSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

261	IgG2.5G1-L235E-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKCCVECPPCPAPELEGGKSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
262	IgG2.5G1-L235E-P238K-K322A	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVRKCCVECPPCPAPELEGGKSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
263	3h56-269-IgG4.1 ИЛИ BMS-986090	<u>EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFRDYEMWWVRQAPG</u> <u>KGLERVSA</u> <u>INPQGTRTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCAKLP</u> <u>FRFSDRGQGTLVTVSSASTE</u> SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK
264	3h56-269-CT	<u>EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFRDYEMWWVRQAPG</u> <u>KGLERVSA</u> <u>INPQGTRTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCAKLP</u> <u>FRFSDRGQGTLVTVSSASTE</u> PKSSDKTHTSPSPAPPELLGGSSVF LFPPK

		PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
265	3h56-269-IgG1.1f	<u>EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFRDYEMWWVRQAPG</u> <u>KGLERVSAINPQGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS</u> <u>LRAEDTAVYYCAKLPFRFSDRGQGTLVTVSS</u><u>ASTEPKSCDKTH</u> TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
266	3h56-269-IgG1.3f	<u>EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFRDYEMWWVRQAPG</u> <u>KGLERVSAINPQGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS</u> <u>LRAEDTAVYYCAKLPFRFSDRGQGTLVTVSS</u><u>ASTEPKSCDKTH</u> TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
267	3h56-269-IgG1-D265A	<u>EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFRDYEMWWVRQAPG</u> <u>KGLERVSAINPQGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS</u> <u>LRAEDTAVYYCAKLPFRFSDRGQGTLVTVSS</u><u>ASTEPKSCDKTH</u> TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

268	1F4 Вариабельная область тяжелой цепи и CH1	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDNSKNTLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSV</u> FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRV
269	1F4 Вариабельная область легкой цепи и CL	<u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSYLAWYQOKPGQA</u> <u>PRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC</u> <u>QQYGSSPYTFGQGTKLEIKR</u> TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
270	1F4-IgG1f тяжелая цепь	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDNSKNTLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSV</u> <u>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH</u> <u>TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u> <u>KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP</u> EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
271	1F4-IgG4.1 тяжелая цепь	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDNSKNTLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSV</u> <u>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH</u> <u>TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNTKV</u> <u>DKR</u> VESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLG
272	1F4-IgG1.1f тяжелая цепь	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDNSKNTLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSV</u>

		<u>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH</u> <u>TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u> <u>KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
273	1F4-IgG1.3f тяжелая цепь	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDN SKNTLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV</u> <u>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH</u> <u>TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u> <u>KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
274	1F4-D265A тяжелая цепь	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAGK</u> <u>GLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDN SKNTLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV</u> <u>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH</u> <u>TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u> <u>KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> EVTCTVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIVESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
275	1F4-CT тяжелая цепь	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVSAISDSGGRTYFADSVRGRFTISRDN SKNTLSLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCAKVDYSNYLFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV</u> <u>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH</u> <u>TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u> <u>KRVEPKSCDKTHTSPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRT</u>

		EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
--	--	---

Специалисты в данной области техники распознают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов выполнения, описанных в настоящем документе. Такие эквиваленты предназначены для охвата следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, в котором модифицированная константная область тяжелой цепи содержит домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3 в порядке от N- до С-конца, в котором шарнир представляет собой изотип IgG2 и по меньшей мере один из доменов CH1, CH2 или CH3 не относится к изотипу IgG2.
2. Антитело по п. 1, в котором шарнир представляет собой шарнир человеческого IgG2 дикого типа или содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности шарнира человеческого IgG2 дикого типа.
3. Антитело по п. 1 или 2, в котором шарнир содержит одну или несколько модификаций, которые уменьшают образование дисульфидной связи.
4. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором шарнир содержит аминокислотную замену C219S.
5. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором шарнир содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 8, 21-23, 126-132 или 134-147 или последовательность, содержащую 1-3 аминокислоты, вставленные между CVE и CPP.
6. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG2.
7. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH1 представляет собой домен CH1 человеческого IgG2 дикого типа или содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности домена CH1 человеческого IgG2 дикого типа.
8. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH1 IgG2 содержит аминокислотную последовательность
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO: 7).
9. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH2 представляет собой домен CH2 IgG1.

10. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH2 представляет собой домен CH2 человеческого IgG1 дикого типа или содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности домена CH2 человеческого IgG1 дикого типа.
11. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH2 содержит одну или несколько модификаций, которые уменьшают или устраняют эффекторные функции.
12. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH2 содержит аминокислотные замены A330S и P331S.
13. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH2 содержит аминокислотную последовательность
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO: 4).
14. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH3 представляет собой домен Ig3 IgG1.
15. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH3 представляет собой домен CH3 человеческого IgG1 дикого типа или содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности домена CH3 человеческого IgG1 дикого типа.
16. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH3 содержит аминокислотную последовательность
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5).
17. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, в котором домен CH3 содержит аминокислотные замены E356D и M358L.
18. Антитело по любому одному из пп. 1-17, которое обладает по меньшей мере одним усиленным свойством или новым введенным свойством относительно того же антитела, которое содержит шарнир IgG1 и домен CH1.

19. Антитело по п. 18, в котором антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредуемой антителом рецепторной интернализации, ADCC, опосредованной рецептором сигнализации, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности и противоопухолевой активности; или новым введенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность.

20. Антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, содержащую домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3 в порядке от N- до C-конца, и в котором

(a) домен CH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, которая отличается от нее не более чем на 5 аминокислот или которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 7, и где по меньшей мере один из C131, R133, E137, S138 или R217 не заменен или не удален;

(b) шарнир содержит любую из SEQ ID NO: 8, 21-23, 126-132 или 134-147 или последовательность, которая содержит 1-3 аминокислоты, вставленных между CVE и CPP, или которая отличается от них не более чем на 5 аминокислот, где шарнир не содержит замены или делеции как в C219, так и в C220;

(c) антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством или новым введенным свойством относительно того же антитела, которое содержит шарнир IgG1 и домен CH1; и

(d) модифицированная константная область тяжелой цепи не является константной областью IgG2 дикого типа или константной областью IgG2, содержащей C219S и/или C220S.

21. Антитело по п. 20, в котором шарнир содержит аминокислотную последовательность ERKXCVECPCPCAP (SEQ ID NO: 129) или ERKCXVECPCPCAP (SEQ ID NO: 130), где X представляет собой любую аминокислоту, кроме цистеина.

22. Антитело по п. 21, в котором шарнир содержит аминокислотную последовательность ERKSCVECPCPCAP (SEQ ID NO: 131) или ERKCSVECPCPCAP (SEQ ID NO: 132).

23. Антитело по любому одному из пп. 20-22, в котором по меньшей мере один из P233, V234, A235 или G237 удален или заменен другим аминокислотным остатком.

24. Антитело по п. 23, в котором P233, V234, A235 и G237 удалены или заменены другим аминокислотным остатком.

25. Антитело по любому одному из пп. 20-24, в котором ни один из аминокислотных остатков R133, E137, S138 и R217 не заменен или не удален.

26. Антитело по п. 24, в котором ни один из аминокислотных остатков C131, R133, E137, S138 и R217 не заменен или не удален.
27. Антитело по любому одному из пп. 20-26, в котором N192 заменен другой аминокислотой.
28. Антитело по любому одному из пп. 20-27, в котором F193 заменен другой аминокислотой.
29. Антитело по любому одному из пп. 20-28, в котором антитело содержит домен CH2, который по меньшей мере на 95% идентичен домену IgG1 дикого типа.
30. Антитело по любому одному из пп. 20-29, в котором антитело содержит домен CH3, который по меньшей мере на 95% идентичен домену IgG1 дикого типа.
31. Антитело по любому одному из пп. 28-30, в котором домен CH2 и/или CH3 не является доменом CH2 и/или CH3 IgG1 дикого типа, и где антитело обладает эффекторной функцией, которая является более сильной, чем функция IgG1 дикого типа.
32. Антитело по любому одному из пп. 28-30, в котором домен CH2 и/или CH3 не является доменом CH2 и/или CH3 IgG1 дикого типа, и где антитело обладает эффекторной функцией, которая является менее сильной, чем функция IgG1 дикого типа.
33. Антитело по любому одному из пп. 20-32, где антитело содержит домен CH2, который по меньшей мере на 95% идентичен домену IgG4 дикого типа.
34. Антитело по любому одному из пп. 20-33, где антитело содержит домен CH3, который по меньшей мере на 95% идентичен домену IgG4 дикого типа.
35. Антитело по любому одному из пп. 20-34, где антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованного антителом рецепторной интернализации, ADCC, опосредованной рецептором сигнализации, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или новым введенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность.
36. Антитело по п. 35, в котором
- (а) домен CH1 представляет собой домен CH1 человеческого IgG2 дикого типа;

- (b) шарнир содержит SEQ ID NO: любой одной из SEQ ID NO: 8, 21-23, 126-132 или 134-147 или последовательность, которая содержит 1-3 аминокислоты, вставленные между CVE и CPP;
- (c) домен CH2 представляет собой домен CH2 человеческого IgG1 дикого типа или модифицированный домен CH2, придающий антителу усиленную или пониженную эффекторную функцию; и
- (d) домен CH3 представляет собой домен CH3 человеческого IgG1 дикого типа или модифицированный домен CH3, придающий антителу усиленную или пониженную эффекторную функцию.

37. Антитело по любому одному из предшествующих пунктов, содержащее аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262.

38. Антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, где константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнир, содержащий последовательность **ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 133), или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 133 не более чем в 10 аминокислот, или по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 133, в котором по меньшей мере один из C131, R133, E137, S138 и R217 не заменен другой аминокислотой или не удален;**

C219 и C220 могут быть заменены другой аминокислотой или удалены, но C219 и C220 не могут быть оба заменены или удалены;

1-3 аминокислоты могут быть вставлены между CVE и CPP в шарнир;

шарнир необязательно содержит дополнительную аминокислоту на С-конце, напр., G;

одна или несколько аминокислот P233, V234, A235 и G237 могут быть заменены другой аминокислотой (напр., соответствующей аминокислотой из IgG1) или удалены;

домены CH2 и CH3 могут быть доменами CH2 и CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа или модифицированными;

модифицированная константная область тяжелой цепи не является константной областью тяжелой цепи IgG2 дикого типа или тяжелым константным доменом IgG2 дикого типа с C219S или C220S; и антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством или новым введенным свойством относительно того же антитела, которое содержит шарнир IgG1 и домен CH1.

39. Антитело по п. 38, где антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителом рецепторной интернализации, ADCC, опосредованной рецептором передачи сигнала, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или новым введенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность.
40. Антитело по п. 38 или 39, в котором ни одна из аминокислот C131; R133; E137; S138; R217 не заменена другой аминокислотой или не удалена.
41. Антитело по любому одному из пп. 38-40, в котором N192 и/или F193 не заменены или представляют собой N192S и/или F193L соответственно.
42. Антитело по любому одному из пп. 38-41, в котором C219 представляет собой C219S.
43. Антитело по любому одному из пп. 38-41, в котором C220 представляет собой C220S.
44. Антитело по любому одному из пп. 38-43, в котором P233-G237 заменены или удалены.
45. Антитело по любому одному из пп. 38-43, в котором V234-G237 заменены или удалены.
46. Антитело по любому одному из пп. 38-43, в котором A235-G237 заменены или удалены.
47. Антитело по любому одному из пп. 38-43, в котором G237 заменен или удален.
48. Антитело по любому одному из пп. 38-43, в котором P233 заменен или удален.
49. Антитело по любому одному из пп. 38-43, в котором P233-V234 заменены или удалены.
50. Антитело по любому одному из пп. 38-43, в котором P233-A235 заменены или удалены.
51. Антитело по любому одному из пп. 38-50, где антитело обладает эффекторной функцией.
52. Антитело по любому одному из пп. 38-50, где антитело не обладает эффекторной функцией.
53. Антитело по любому одному из пп. 38-52, в котором антитело содержит домен CH2 IgG1 дикого типа или модифицированного.

54. Антитело по любому одному из пп. 38-52, в котором антитело содержит домен CH3 IgG1 дикого типа или модифицированного.
55. Антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, в котором константная область тяжелой цепи содержит домен CH1, содержащий последовательность
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVE (SEQ ID NO: 7) или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 7 на не более чем 10 аминокислот, или имеет по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 7, в котором по меньшей мере один из C131, R133, E137, S138 и R217 не заменен или не удален; модифицированная константная область тяжелой цепи не является константной областью тяжелой цепи IgG2 дикого типа или тяжелым константным доменом IgG2 дикого типа с C219S или C220S; и антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством или новым введенным свойством относительно того же антитела, которое содержит шарнир IgG1 и домен CH1.
56. Антитело по п. 55, где антитело обладает по меньшей мере одним улучшенным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителом рецепторной интернализации, ADCC, опосредованной рецептором передачи сигнала, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или новым введенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность.
57. Антитело по п. 55 или 56, в котором ни одна из аминокислот C131; R133; E137 и S138 не заменена другой аминокислотой или не удалена.
58. Антитело по любому одному из пп. 55-57, в котором N192 и/или F193 не заменены или представляют собой N192S и/или F193L соответственно.
59. Антитело по любому одному из пп. 55-58, где антитело обладает эффекторной функцией.
60. Антитело по любому одному из пп. 55-58, где антитело не обладает эффекторной функцией.
61. Антитело по любому одному из пп. 55-60, где антитело содержит домен CH2 IgG1 дикого типа или модифицированного.

62. Антитело по любому одному из пп. 55-61, где антитело содержит домен CH3 IgG1 дикого типа или модифицированного.
63. Антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, в котором константная область тяжелой цепи содержит шарнир, содержащий последовательность ERKCCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 8) или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 8 не более чем на 5 аминокислот, в котором C219 и C220 могут быть заменены другой аминокислотой или удалены, но C219 и C220 не могут быть обе заменены или удалены; одна или несколько аминокислот P233, V234, A235 и G237 могут быть заменены или удалены; 1-3 аминокислоты могут быть вставлены между CVE и CPP в шарнир; шарнир необязательно содержит дополнительную аминокислоту на С-конце, напр., G; домены CH2 и CH3 могут быть доменами CH2 и CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа или модифицированного; модифицированная константная область тяжелой цепи не является константной областью тяжелой цепи IgG2 дикого типа или тяжелым константным доменом IgG2 дикого типа с C219S или C220S; и антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством или новым введенным свойством относительно того же антитела, которое содержит шарнир IgG1 и домен CH1.
64. Антитело по п. 63, где антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителом рецепторной интернализации, ADCC, опосредованной рецептором передачи сигнала, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или новым введенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность.
65. Антитело по любому одному из пп. 63-64, в котором C219 представляет собой C219S.
66. Антитело по любому одному из пп. 63-64, в котором C220 представляет собой C220S.
67. Антитело по любому одному из пп. 63-66, в котором P233-G237 мутированы или удалены.
68. Антитело по любому одному из пп. 63-66, в котором V234-G237 мутированы или удалены.
69. Антитело по любому одному из пп. 63-66, в котором A235-G237 мутированы или удалены.
70. Антитело по любому одному из пп. 63-66, в котором G237 мутирован или удален.

71. Антитело по любому одному из пп. 63-66, в котором P233 мутирован или удален.
72. Антитело по любому одному из пп. 63-66, в котором P233-V234 мутированы или удалены.
73. Антитело по любому одному из пп. 63-66, в котором P233-A235 мутированы или удалены.
74. Антитело по любому одному из пп. 63-73, где антитело обладает эффекторной функцией.
75. Антитело по любому одному из пп. 63-73, где антитело не обладает эффекторной функцией.
76. Антитело по любому одному из пп. 63-75, где антитело содержит домен CH2 IgG1 дикого типа или модифицированного.
77. Антитело по любому одному из пп. 63-76, где антитело содержит домен CH3 IgG1 дикого типа или модифицированного.
78. Антитело, содержащее модифицированную константную область тяжелой цепи, в котором константная область тяжелой цепи содержит шарнир IgG1 или IgG2 и в котором шарнир не содержит 1-7 аминокислот, и где антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством или новым введенным свойством относительно того же антитела, которое содержит шарнир IgG1 и домен CH1.
79. Антитело по п. 78, где антитело обладает по меньшей мере одним усиленным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредуемой антителом рецепторной интернализации, ADCC, опосредованной рецептором сигнализации, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или новым введенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность.
80. Антитело по п. 78 или 79, в котором шарнир представляет собой шарнир IgG2, в котором отсутствуют 1-4 аминокислоты.
81. Антитело по п. 80, в котором в шарнире IgG2 отсутствуют аминокислоты C219, C220, V222 и E224.
82. Антитело по п. 78 или 79, в котором шарнир представляет собой шарнир IgG1, в котором отсутствуют аминокислоты S219, C220, D221, K222, T223, H224 и T225.

83. Антитело по любому одному из пп. 78-82, в котором антитело содержит домен CH1 IgG2 дикого типа или модифицированного.
84. Антитело по любому одному из пп. 78-82, в котором антитело содержит домен CH1 IgG1 дикого типа или модифицированного.
85. Антитело по любому одному из пп. 78-84, в котором антитело содержит домен CH2 IgG2.
86. Антитело по любому одному из пп. 78-84, в котором антитело содержит домен CH2 IgG1.
87. Антитело по любому одному из пп. 78-86, в котором антитело содержит домен CH3 IgG2.
88. Антитело по любому одному из пп. 78-86, в котором антитело содержит домен CH3 IgG1.
89. Антитело по любому одному из предыдущих пунктов, которое представляет собой человеческое или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающую часть.
90. Антитело по любому одному из предыдущих пунктов, где антитело специфически связывается с антигеном, который участвует в иммунной регуляции.
91. Антитело по п. 90, где антитело является агонистом костимулирующего рецептора или антагонистом ингибирующего рецептора.
92. Антитело по п. 91, где костимулирующий рецептор выбран из группы B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB, GITR, OX40, ICOS, CD70, CD27, CD40, DR3 или CD28H.
93. Антитело по п. 91, где ингибирующий рецептор выбран из группы CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, Galectin 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectin-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4.
94. Антитело по п. 90, где антиген представляет собой CD73 или CD39.
95. Антитело, которое специфически связывается с костимулирующим рецептором и содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262.

96. Антитело по п. 95, где костимулирующий рецептор представляет собой GITR, OX40, 4-1BB, CD28, ICOS, CD40L, CD27 или любой другой член суперсемейства TNFR.
97. Антитело по п. 95 или 96, где антитело проявляет усиленную или измененную агонистическую активность относительно антитела, имеющего такие же переменные области и легкую цепь, но содержащего константную область тяжелой цепи IgG1.
98. Антитело, которое специфически связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает опосредованную антителами интернализацию молекулы клеточной поверхности и содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262.
99. Антитело по п. 98, где молекулой клеточной поверхности является CD73.
100. Антитело по п. 98 или 99, где антитело обладает усиленными или измененными свойствами интернализации относительно антитела, имеющего такие же переменные области и легкую цепь, но содержащего константную область тяжелой цепи IgG1.
101. Антитело, которое специфически связывается с ингибирующим рецептором и содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262.
102. Антитело по п. 101, где ингибирующий рецептор представляет собой CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, Galectin 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectin-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4.
103. Антитело по п. 101 или 102, где антитело проявляет более сильную или измененную антагонистическую активность или вводит новую активность относительно того же антитела, имеющего константную область тяжелой цепи IgG1.
104. Антитело, которое специфически связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает внутриклеточную передачу сигналов, где антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262.

105. Антитело по п. 104, в котором внутриклеточная передача сигналов опосредует агонистическую активность, антагонистическую активность, интернализацию молекулы клеточной поверхности или ADCC.
106. Антитело по п. 104 или 105, где антитело запускает более сильную внутриклеточную передачу сигналов относительно антитела, имеющего такие же переменные области и легкую цепь, но содержащего константную область тяжелой цепи IgG1.
107. Антитело, которое специфически связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает образование высокомолекулярных комплексов антитело-молекула клеточной поверхности, где антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262.
108. Антитело по п. 107, где антитело запускает образование комплексов с более высокой молекулярной массой относительно антитела, имеющего такие же переменные области и легкую цепь, но содержащего константную область тяжелой цепи IgG1.
109. Антитело, которое специфически связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает кластеризацию или олигомеризацию молекулы клеточной поверхности, где антитело содержит модифицированную константную область тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262.
110. Антитело по п. 109, где антитело запускает большую кластеризацию или олигомеризацию молекулы клеточной поверхности относительно антитела, имеющего такие же переменные области и легкую цепь, но содержащего константную область тяжелой цепи IgG1.
111. Биспецифическая молекула, содержащая антитело по любому из предыдущих пунктов, связанная с молекулой, имеющей вторую специфичность связывания.
112. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по любому из предыдущих пунктов, связанный со вторым агентом.
113. Композиция, содержащая антитело, биспецифическое или иммуноконъюгат по любому одному из пп. 1-112 и носитель.

114. Композиция по п. 44, дополнительно содержащая один или несколько дополнительных терапевтических агентов.

115. Композиция по п. 45, в которой дополнительный терапевтический агент стимулирует иммунную систему.

116. Композиция по п. 46, в которой терапевтический агент представляет собой антагонист ингибитора контрольных точек или костимулирующего рецептора.

117. Способ получения антитела, содержащего модифицированную константную область тяжелой цепи, где антитело содержит домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3 в порядке от N- до С-конца, включающий стадии:

(a) предоставление антитела, содержащего шарнир и/или домен CH1, который не является шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2;

(b) замена шарнира и/или домена CH1 шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2 соответственно.

118. Способ повышения интернализации антитела клеткой, включающий:

(a) предоставление антитела, содержащего шарнир и/или домен CH1, который не является шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2;

(b) замена шарнира и/или домена CH1 шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2 соответственно.

119. Способ по п. 118, в котором интернализация антитела увеличена по сравнению с интернализацией того же антитела, содержащего шарнир изотипа, не относящегося к IgG2, напр., антитела, содержащего константную область IgG1.

120. Способ повышения агонистической активности антитела, включающий:

(a) предоставление антитела, содержащего шарнир и/или домен CH1, который не является шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2;

(b) замена шарнира и/или домена CH1 шарниром IgG2 и/или доменом CH1 IgG2 соответственно.

121. Способ по п. 120, в котором агонистическая активность повышена по сравнению с агонистической активностью того же антитела, содержащего шарнир изотипа, не относящегося к IgG2, напр., антитела, содержащего константную область IgG1.

122. Способ по любому одному из пп. 117-121, в котором шарнир IgG2 является шарниром человеческого IgG2 дикого типа или содержит аминокислотную последовательность, которая по

меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности шарнира человеческого IgG2 дикого типа.

123. Способ по любому одному из пп. 117-122, включающий стадию замены по меньшей мере одного из доменов CH1, CH2 или CH3 доменом CH1, CH2 или CH3 другого изотипа соответственно.

124. Способ по любому одному из пп. 117-123, включающий стадии

- (a) замены домена CH1 на домен CH1 IgG2;
- (b) замены домена CH2 на домен CH2 IgG1; и/или
- (c) замены домена CH3 на домен CH3 IgG1.

125. Способ по любому одному из пп. 117-124, включающий стадии

- (a) замены домена CH1 доменом CH1 человеческого IgG2 дикого типа или доменом, идентичным ему по меньшей мере на 95%;
- (b) замены домена CH2 доменом CH2 человеческого IgG1 дикого типа или доменом, идентичным ему по меньшей мере на 95%; и/или
- (c) замены домена CH3 доменом CH3 человеческого IgG1 дикого типа или доменом, идентичным ему по меньшей мере на 95%.

126. Способ по любому одному из пп. 117-125, включающий стадию замены константной области тяжелой цепи константной областью тяжелой цепи, содержащей любую из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262, или областью, по меньшей мере на 95% идентичной SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125, 152-232, 234-245 и 247-262.

127. Способ по любому одному из пп. 117-126, в котором шарнир модифицирован для уменьшения образования дисульфидной связи.

128. Способ по любому одному из пп. 117-127, в котором шарнир содержит аминокислотную замену C219S.

129. Способ по любому одному из пп. 117-128, в котором шарнир содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 8, 21-23, 126-132 или 134-147, или последовательность, которая содержит 1-3 аминокислоты, вставленные между CVE и CPP.

130. Способ по любому одному из пп. 117-129, в котором домен CH1 содержит аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO: 7).

131. Способ по любому одному из пп. 117-130, в котором домен CH2 модифицирован для уменьшения или устранения эффекторных функций.

132. Способ по любому одному из пп. 117-131, в котором домен CH2 содержит аминокислотные замены A330S и P331S.

133. Способ по любому одному из пп. 117-132, в котором домен CH2 содержит аминокислотную последовательность
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO: 4).

134. Способ по любому одному из пп. 117-133, в котором домен CH2 содержит аминокислотные замены A330S и P331S.

135. Способ по любому одному из пп. 117-134, в котором домен CH3 содержит аминокислотную последовательность
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5).

136. Антитело или его антигенсвязывающая часть, полученные способом по любому одному из пп. 117-135.

137. Антитело или его антигенсвязывающая часть по п. 136, которое представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.

138. Способ лечения субъекта, включающий введение антитела или его антигенсвязывающей части по любому одному из предыдущих пунктов.

139. Способ по п. 138, дополнительно включающий стадию введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов.

140. Способ по п. 139, в котором терапевтический агент стимулирует иммунную систему.

141. Способ по п. 140, в котором терапевтический агент представляет собой ингибитор контрольных точек или костимулирующую молекулу.
142. Способ лечения субъекта, включающий введение композиции, биспецифической молекулы или иммуноконъюгата по любому одному из предыдущих пунктов.
143. Антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), содержащее модифицированный константный домен тяжелой цепи, содержащий константный домен тяжелой цепи человеческого IgG, в котором аминокислота в положении 238 не является Р, а модифицированный константный домен тяжелой цепи обладает пониженной эффекторной функцией относительно того же константного домена тяжелой цепи IgG, где аминокислотой в положении 238 является пролин.
144. Антитело по п. 143, в котором константный домен тяжелой цепи IgG представляет собой константный домен тяжелой цепи IgG1 человека.
145. Антитело по п. 143 или 144, в котором аминокислота в положении 238 представляет собой К.
146. Антитело по любому одному из пп. 143-145, в котором модифицированная константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 198, где P238 не является Р (или не является ни Р, ни S) и является, напр., P238K.
147. Антитело по п. 146, в котором модифицированная константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 198, где P238 не является Р (или не является ни Р, ни S) и является, напр., P238K.
148. Антитело по п. 147, в котором модифицированная константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 198, где P238 не является Р (или не является ни Р, ни S) и является, напр., P238K.
149. Антитело по любому одному из пп. 143-148, в котором модифицированная константная область тяжелой цепи не содержит одну или несколько модификаций аминокислот, не являющихся P238, раскрытых в Патенте США No. 5,637,481 (содержание которого специально включено сюда посредством ссылки), напр., C220S, C226S и C229S.

150. Антитело по любому одному из пп. 143-149, в котором модифицированная константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 198.
151. Антитело по любому одному из пп. 143-150, где антитело является антигенсвязывающим фрагментом антитела (напр., Dab или scFv), который связан с модифицированной константной областью тяжелой цепи.
152. Антитело по любому одному из пп. 143-150, где антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, связанный с модифицированным константным доменом тяжелой цепи, и переменный домен легкой цепи, связанный с константным доменом легкой цепи.
153. Антитело по любому одному из пп. 143-152, где антитело представляет собой полноразмерное антитело (тяжелая и легкая цепь представляют собой полноразмерную тяжелую и легкую цепь соответственно).
154. Антитело по любому одному из пп. 143-153, в котором модифицированный константный домен тяжелой цепи не содержит одну или несколько других мутаций, которые снижают эффекторную функцию.
155. Антитело по п. 154, в котором модифицированный константный домен тяжелой цепи не содержит одну или несколько других раскрытых в настоящем документе мутаций, которые снижают эффекторную функцию.
156. Антитело по любому одному из пп. 143-153, в котором модифицированный константный домен тяжелой цепи содержит 1-3 другие мутации, которые снижают эффекторную функцию.
157. Антитело по п. 156, в котором модифицированный константный домен тяжелой цепи содержит 1-3 другие раскрытые в настоящем документе мутации, которые снижают эффекторную функцию.
158. Антитело по любому одному из пп. 143-157, в котором эффекторная функция антитела примерно такая же, как у антитела IgG2.
159. Антитело по любому одному из пп. 143-158, где антитело обладает более низкой аффинностью связывания с Fc γ R с низкой аффинностью относительно антитела с IgG1 дикого типа.

160. Антитело по п. 159, где антитело не имеет детектируемого связывания с Fc γ R с низкой аффинностью.
161. Антитело по п. 159 или 160, в котором Fc γ R с низкой аффинностью представляют собой hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158 и hCD16b-NA2.
162. Антитело по п. 161, где антитело не имеет детектируемого связывания (напр., при концентрации антитела 10 мкМ) в отношении аффинности потока Fc γ R hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158 или hCD16b-NA2.
163. Антитело по любому одному из пп. 143-162, где антитело связывается с CD64 Fc γ R (hFc γ RI) с высокой аффинностью с более высокой скоростью диссоциации (скоростью диссоциации) относительно антитела с константной областью IgG1 дикого типа.
164. Антитело по любому одному из пп. 143-163, в котором антитело не имеет детектируемого связывания (напр., при концентрации антитела 10 мкМ) с Fc γ R hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158 или hCD16b-NA2 с низкой аффинностью и имеет более высокую скорость диссоциации относительно антитела с константной областью дикого типа.
165. Антитело по любому одному из пп. 159-164, в котором аффинность связывания и скорость диссоциации с Fc γ R определяется с помощью Biacore.
166. Антитело по любому одному из пп. 143-165, где антитело обладает превосходящей термостабильностью относительно антитела с константной областью IgG1 дикого типа.
167. Антитело по любому одному из пп. 143-166, где антитело обладает пониженной гетерогенностью относительно антитела с константной областью IgG1 дикого типа.
168. Антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, содержащую мутации L234A, L235E и G337A, но не содержащее мутацию в A330 и/или P331, которая снижает эффекторную функцию (напр., не содержит A330S и/или P331S), где антитело обладает пониженной эффекторной функцией (пониженной ADCC и необязательно пониженной CDC) относительно того же антитела без этих мутаций.
169. Антитело по п. 168, которое связывается с ингибирующим рецептором на иммунной клетке, напр., Т-клетке.

170. Антитело по пп. 168 или 169, которое связывается с пониженной аффинностью с FcγR hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158, hCD16b-NA2 и hCD64 относительно того же антитела без этих мутаций.

171. Антитело по любому из пп. 168-170, в котором константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 234 или 248.

172. Антитело по любому одному из пп. 168-171, в котором константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234 или 248, включающую 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислотную замену (напр., консервативную аминокислотную замену), где аминокислотные замены значительно не увеличивают связывание с одним или несколькими FcγR.

173. Антитело по любому из пп. 168-172, в котором константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234 или 248, включая С-концевой лизин или нет.

174. Антитело по любому из пп. 168-172, в котором константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236, 249, 252, 253, 259 или 260, включая С-концевой лизин или нет.

175. Антитело по любому из пп. 168-174, где антитело представляет собой полноразмерное антитело (или содержит полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь) с С-концевым лизином или без него.

176. Антитело по любому из пп. 168-175, где антитело является антагонистом ингибитора контрольных точек или агонистом стимулятора контрольных точек.

177. Антитело по любому из пп. 168-176, где антитело не является антителом, раскрытым в WO 2018/013818.

178. Антитело по любому из пп. 168-177, где антитело не связывается с человеческим TIM3.

179. Слитый белок, содержащий константную область тяжелой цепи, содержащую мутации L234A, L235E и G337A, но не содержащий мутацию в A330 и/или P331, которая снижает эффекторную функцию (напр., не содержит A330S и/или P331S), где антитело имеет пониженную эффекторную

функцию (пониженную ADCC и необязательно пониженную CDC) относительно того же антитела без этих мутаций.

180. Слитый белок по п. 179, который связывается с пониженной аффинностью с FcγR hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158, hCD16b-NA2 и hCD64 относительно того же антитела без этих мутаций.

181. Слитый белок по п. 179 или 180, в котором константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 234 или 248.

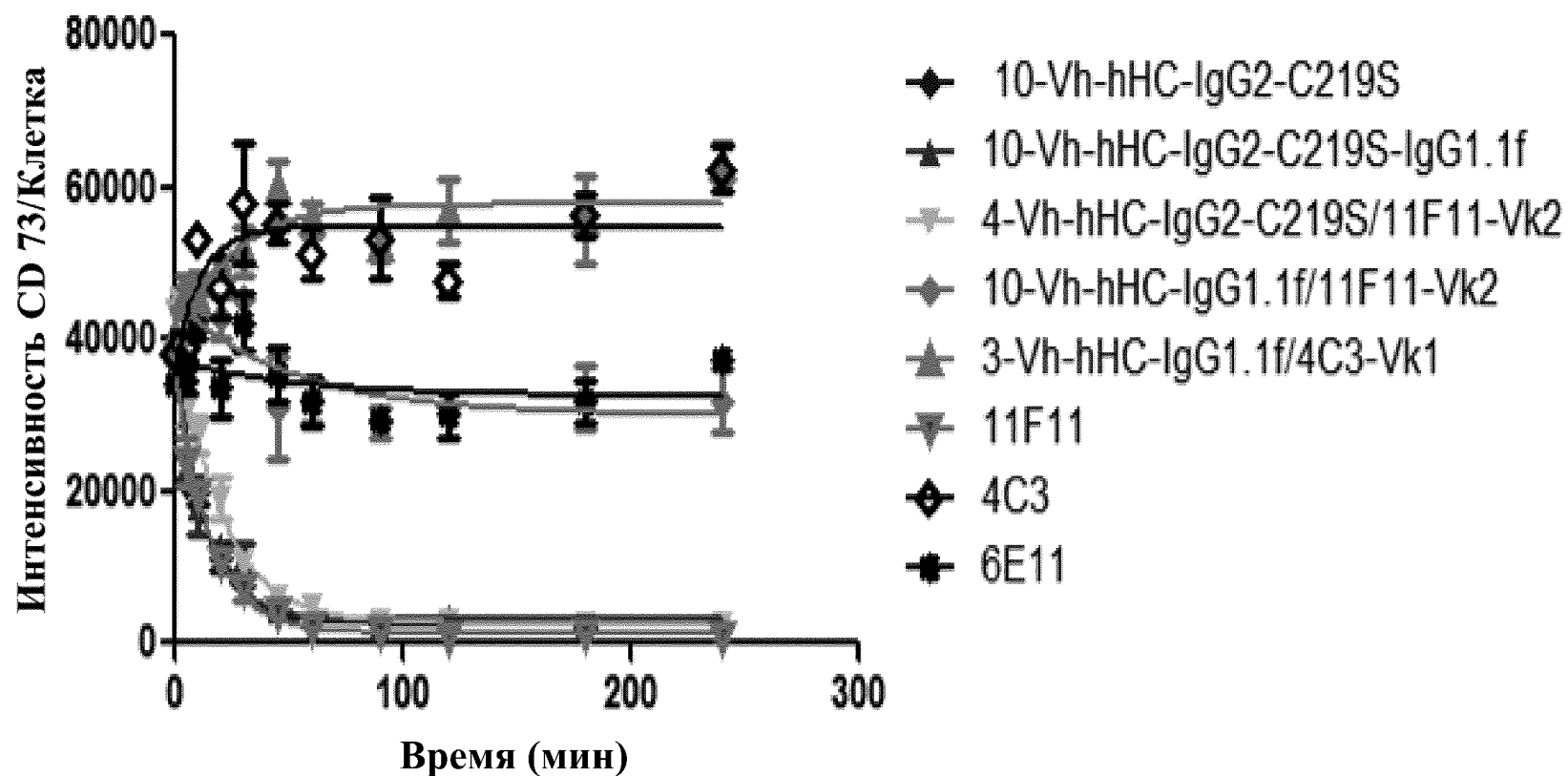
182. Слитый белок по любому из пп. 179-181, в котором константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234 или 248, включая 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислотную замену (напр., консервативную аминокислотную замену), где аминокислотные замены значительно не увеличивают связывание с одним или несколькими FcγR.

183. Слитый белок по любому из пп. 179-182, в котором константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234 или 248, включая С-концевой лизин или нет.

184. Антитело по любому из пп. 179-183, в котором константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236, 249, 252, 253, 259 или 260, включая С-концевой лизин или нет.

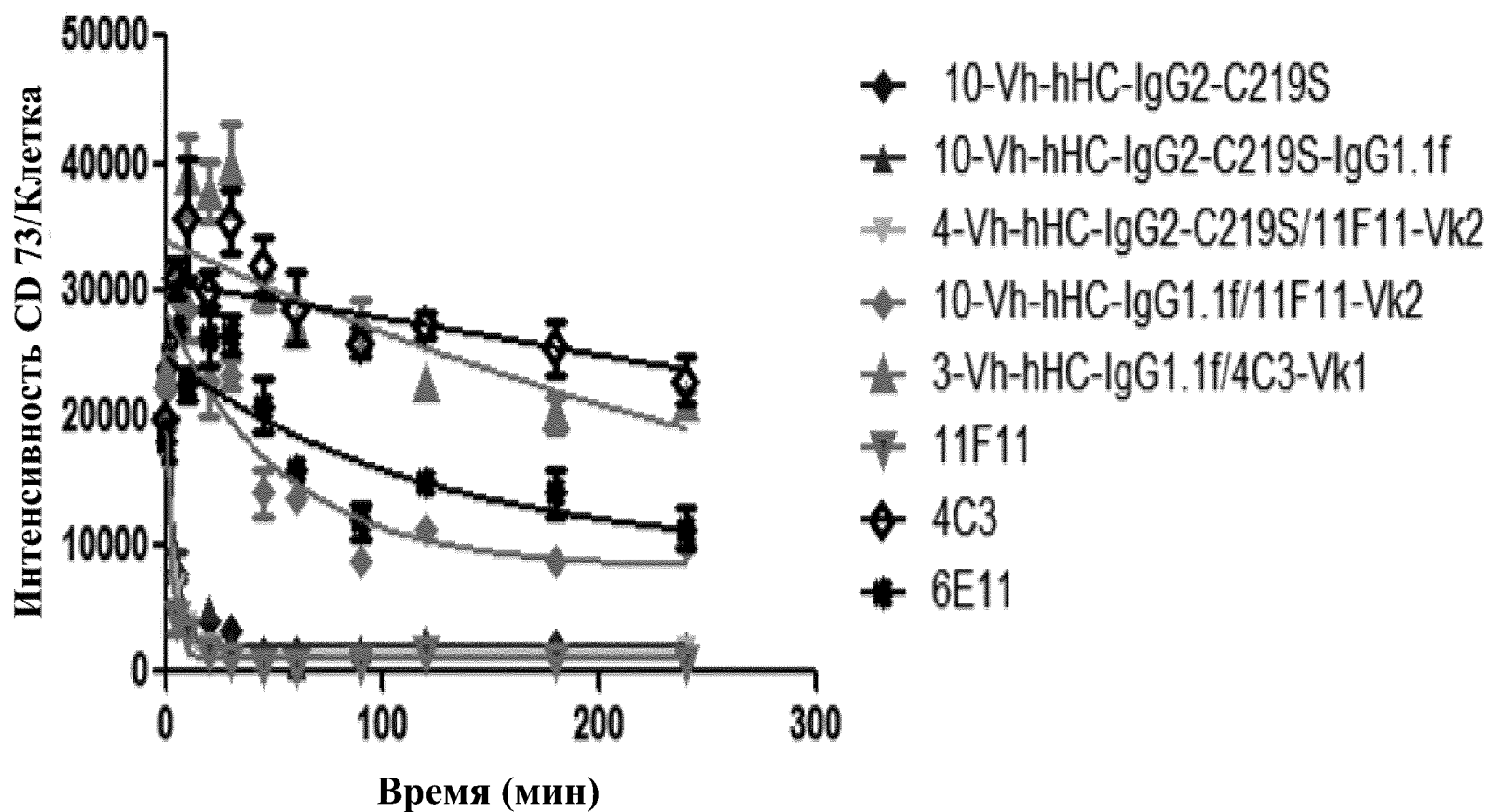
185. Антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в Таблице Последовательностей, или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична ей.

Опосредованная Аб Рецепторная Интернализация (клетки H2228)



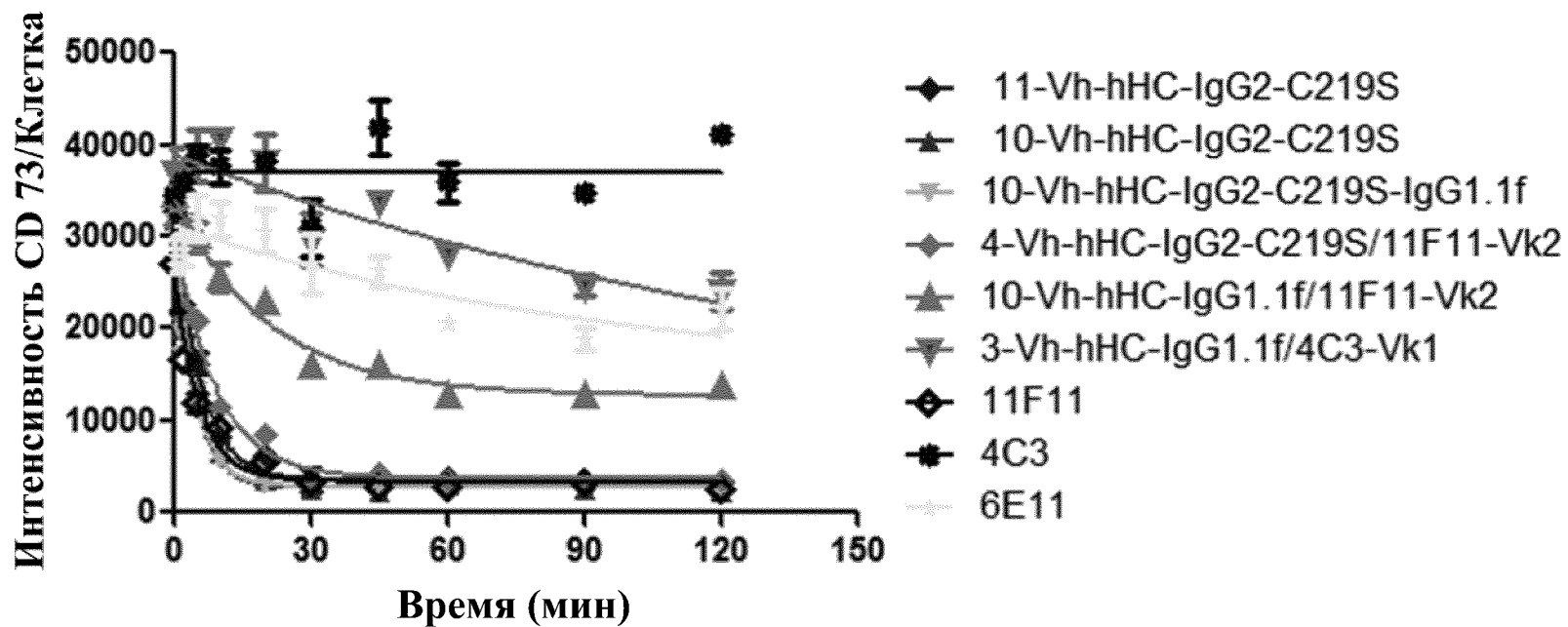
ФИГ. 1А

Опосредованная Ab Рецепторная Интернализация (клетки HCC15)



ФИГ. 1В

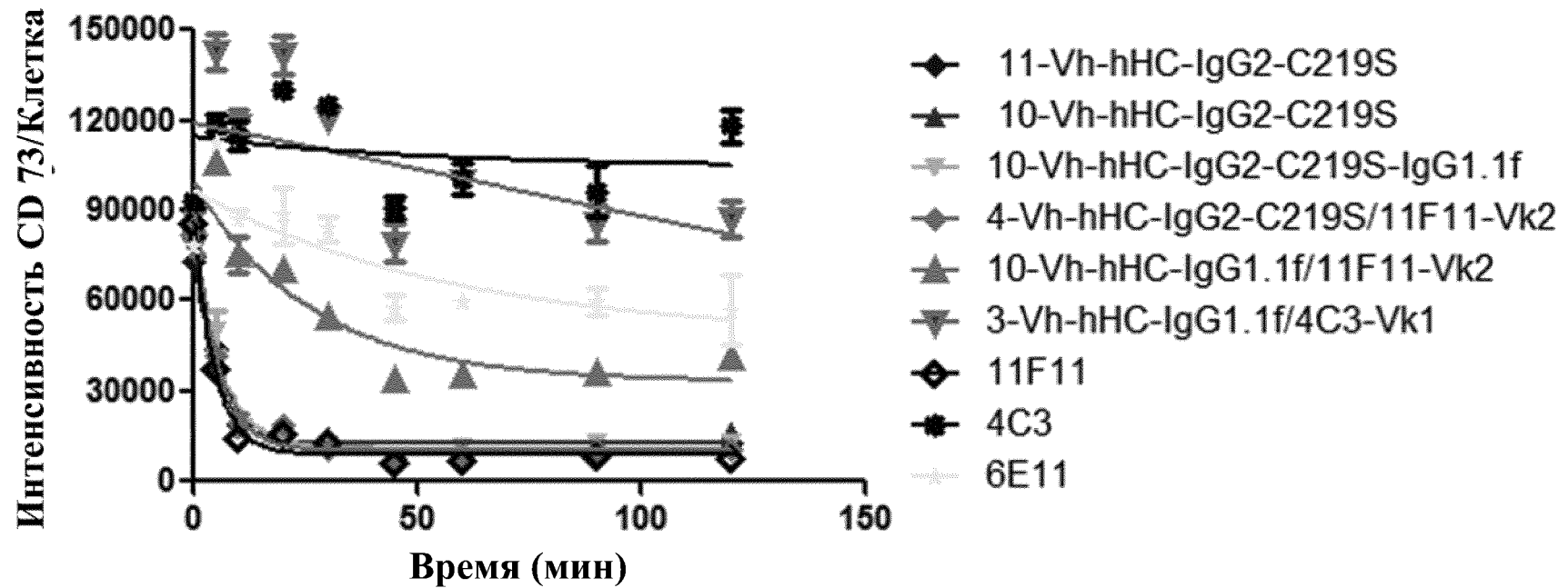
Опосредованная Ab Рецепторная Интернализация (клетки Calu-6)



Антитела @ 2мкг/мл

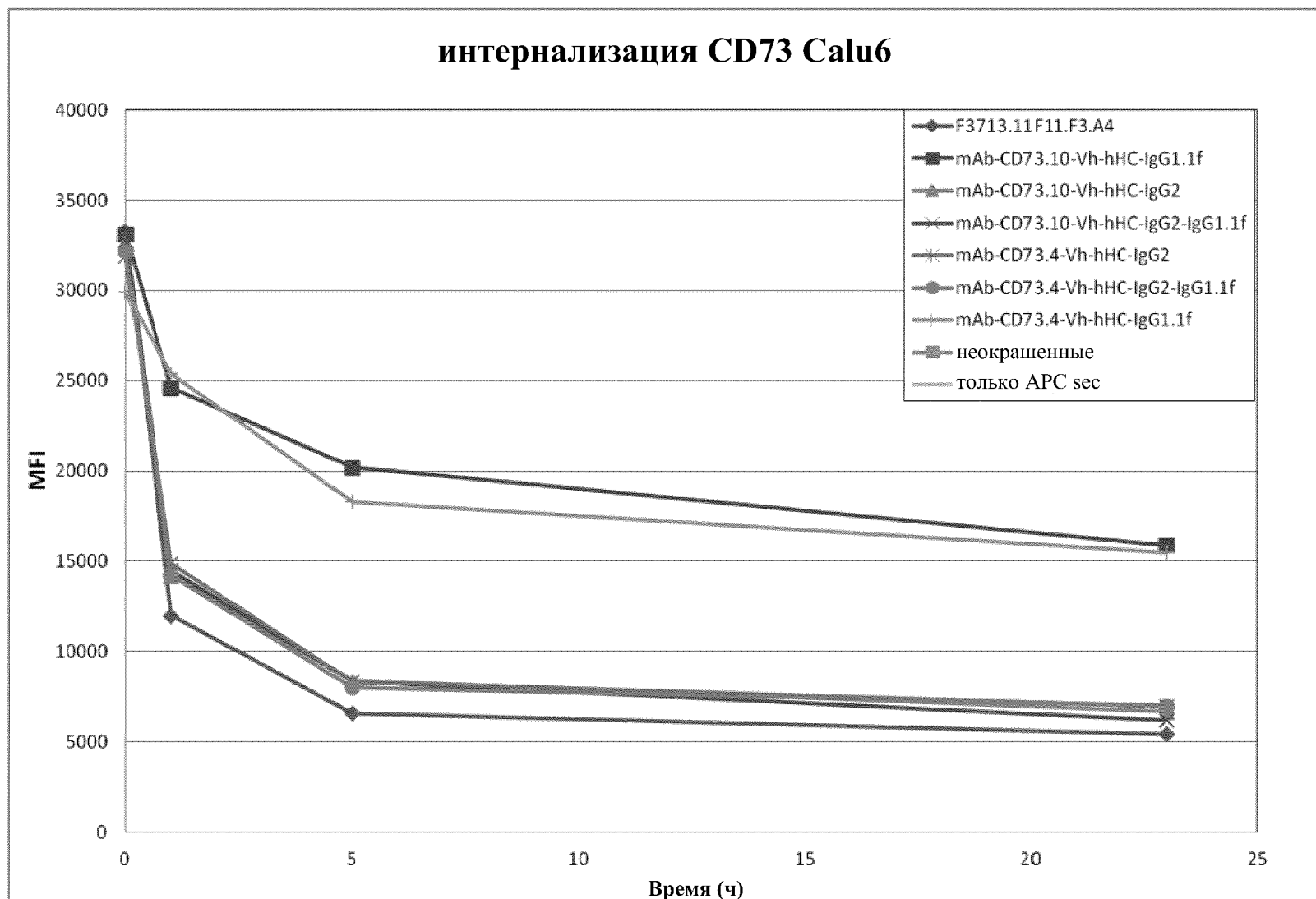
ФИГ. 1С

Опосредованная Ab Рецепторная Интернализация (клетки NCI-H2030)



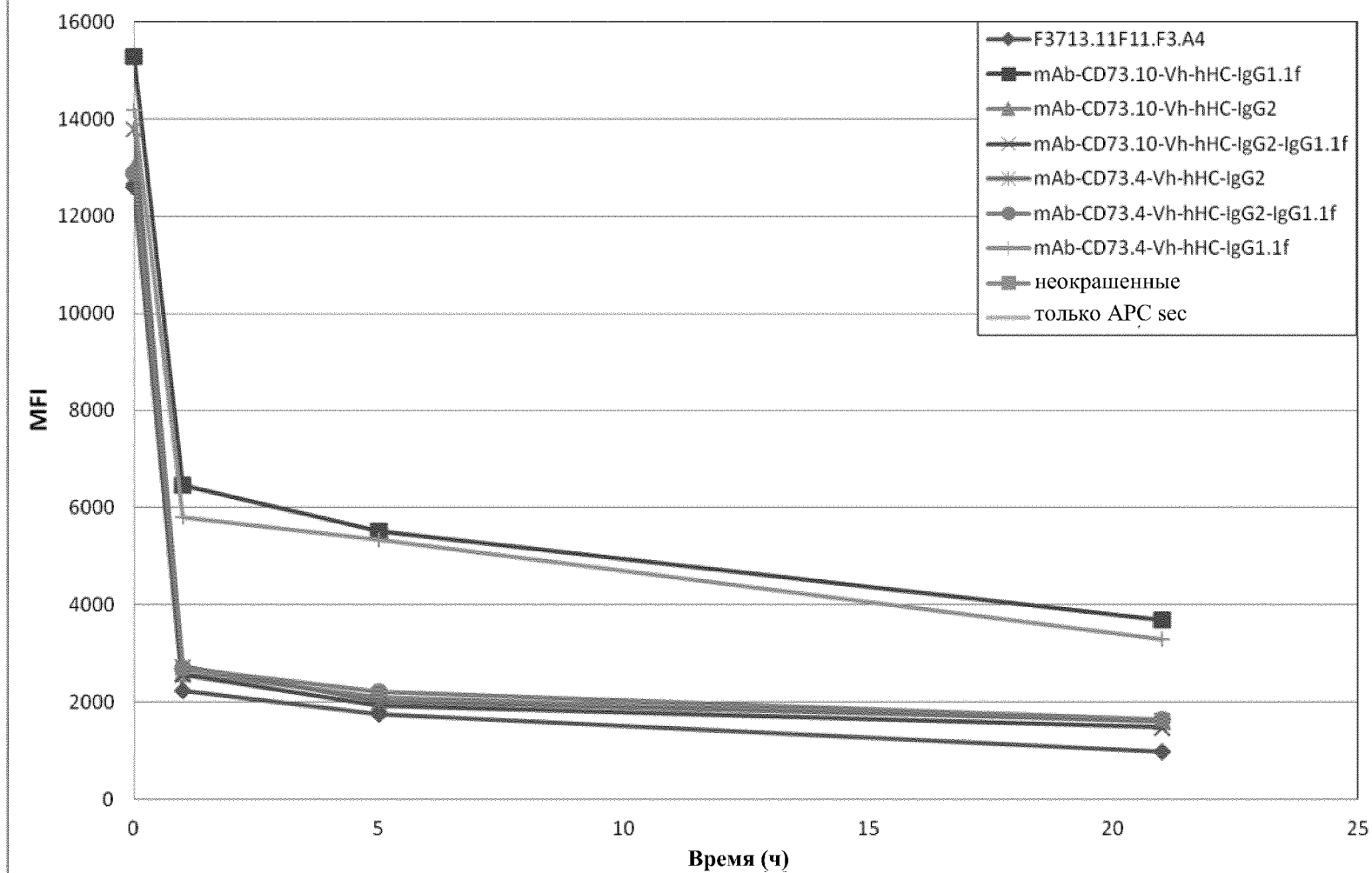
Антитела @ 2мкг/мл

ФИГ. 1D



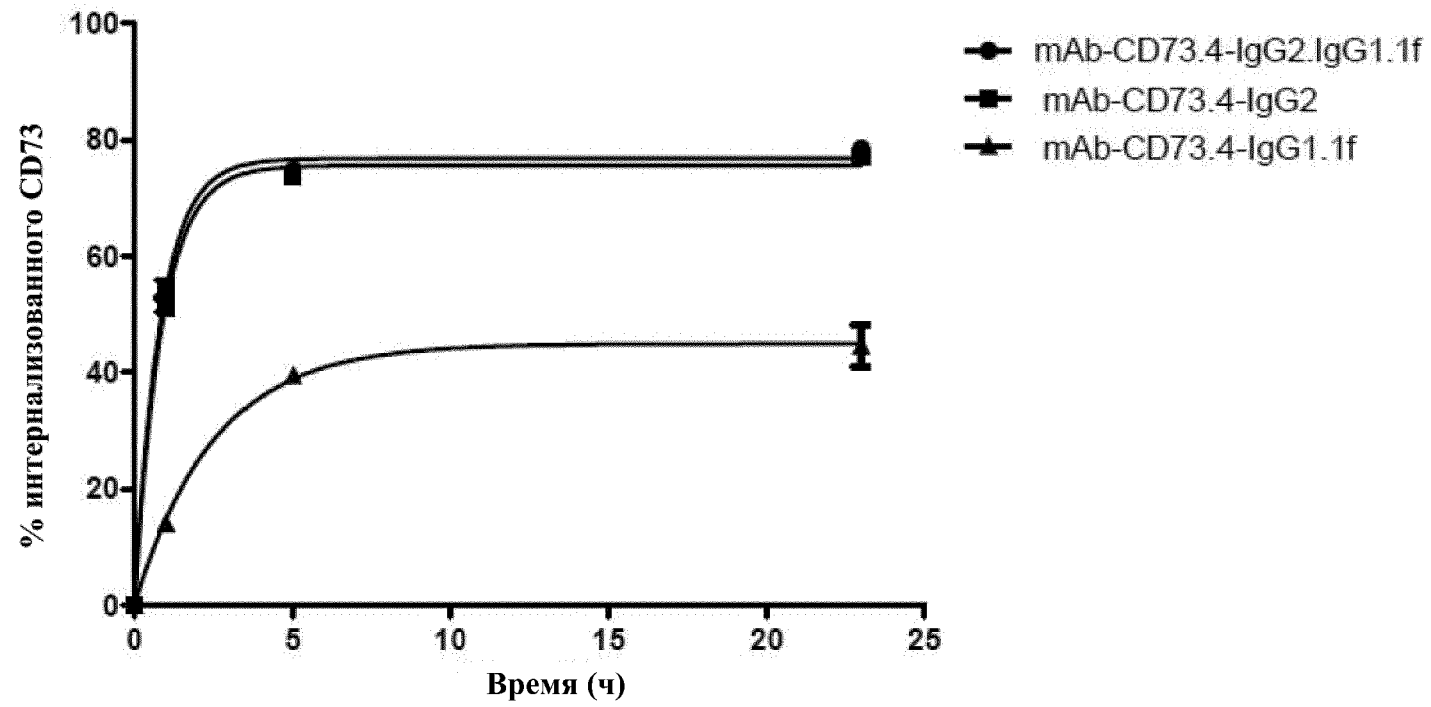
ФИГ. 1Е

интернализация CD73 NCI-H292 (без отмывки)

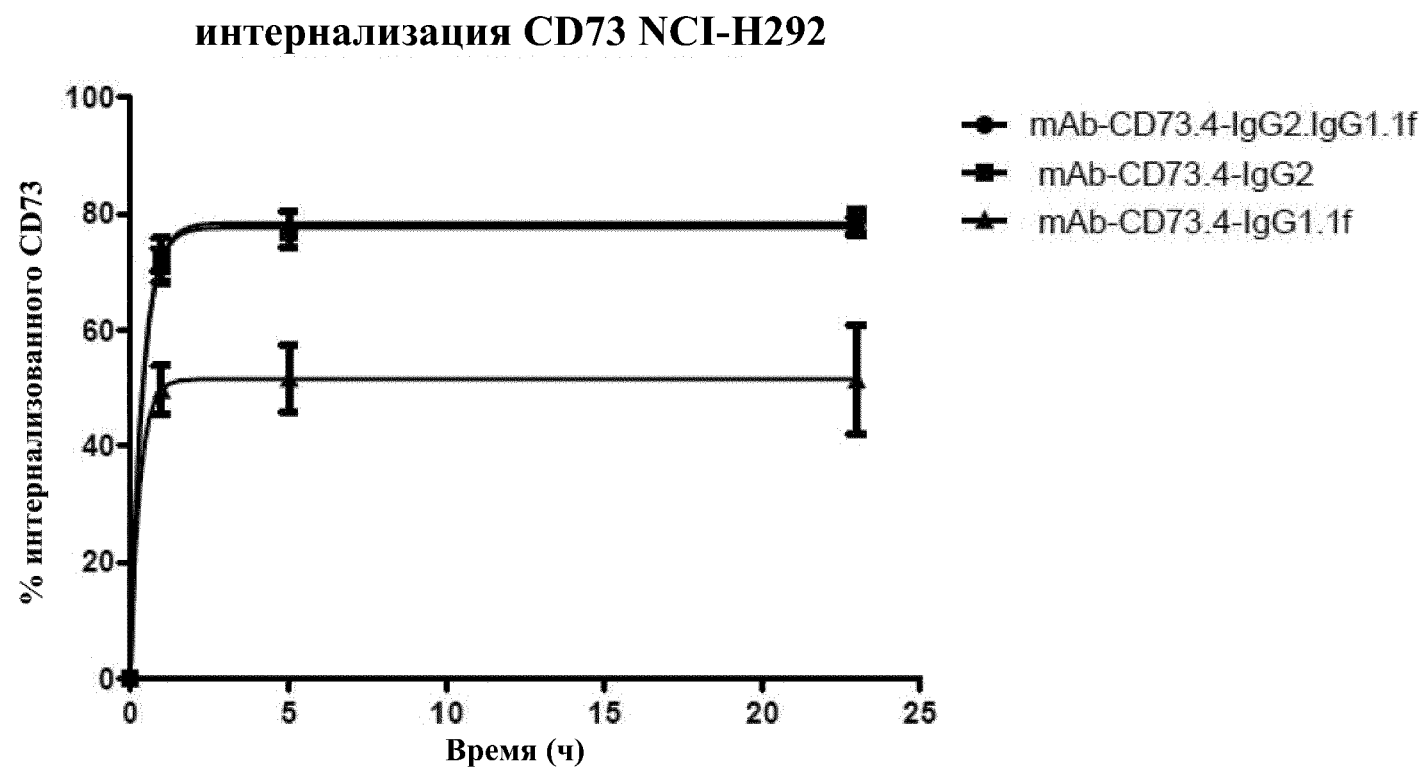


ФИГ. 1F

интернализация CD73 Calu6

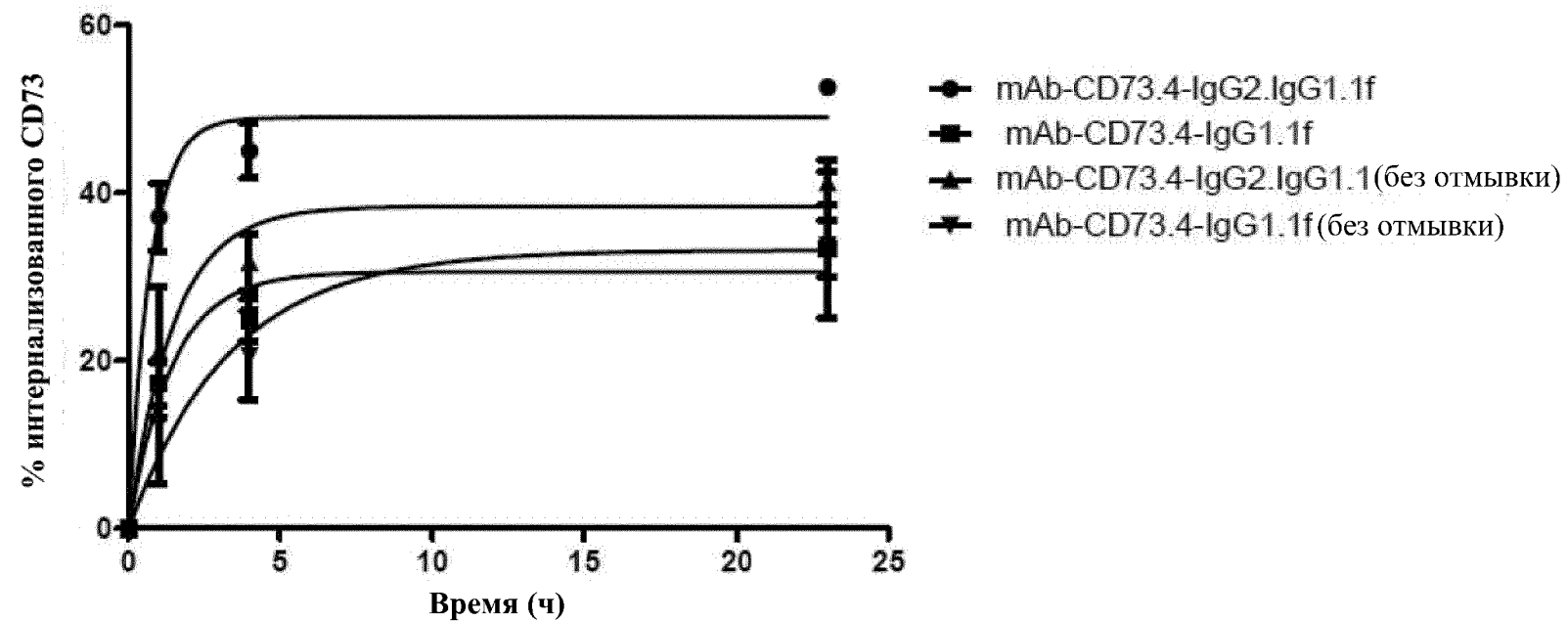


ФИГ. 1G

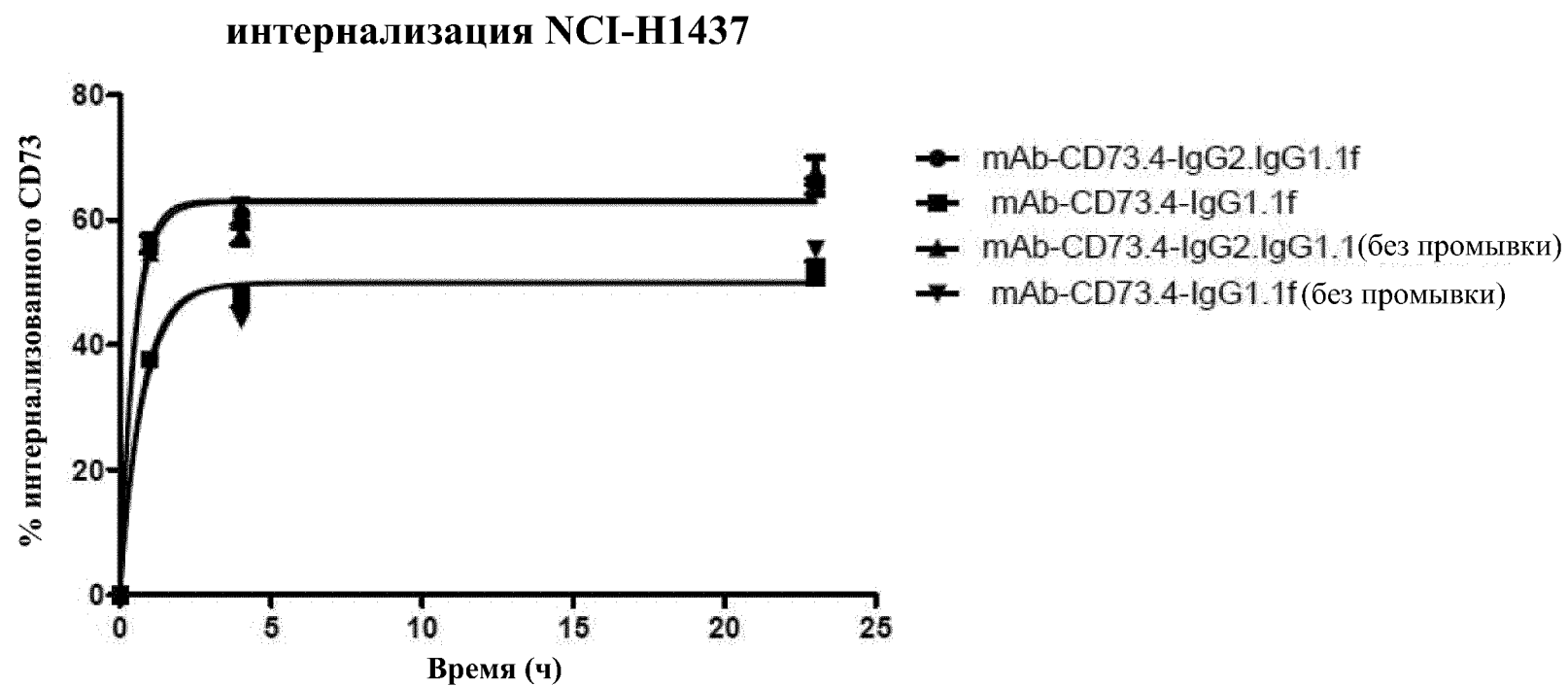


ФИГ. 1Н

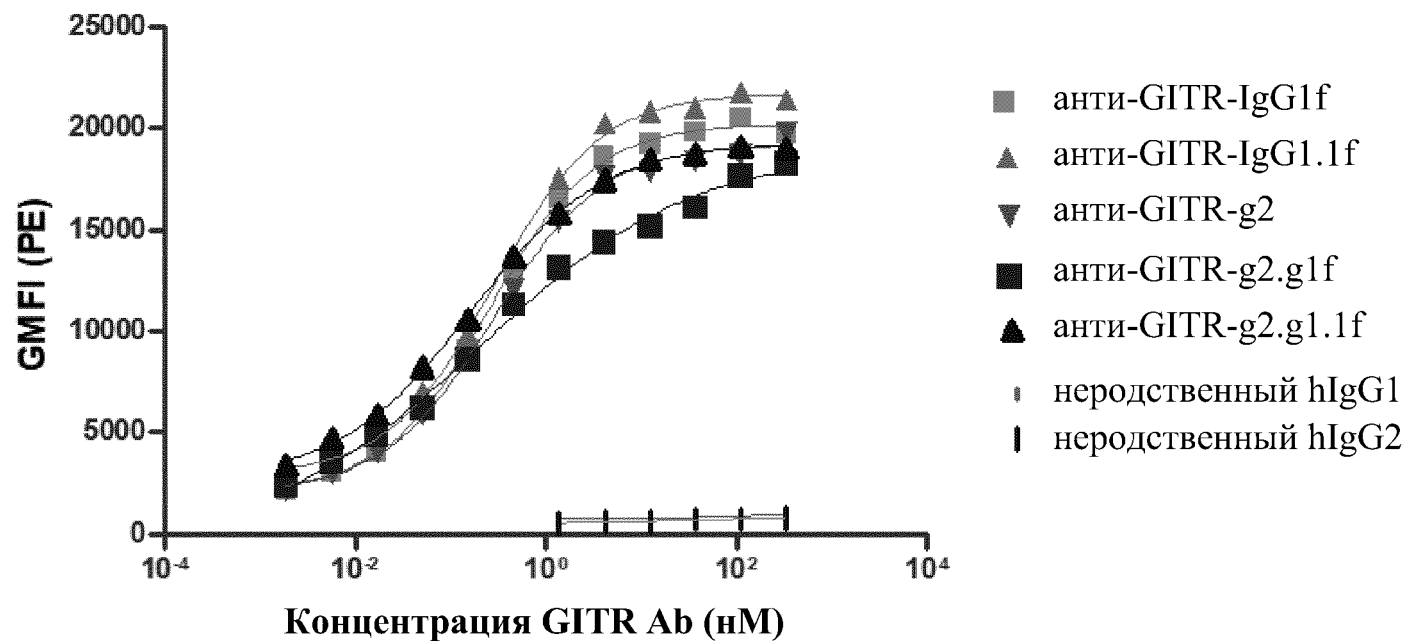
интернализация SNU-C1



ФИГ. 11



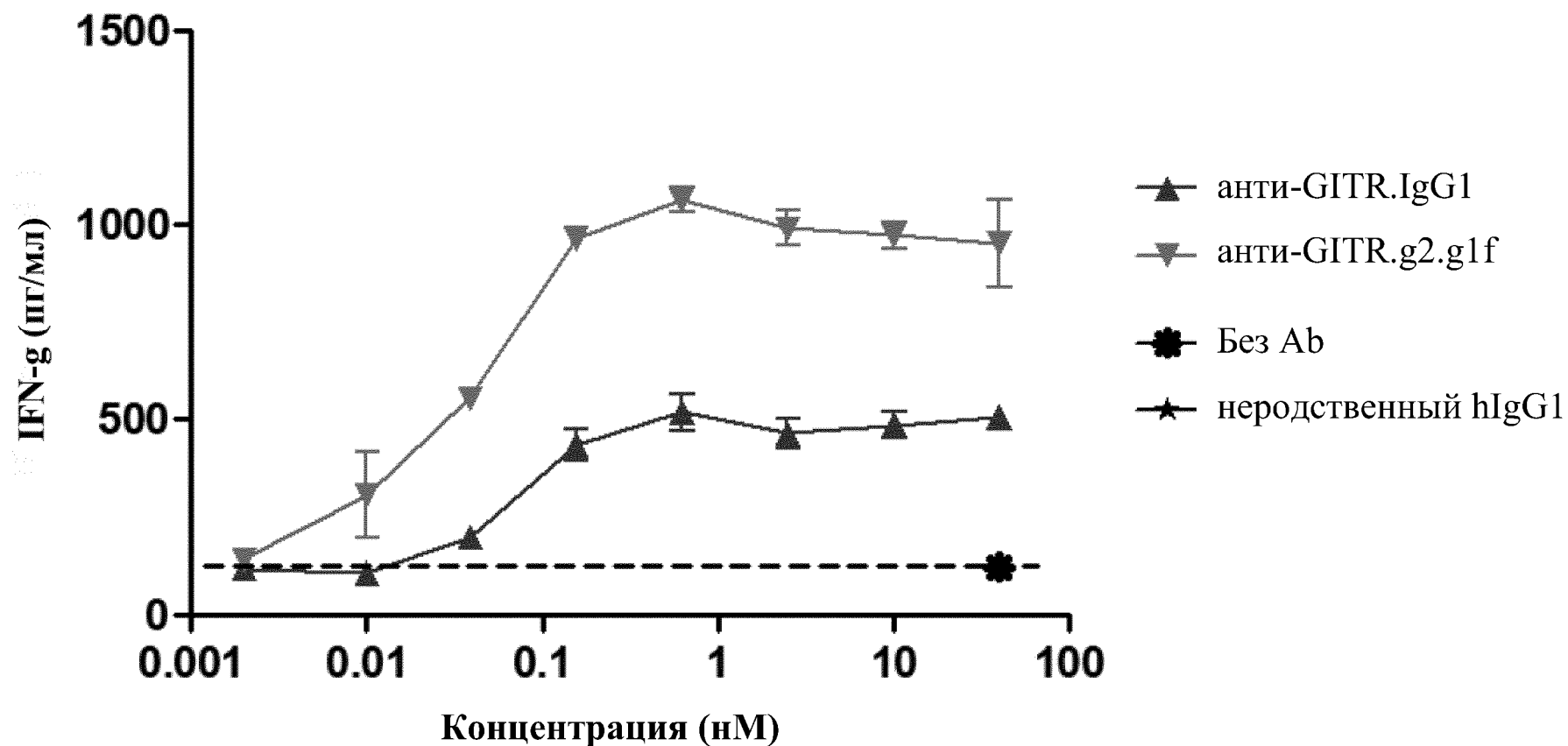
ФИГ. 1J



	EC50
анти-GITR-IgG1f	0.2566
анти-GITR-IgG1.1f	0.2865
анти-GITR-g2	0.2773
анти-GITR-g2.g1f	0.2034
анти-GITR-g2.g1.1f	0.1628
неродственный hIgG1	131.8
неродственный hIgG2	6.725

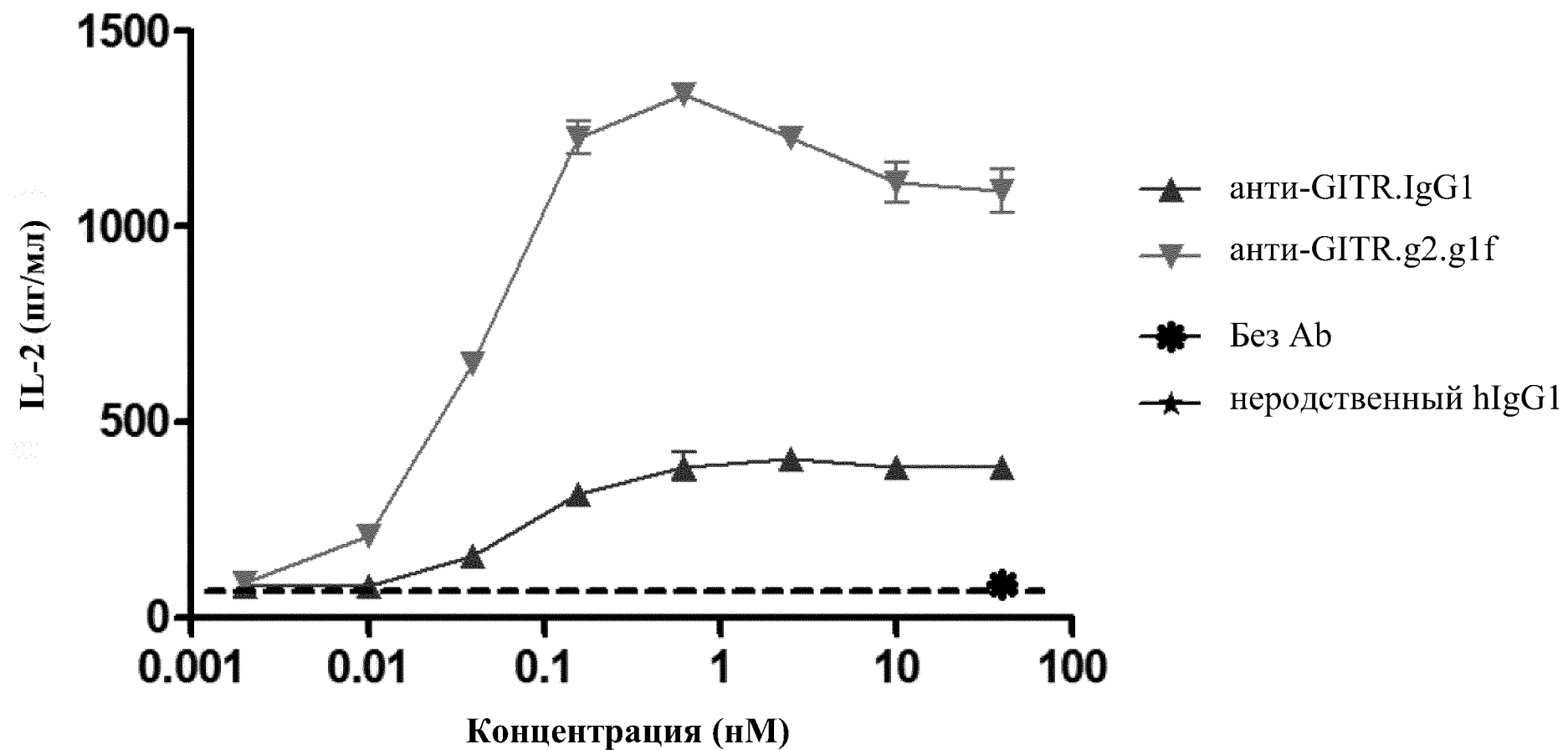
ФИГ. 2

**Аб к GITR на секрецию IFN-g CD4 Т-клетками, стимулированными
клетками CHO, экспрессирующими ОКТ3 – Донор #2**



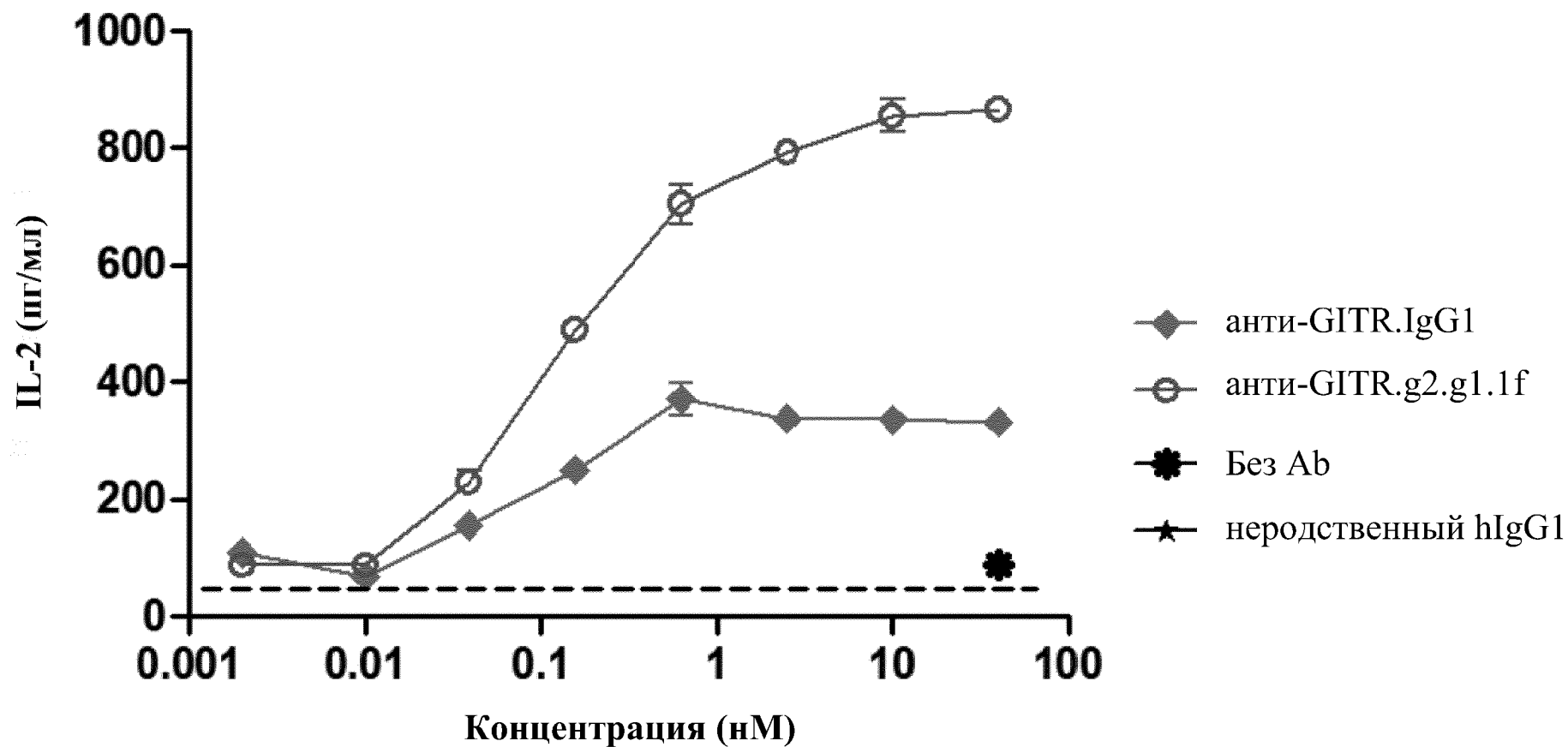
ФИГ. 3А

Аб к GITR на секрецию IL-2 CD4 Т-клетками, стимулированными клетками CHO, экспрессирующими ОКТ3 – Донор #3

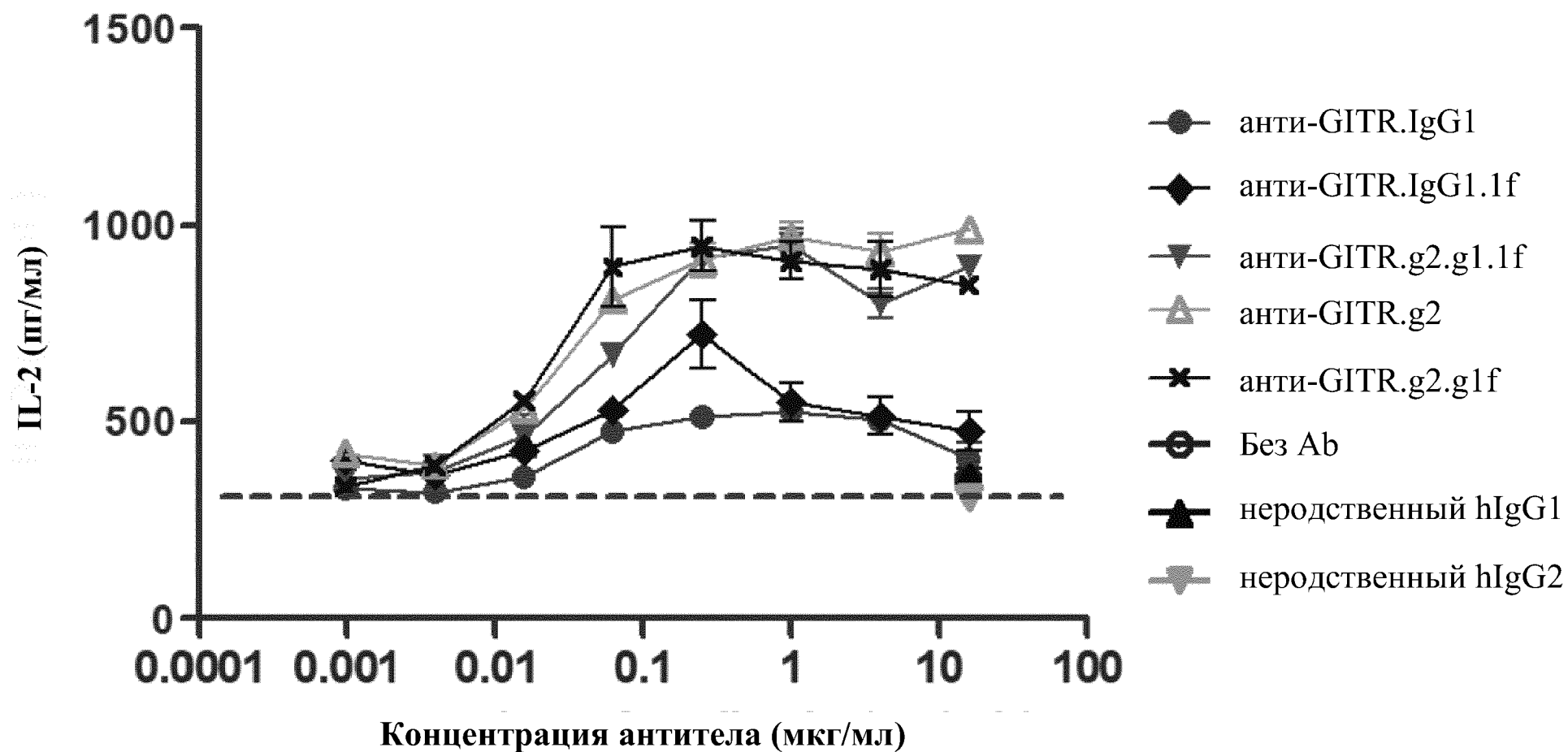


ФИГ. 3В

Аб к GITR на секрецию IL-2 CD4 Т-клетками, стимулированными клетками CHO, экспрессирующими ОКТ3 – Донор #3

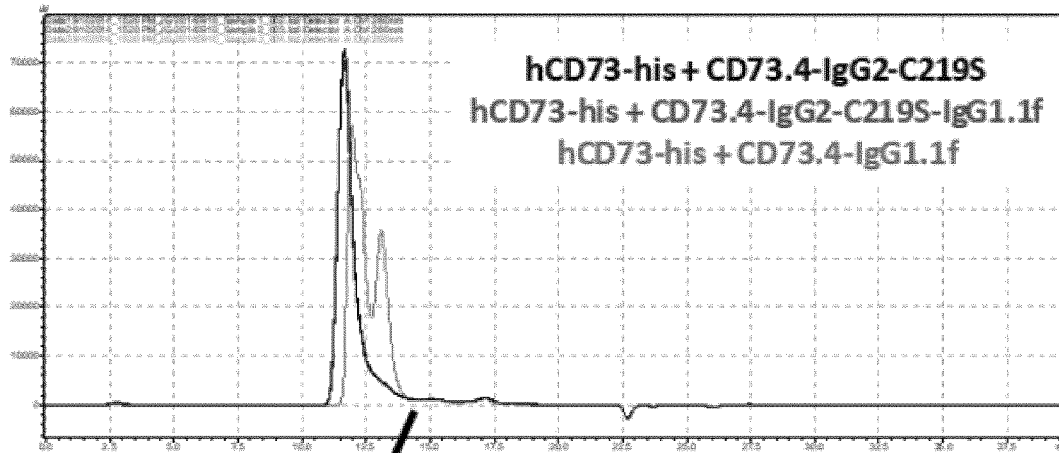


ФИГ. 3С

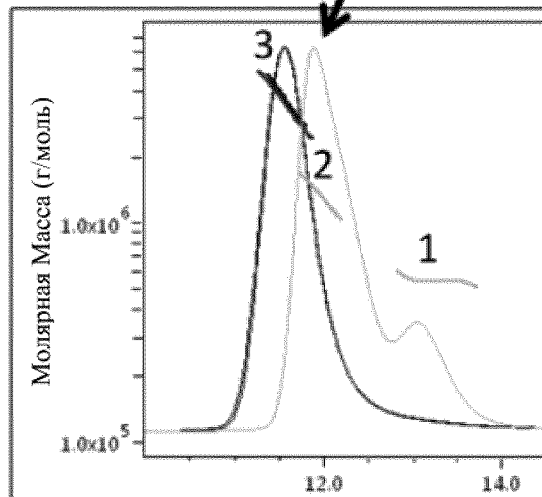


ФИГ. 4

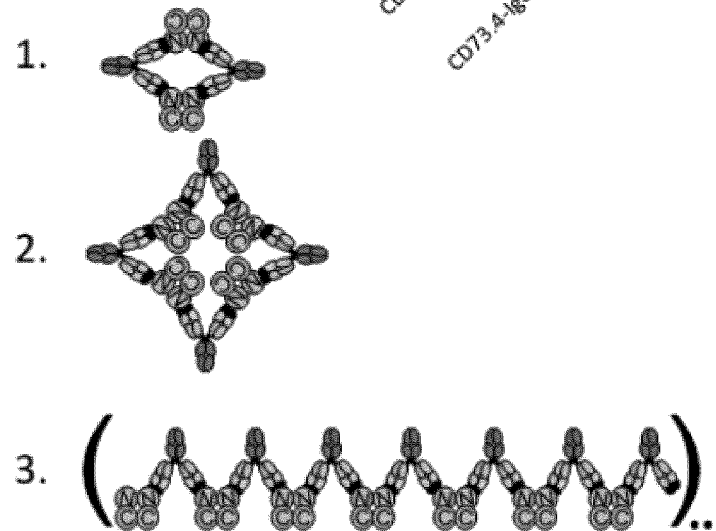
ФИГ. 5А



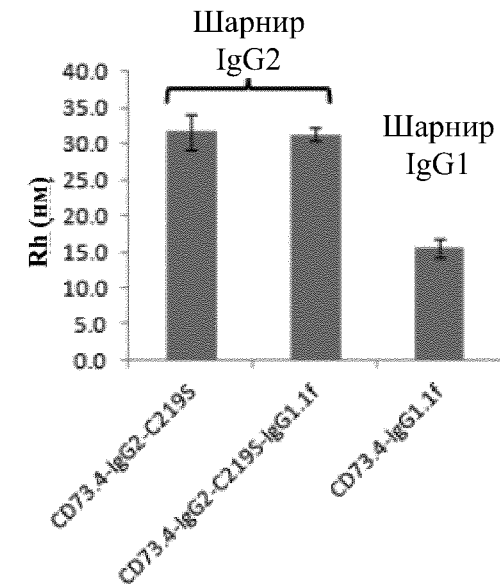
ФИГ. 5С



ФИГ. 5D



ФИГ. 5В



Данные SEC-MALS для комплексов CD73/mAb

						UV время элюирования (мин)				интегрирование SEC UV в %				MM (кДа)			
Мишень	mAb	Мол. соотн. миш. (мкМ)	[mAb] (мкМ)		Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	
	CD73.10-IgG1.1f	0:1	4		~2.0	~14.0	~17.3		0.3	0.3	99.4		n/a	62	140		
	CD73.10-IgG2-C219S	0:1	4		~2.0	~17.5			0.1	99.5			73	150			
	CD73.3-IgG1.1f	0:1	4		~16.3				100.0				150				
	11F11-Fab	0:1	8		~2.0	~17.7	~20.2		0.8	0.6	98.7		n/a	19	47		
hCD73-his		1:0	4		~17.1	~18.4			2.8	97.2			280	120			
N-hCD73-his		1:0	8		~19.3				100.0				38				
hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	1:1	4	4	~11.7	~12.7	~16.9		34.2	67.2	3.0		1100	540	180		
hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	4	4	~10.3	~11.1			6.4	93.3			110000	3400			
hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	1:1	4	4	~12.0	~13.0	~14.8		17.5	78.3	4.0		960	530	260		
hCD73-his	11F11-Fab	1:2	4	8	~12.6	~14.7	~16.8	~20.1	0.9	90.7	0.8	7.7	300	310	85	40	
N-hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	2:1	8	4	~14.6	~17.1			86.5	13.5			210	140			
N-hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	2:1	8	4	~14.7	~17.3			87.1	12.9			210	150			
N-hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	2:1	8	4	~15.3	~16.2	~19.3		6.4	68.7	24.9		170	160	42		
N-hCD73-his	11F11-Fab	1:1	8	8	~17.4	~20.0			95.3	4.7			84	44			
hCD73		1:0	2.5	0	~16.9				100.0				120				
hCD73	CD73.4-hybrid	1:0.25	2.5	0.625	~11.8	~13.4	~17.1		42.0	21.6	36.4		1200	520	120		
hCD73	CD73.4-hybrid	1:0.5	2.5	1.25	~11.7	~13.4	~17.1		71.9	15.8	13.4		1900	540	130		
hCD73	CD73.4-hybrid	1:1	2.5	2.5	~11.5	~13.4	~17.1		95.3	1.9	2.8		3300	1000	530		
hCD73	CD73.4-hybrid	1:2	2.5	5	~11.7	~13.4	~15.3	~17.1	52.5	17.7	0.6	29.3	1700	500	220	140	
hCD73	CD73.4-hybrid	1:4	2.5	10	~11.7	~13.4	~15.3	~17.1	24.1	16.2	1.2	58.6	1300	500	200	140	
hCD73		1:0	2.5	0	~16.9	~18.2			97.6	2.4			120	73			
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.25	2.5	0.625	~12.3	~13.1	~17.1		11.8	49.5	38.6		830	530	120		
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.5	2.5	1.25	~12.3	~13.1	~17.1		31.1	54.8	3.3	10.7	890	540	120	81	
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~12.1	~12.3	~13.1	~17.0	55.2	44.5	2.1	2.2	1100	560	280	160	
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:2	2.5	5	~12.3	~13.1	~15.3	~17.0	22.3	44.1	2.8	30.7	910	530	210	140	
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:4	2.5	10	~12.3	~13.2	~15.3	~17.0	9.1	31.0	2.4	57.4	810	510	200	140	
N-hCD73	CD73.4-hybrid	1:1	5	2.5	~13.9	~14.7	~15.9	~17.0	0.7	88.3	8.1	2.8	390	210	180	150	
N-hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	5	2.5	~13.4	~14.7			1.7	98.3			360	210			
	CD73.4-hybrid	0:1	0	5	~15.9	~16.9			0.4	99.6			290	140			
	CD73.4-IgG1.1f	0:1	0	5	~14.2	~15.9	~17.1		0.6	1.2	98.2		81	120	140		
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	~11.5	~13.4	~17.3		95.0	2.1	2.8		3400	970	480		
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~11.5	~13.4	~17.3		94.7	2.3	3.0		3600	1100	580		
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~11.7	~13.0	~15.1	~17.0	60.0	35.3	2.3	2.5	1300	550	270	160	
hCD73	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	~11.8	~16.9			96.2	3.2			2000	310			
hCD73	CD73.10-IgG2CS-1.1	1:1	2.5	2.5	~11.8	~16.9			96.6	2.5	0.9		2000	320	390		
hCD73	CD73.10-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~12.1	~13.0	~16.5		35.1	62.1	2.7		1000	530	170		
hCD73		1:0	2.5	0	~17.3	~18.4			97.2	2.8			120	60			
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	5	5	~11.5	~13.4	~17.3		93.9	2.6	3.5		4800	1300	740		
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	1	1	~11.5	~13.4	~15.0	~17.3	84.4	7.6	2.5	5.4	2900	660	460	240	

* Молярные концентрации определены как мономер N-hCD73, мономер 11F11-Fab, димер hCD73-his и (бивалентное) mAb

ФИГ. 6

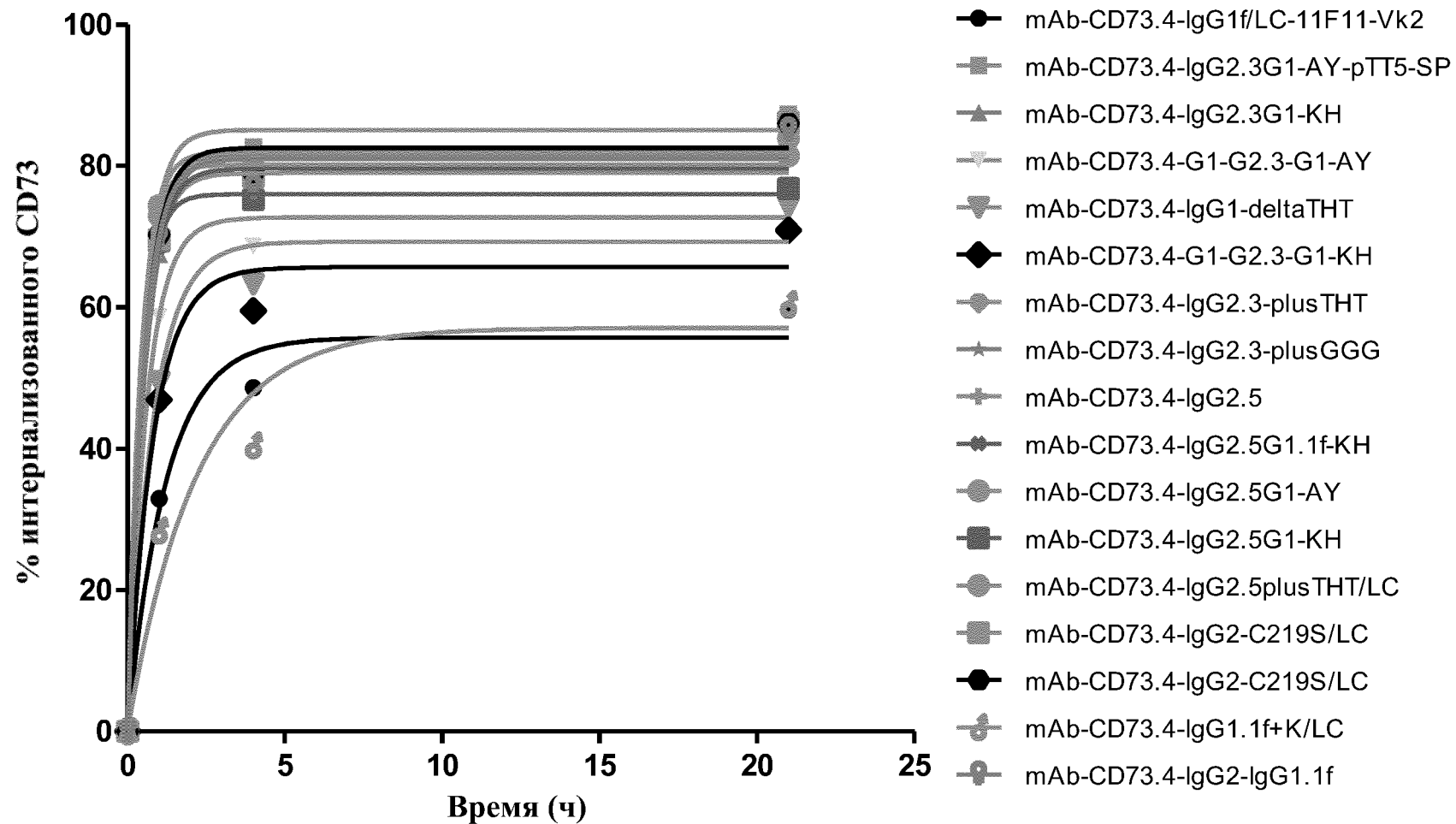
Данные DLS для комплексов CD73/mAb

Мишень	mAb	Мол. соотн.	миш. (мкМ)	[mAb] (мкМ)	DLS					
					Rh	Rh SD	%Pd	%Pd SD	%Масс	%Масс SD
	CD73.10-IgG1.1f	0:1		4	5.0	0.6	11.0	6.0	100.0	0.0
	CD73.10-IgG2-C219S	0:1		4	5.2	0.1	11.9	2.3	100.0	0.0
	CD73.3-IgG1.1f	0:1		4	5.1	0.5	11.6	6.9	100.0	0.0
	11F11-Fab	0:1		8	3.4	0.2	22.0	5.3	100.0	0.1
hCD73-his		1:0	4		4.3	0.3	10.6	5.2	99.8	0.2
N-hCD73-his		1:0	8		2.3	0.2	19.3	12.3	99.9	0.2
hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	1:1	4	4	12.8	0.7	32.4	6.7	100.0	0.0
hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	4	4	2.9	1.5	7.5	0.8	73.9	11.5
hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	1:1	4	4	10.8	0.1	28.2	0.6	100.0	0.0
hCD73-his	11F11-Fab	1:2	4	8	6.4	0.1	15.1	4.3	100.0	0.0
N-hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	2:1	8	4	6.6	0.3	15.3	6.5	100.0	0.0
N-hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	2:1	8	4	6.5	0.2	15.7	5.7	100.0	0.1
N-hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	2:1	8	4	5.8	0.3	12.8	5.3	100.0	0.0
N-hCD73-his	11F11-Fab	1:1	8	8	4.2	0.1	12.6	4.7	100.0	0.0
hCD73		1:0	2.5	0	4.5	0.1	12.3	4.3	99.9	0.2
hCD73	CD73.4-hybrid	1:0.25	2.5	0.625	13.2	1.7	46.5	5.9	99.9	0.1
hCD73	CD73.4-hybrid	1:0.5	2.5	1.25	17.5	1.0	31.7	8.8	62.6	25.8
hCD73	CD73.4-hybrid	1:1	2.5	2.5	29.9	1.0	25.1	2.1	22.3	4.9
hCD73	CD73.4-hybrid	1:2	2.5	5	14.4	0.1	31.3	5.5	68.7	25.8
hCD73	CD73.4-hybrid	1:4	2.5	10	11.4	0.9	42.9	3.5	90.2	17.5
hCD73		1:0	2.5	0	4.7	0.1	18.6	3.3	99.8	0.1
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.25	2.5	0.625	10.4	1.5	38.6	15.9	81.3	37.1
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.5	2.5	1.25	12.9	0.6	35.5	5.4	88.3	23.2
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	14.7	0.5	34.3	3.9	100.0	0.0
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:2	2.5	5	11.6	0.4	24.9	8.5	65.0	32.5
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:4	2.5	10	8.1	4.0	33.0	16.9	84.2	31.7
N-hCD73	CD73.4-hybrid	1:1	5	2.5	6.7	0.3	13.9	7.0	100.0	0.0
N-hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	5	2.5	6.5	0.1	7.4	3.2	100.0	0.0
	CD73.4-hybrid	0:1	0	5	5.4	0.2	15.7	5.7	99.9	0.1
	CD73.4-IgG1.1f	0:1	0	5	5.3	0.4	13.6	7.9	100.0	0.0
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	31.7	2.4	31.6	11.4	19.3	12.2
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	31.2	0.9	30.8	3.8	17.5	11.4
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	15.6	1.2	32.7	8.0	100.0	0.0
hCD73	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	23.9	1.2	26.7	4.4	36.3	5.3
hCD73	CD73.10-IgG2C5-1.1	1:1	2.5	2.5	25.6	2.3	30.1	8.8	35.9	9.1
hCD73	CD73.10-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	13.5	1.2	31.6	12.0	83.2	31.5
hCD73		1:0	2.5	0	4.2	0.8	24.4	12.8	99.1	0.7
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	5	5	35.3	3.8	35.2	13.9	6.7	4.4
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	1	1	25.5	3.2	32.9	2.9	60.7	27.5

* Молярные концентрации определены как мономер N-hCD73, мономер 11F11-Fab, димер hCD73-his и (бивалентное) mAb

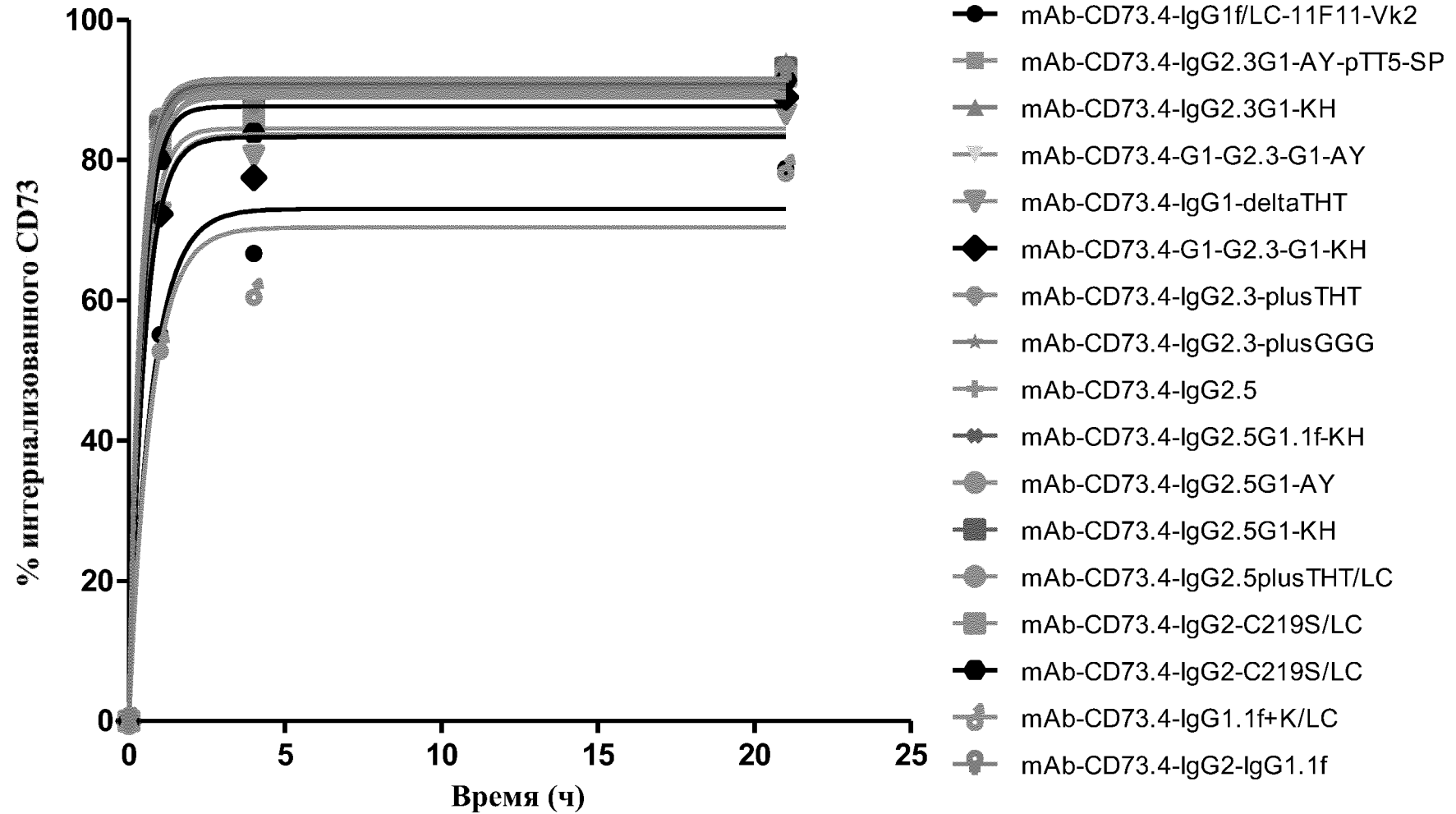
ФИГ. 7

интернализация Calu6

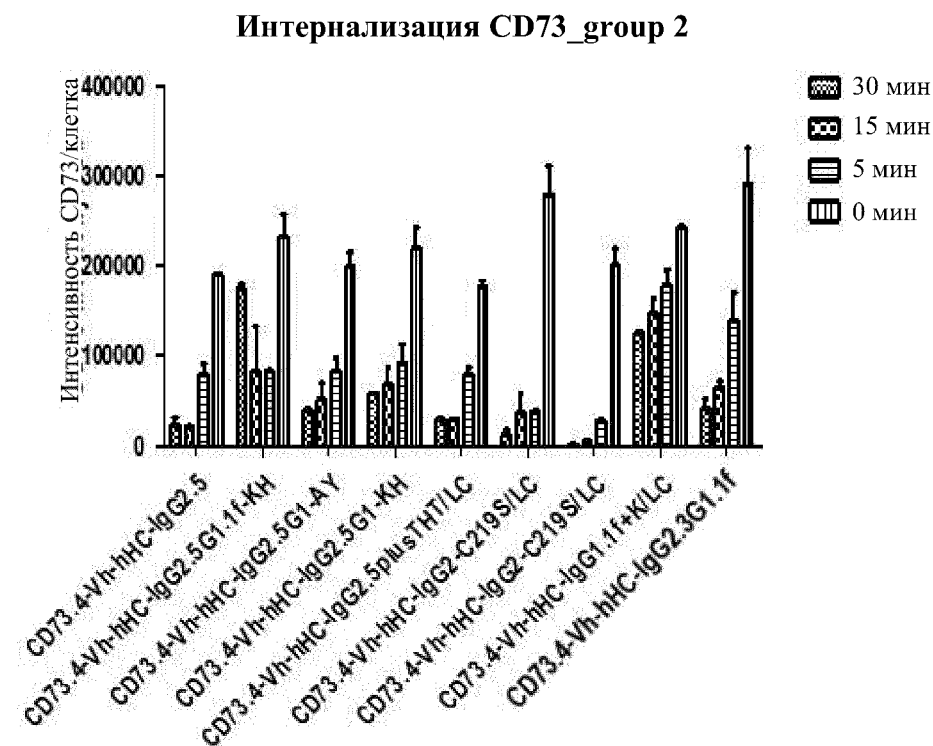
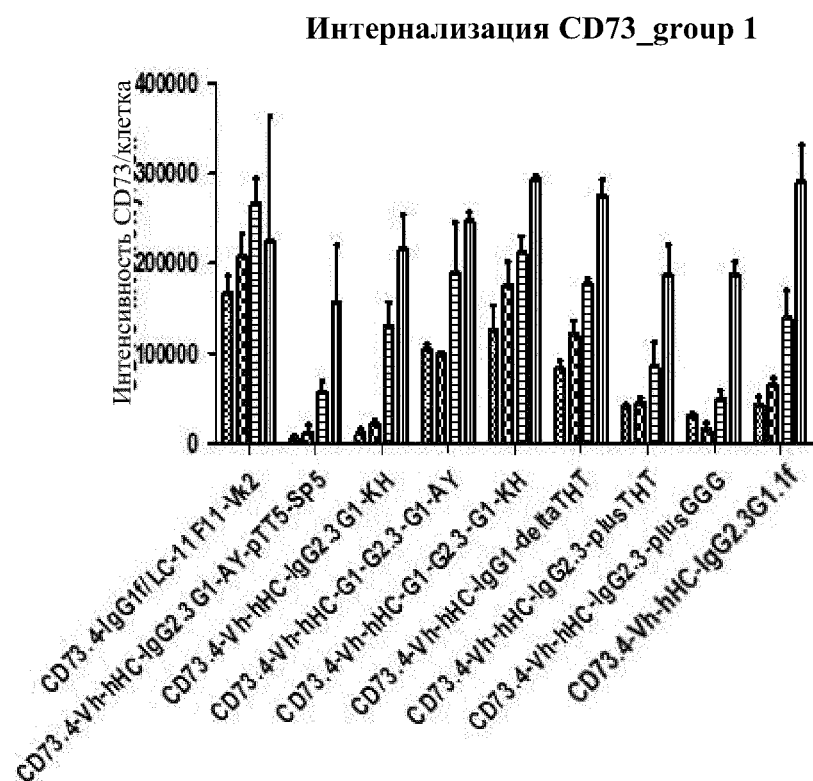


ФИГ. 8А

интернализация NCI-H292

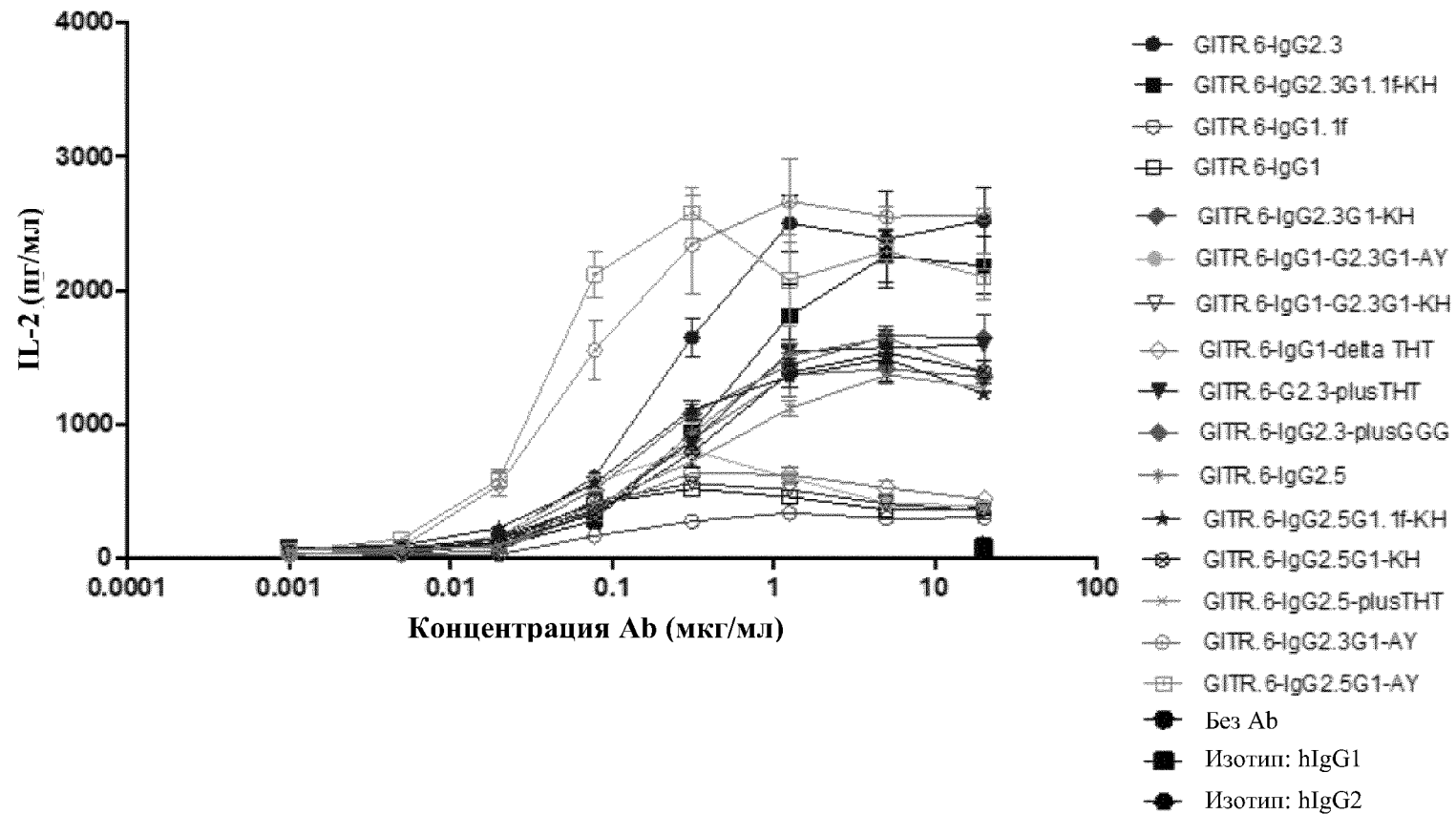


ФИГ. 8В

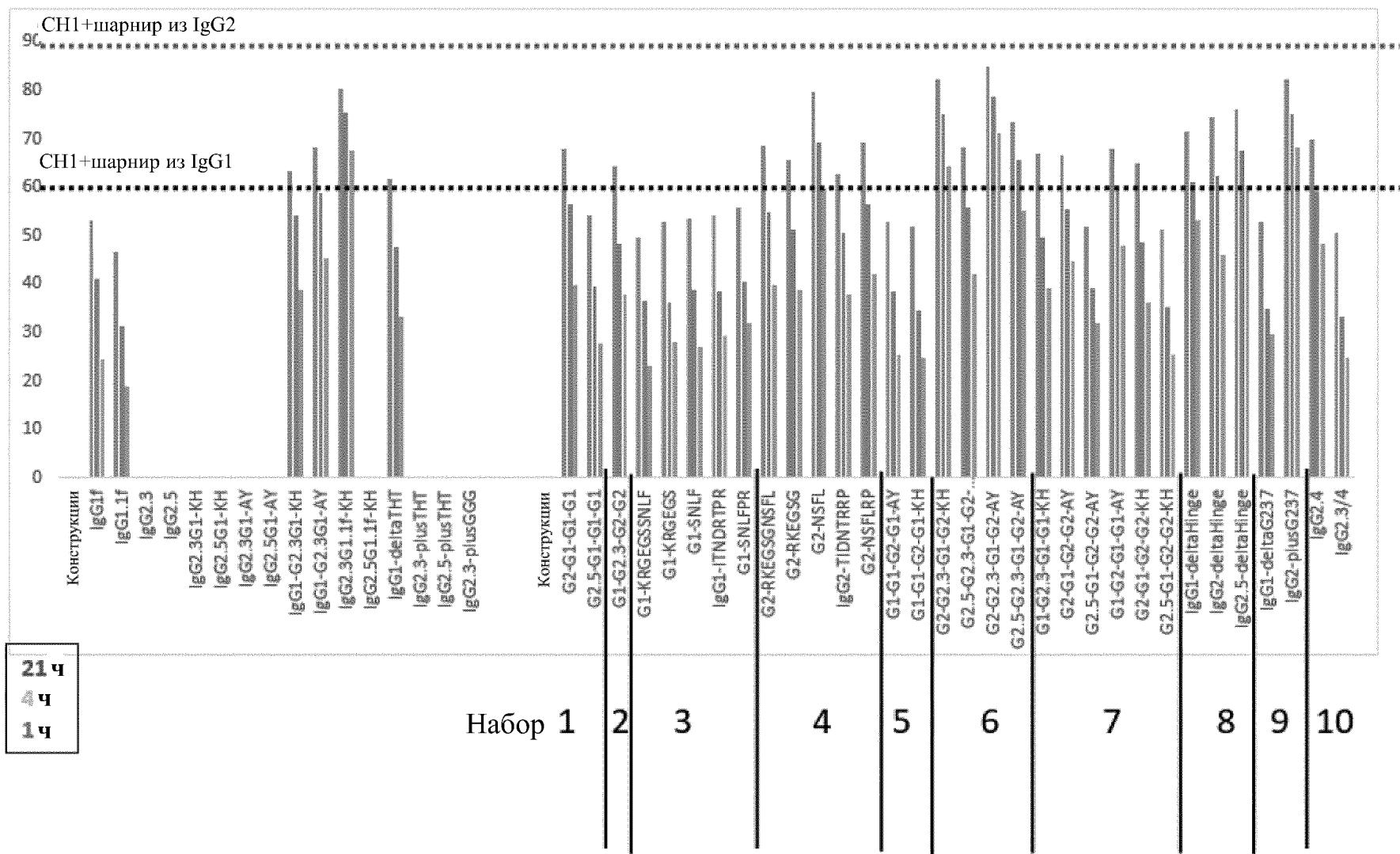


ФИГ. 8С

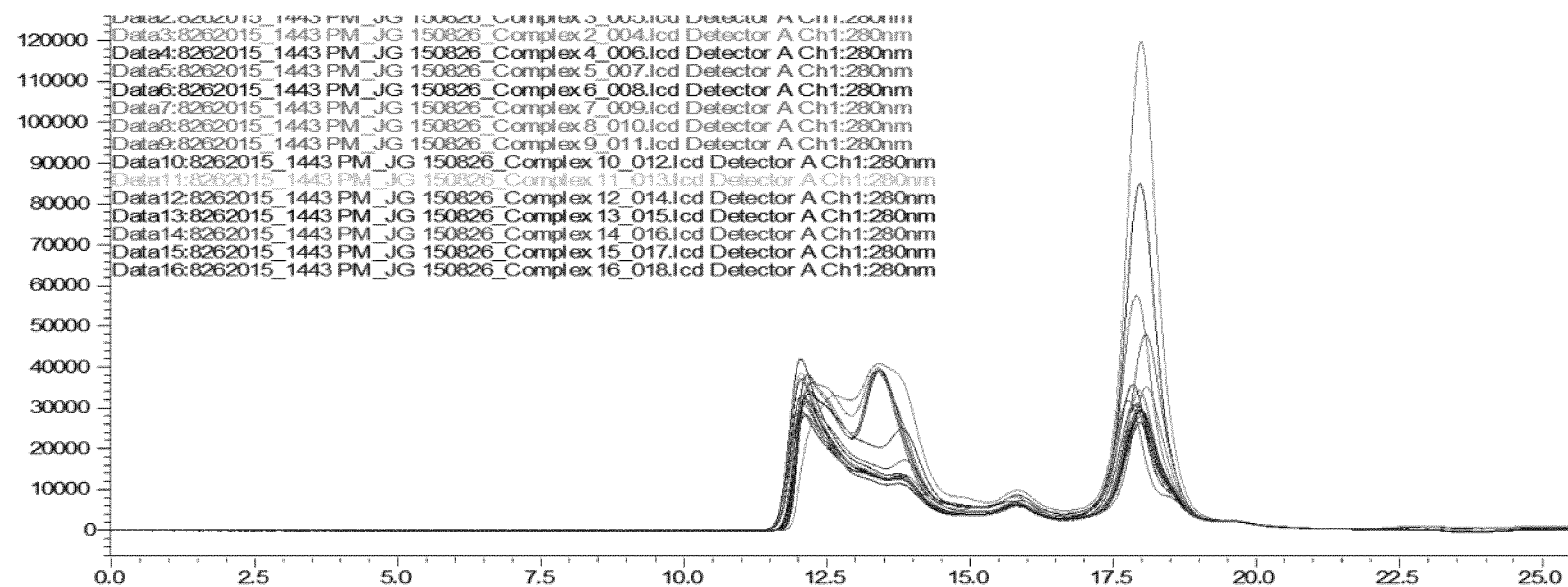
варианты GITR.6 на секрецию IL-2 CD4+ Т-клетками
в совместной культуре с CHO-ОКТ3



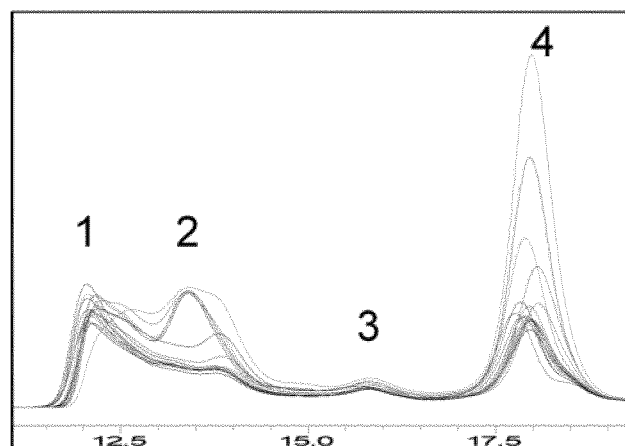
ФИГ. 9



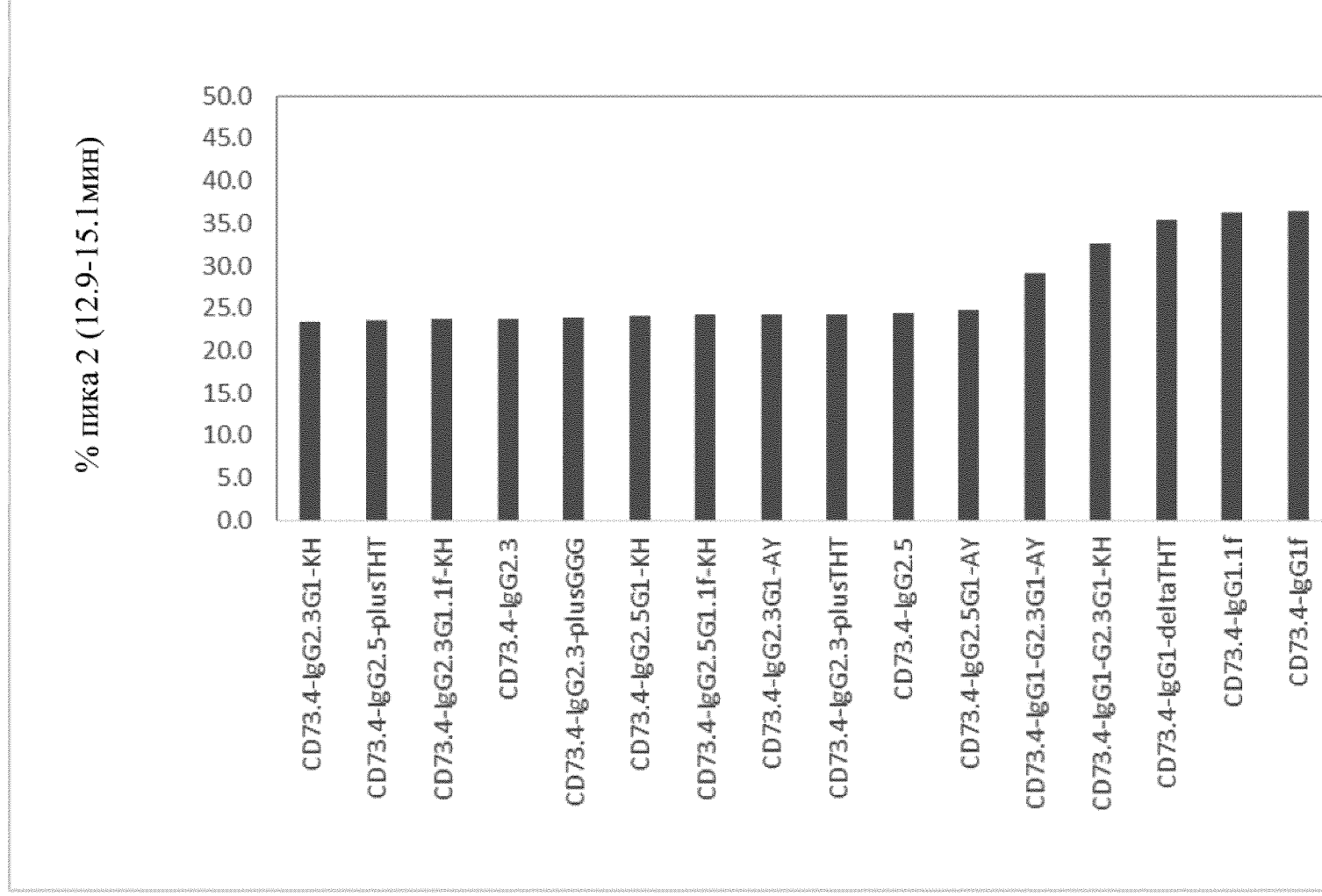
ФИГ. 10



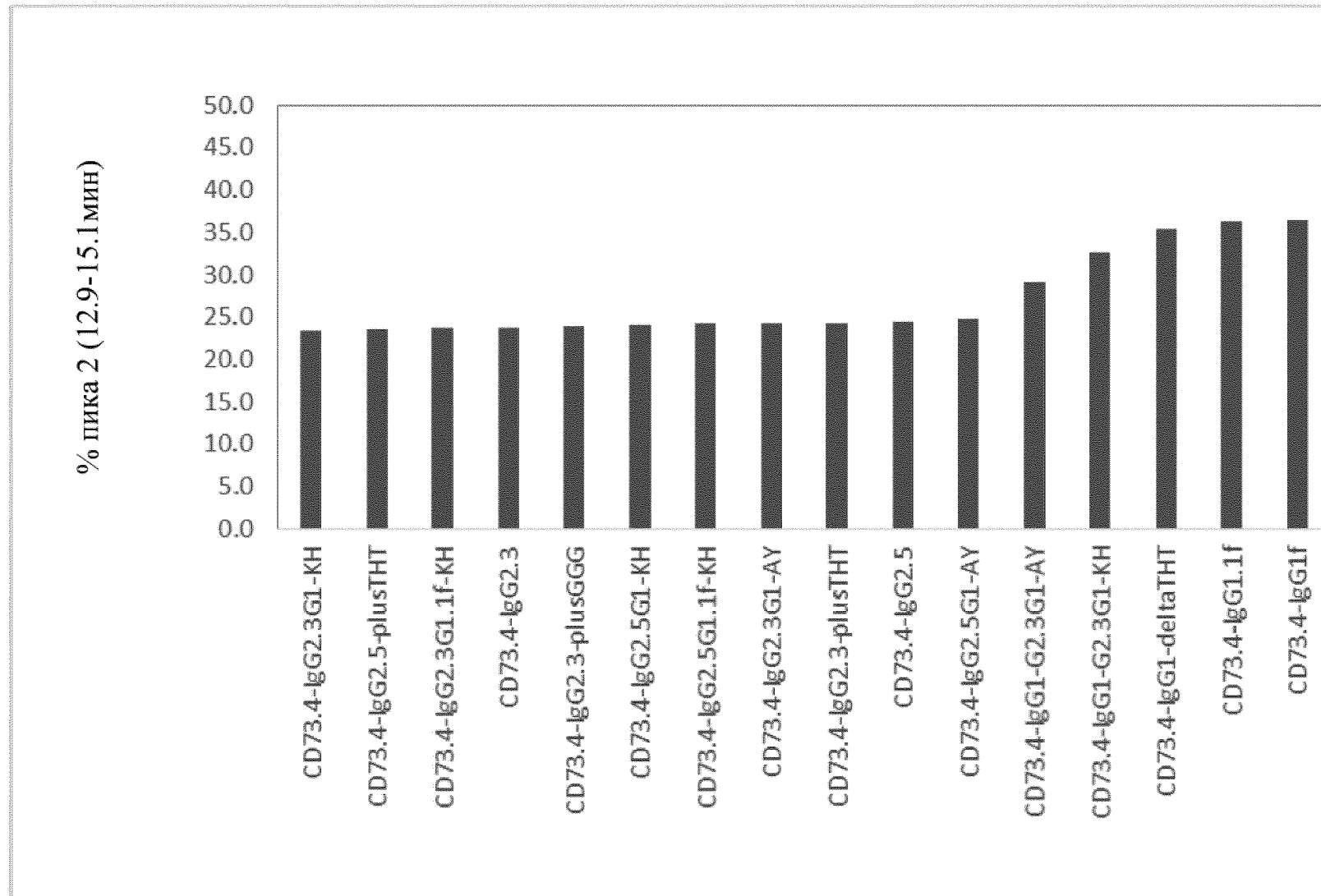
ФИГ. 11А



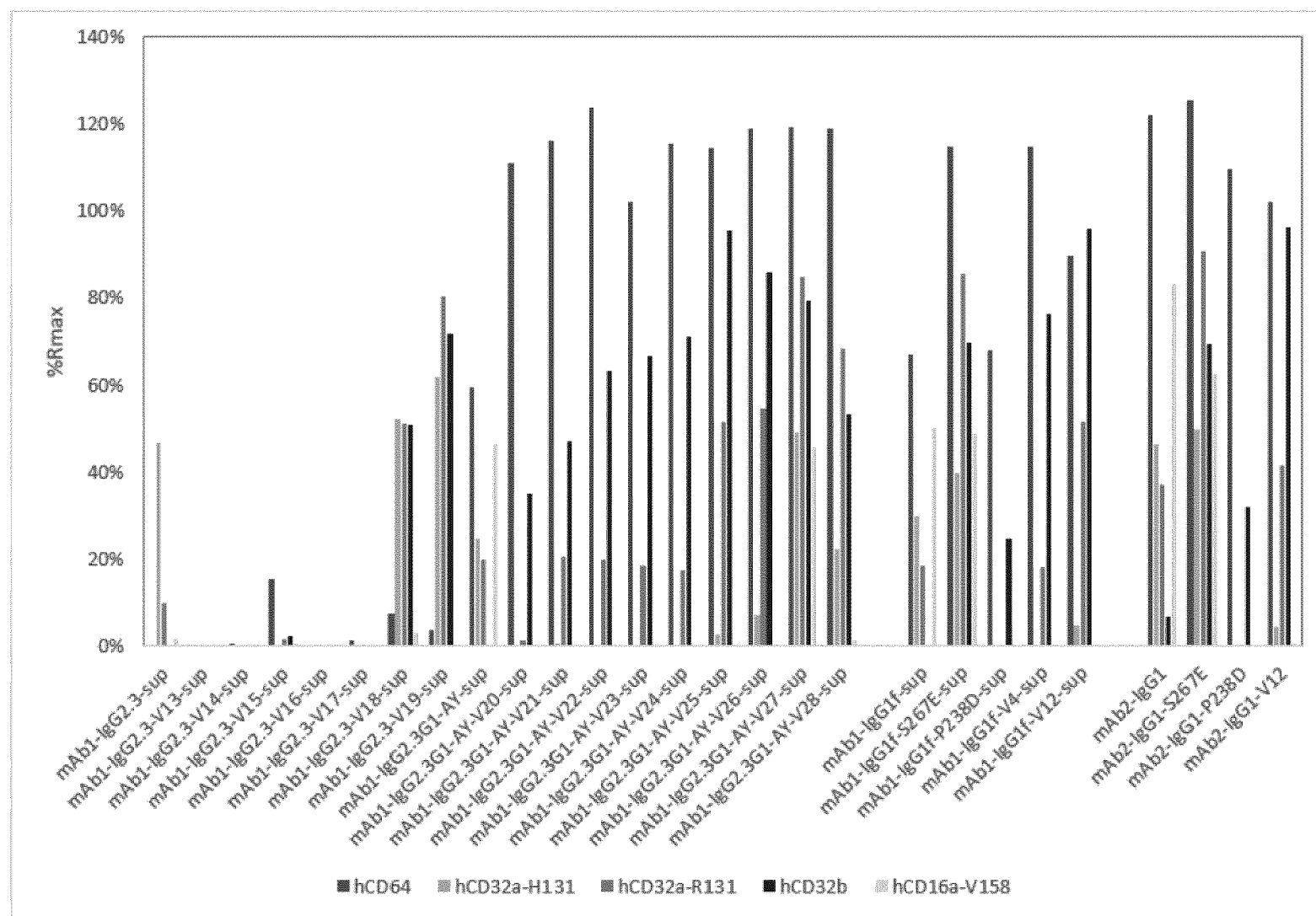
ФИГ. 11В



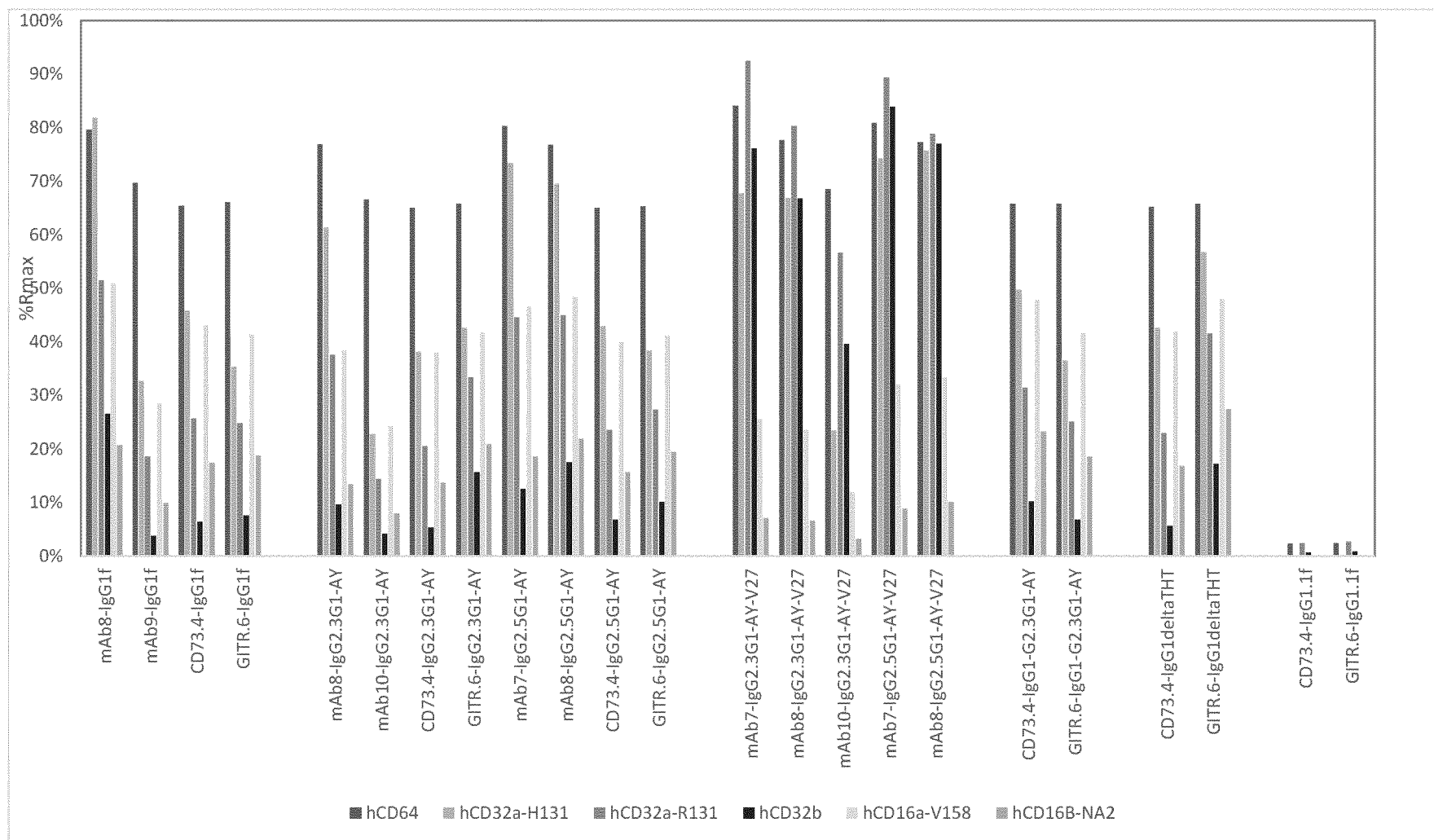
ФИГ. 11С



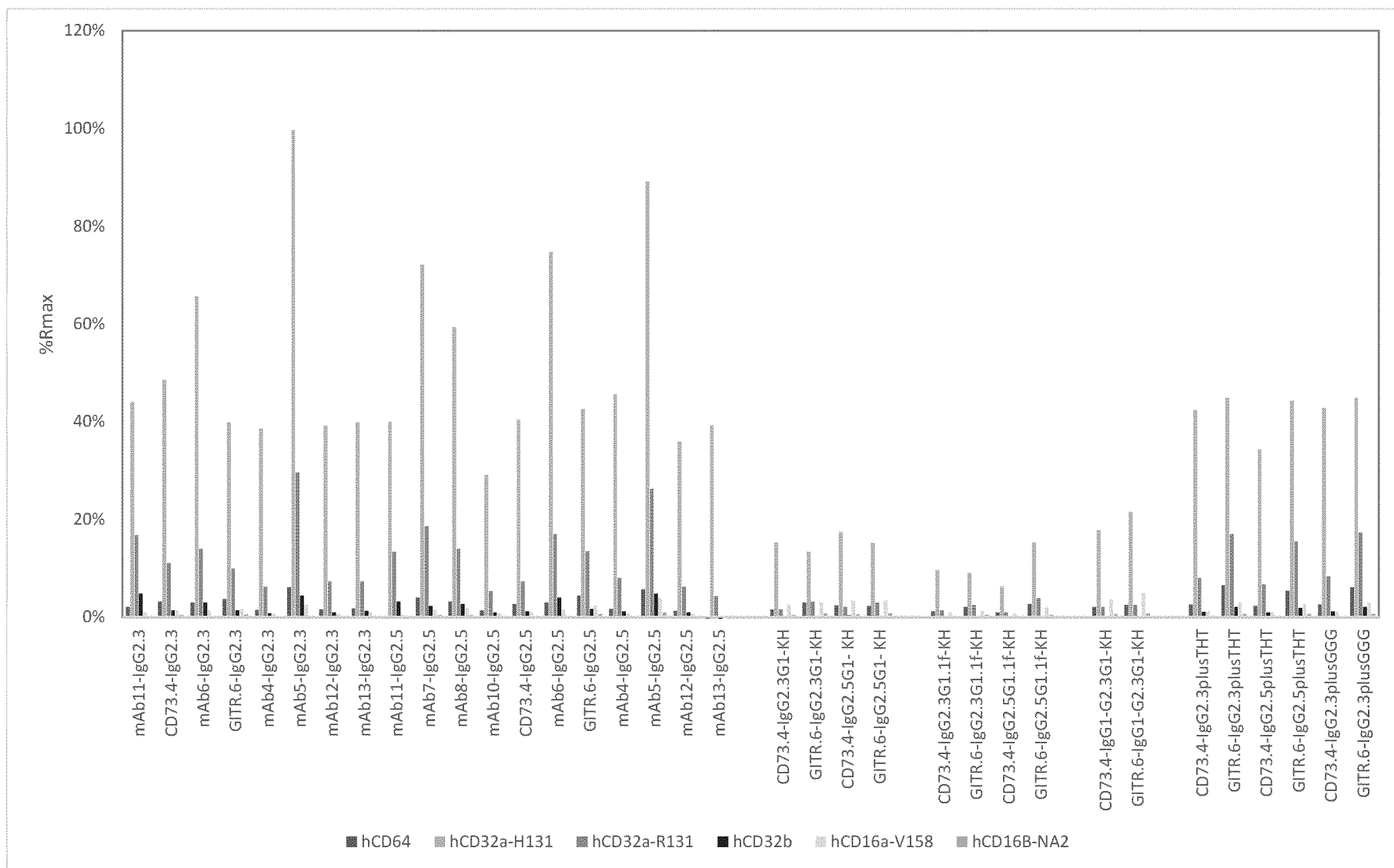
ФИГ. 12



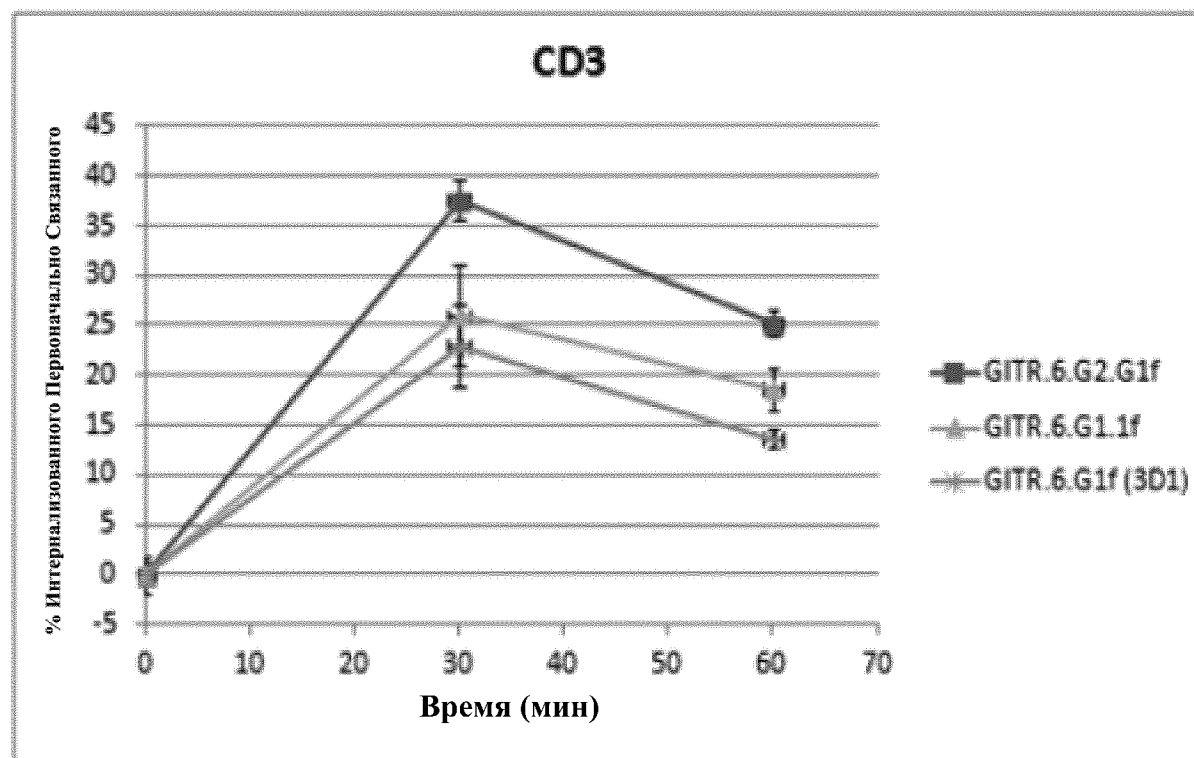
ФИГ. 13



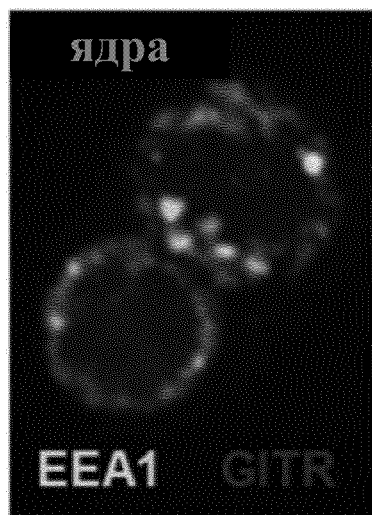
ФИГ. 14А



ФИГ. 14В

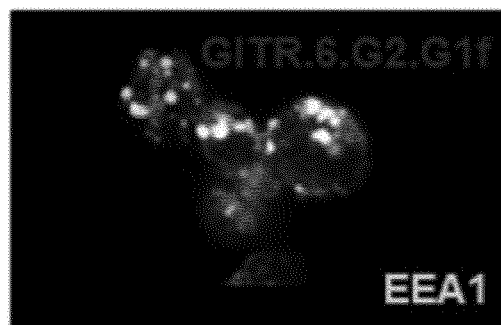


ФИГ. 15

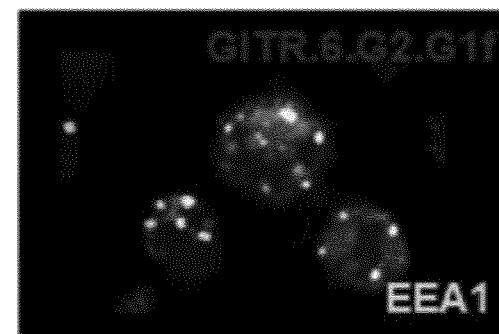


ФИГ. 16А

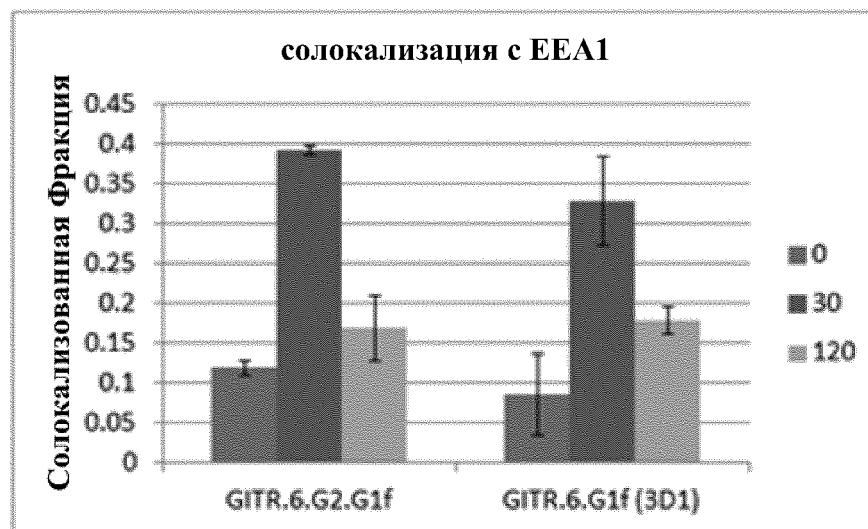
30мин



120мин



ФИГ. 16В

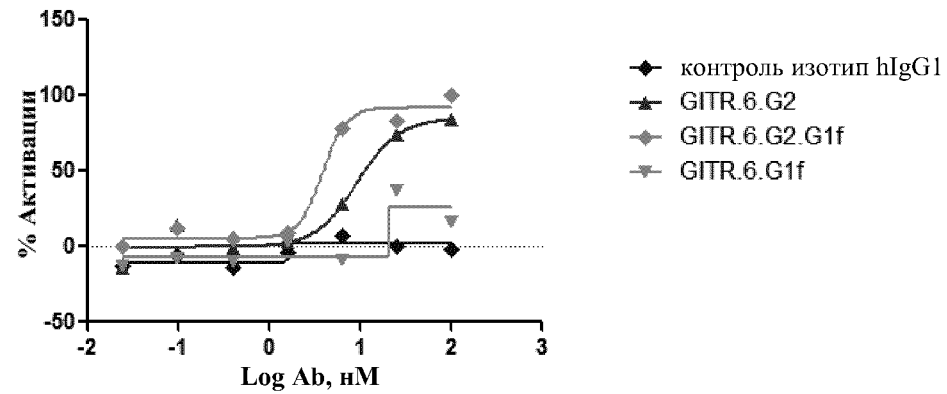


ФИГ. 16С

Вычисление

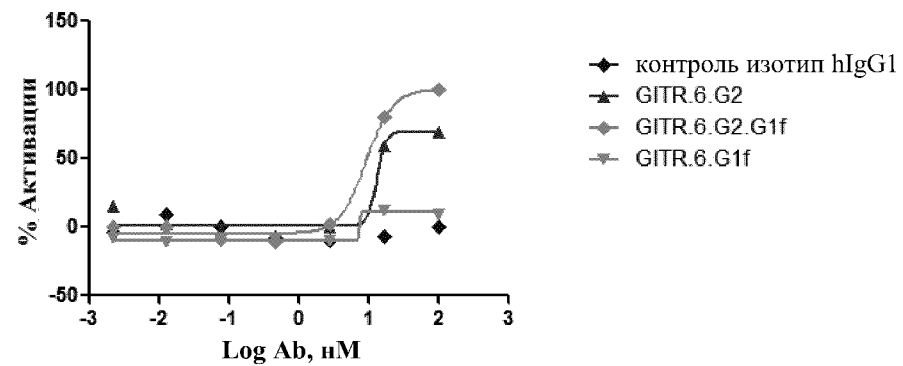
$$m_1 = \frac{\sum x_{coloc}}{\sum x}$$

Сигнализация NFκB в Активированных CD8+ Клетках

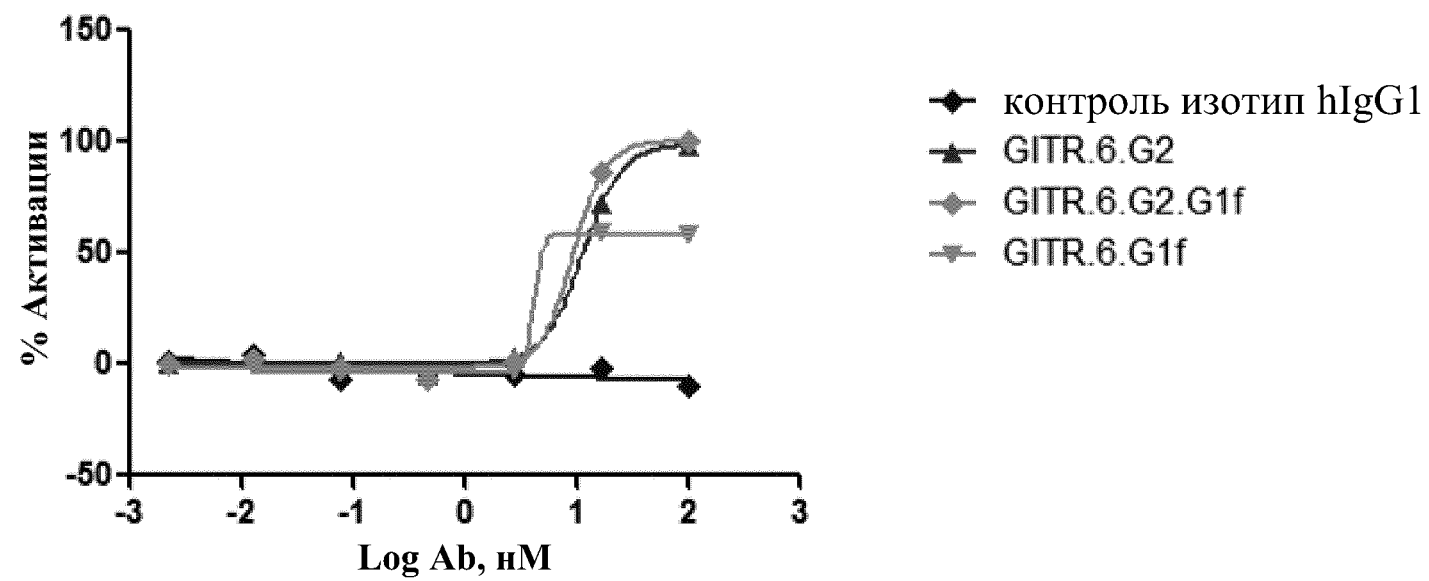


ФИГ. 17А

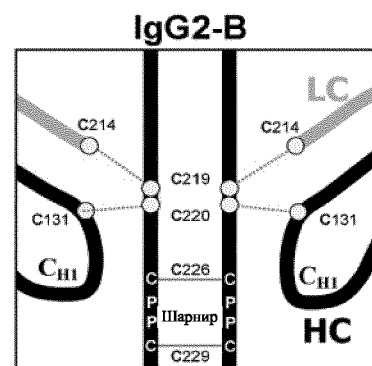
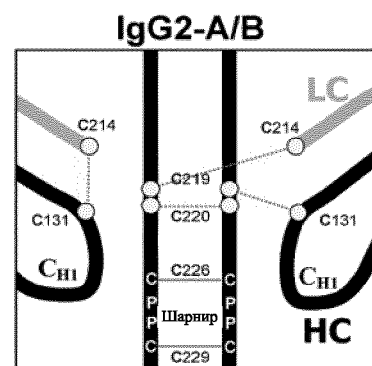
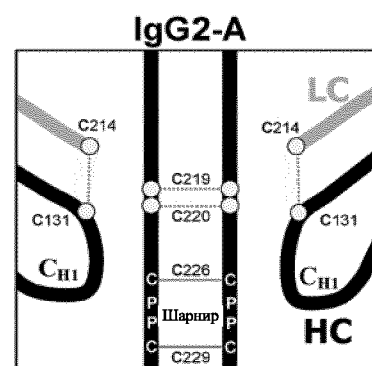
Сигнализация NFκB в Активированных CD4+ Клетках



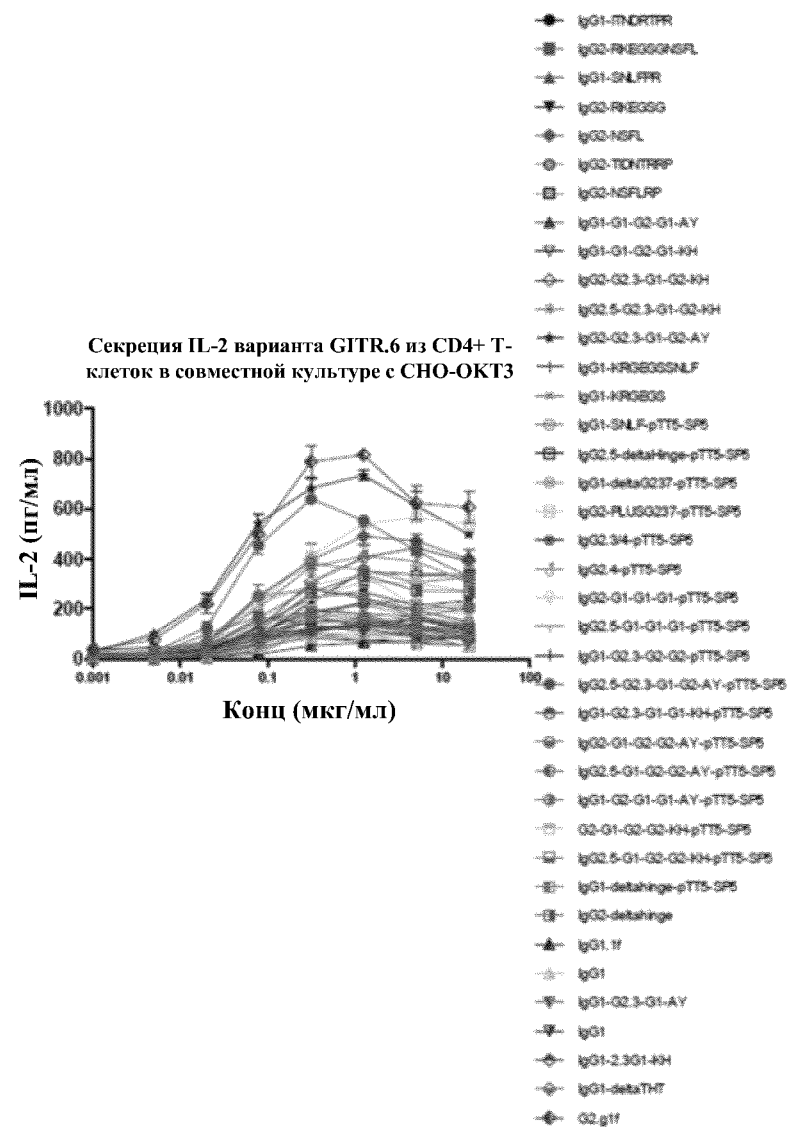
ФИГ. 17В



ФИГ. 18

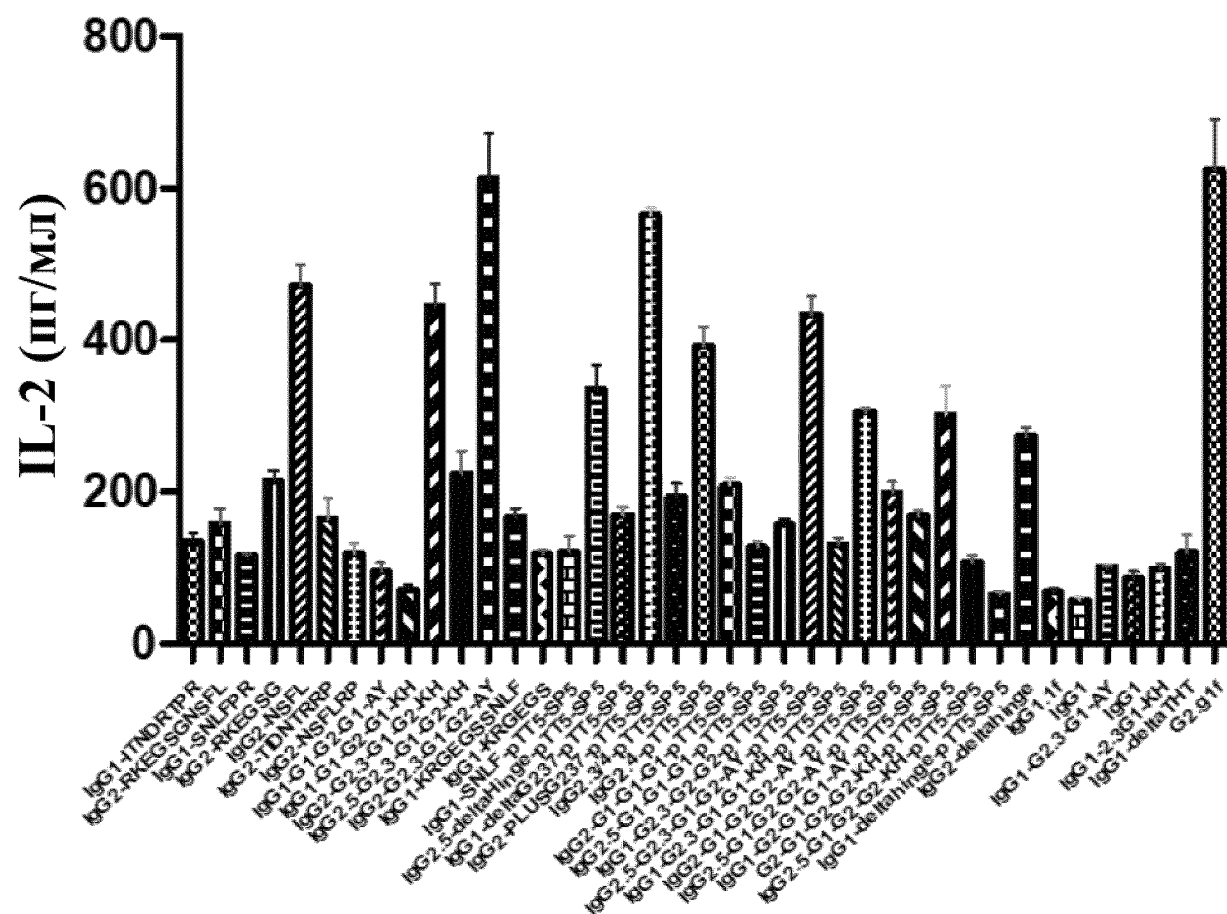


ФИГ. 19



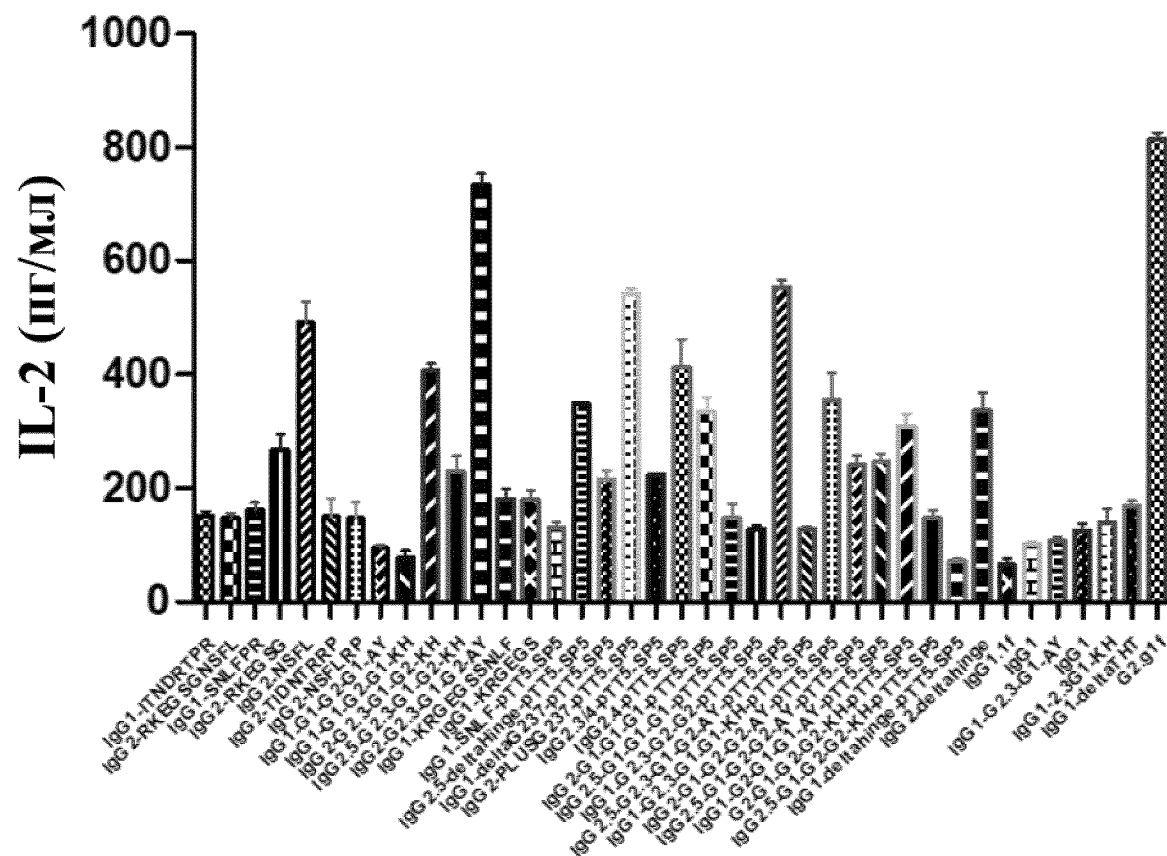
ФИГ. 20А

секреция IL-2 варианта GITR.6 из CD4+ Т-клеток в совместной культуре с CHO-ОКТ3 (стимулированные при 5 мкг/мг)



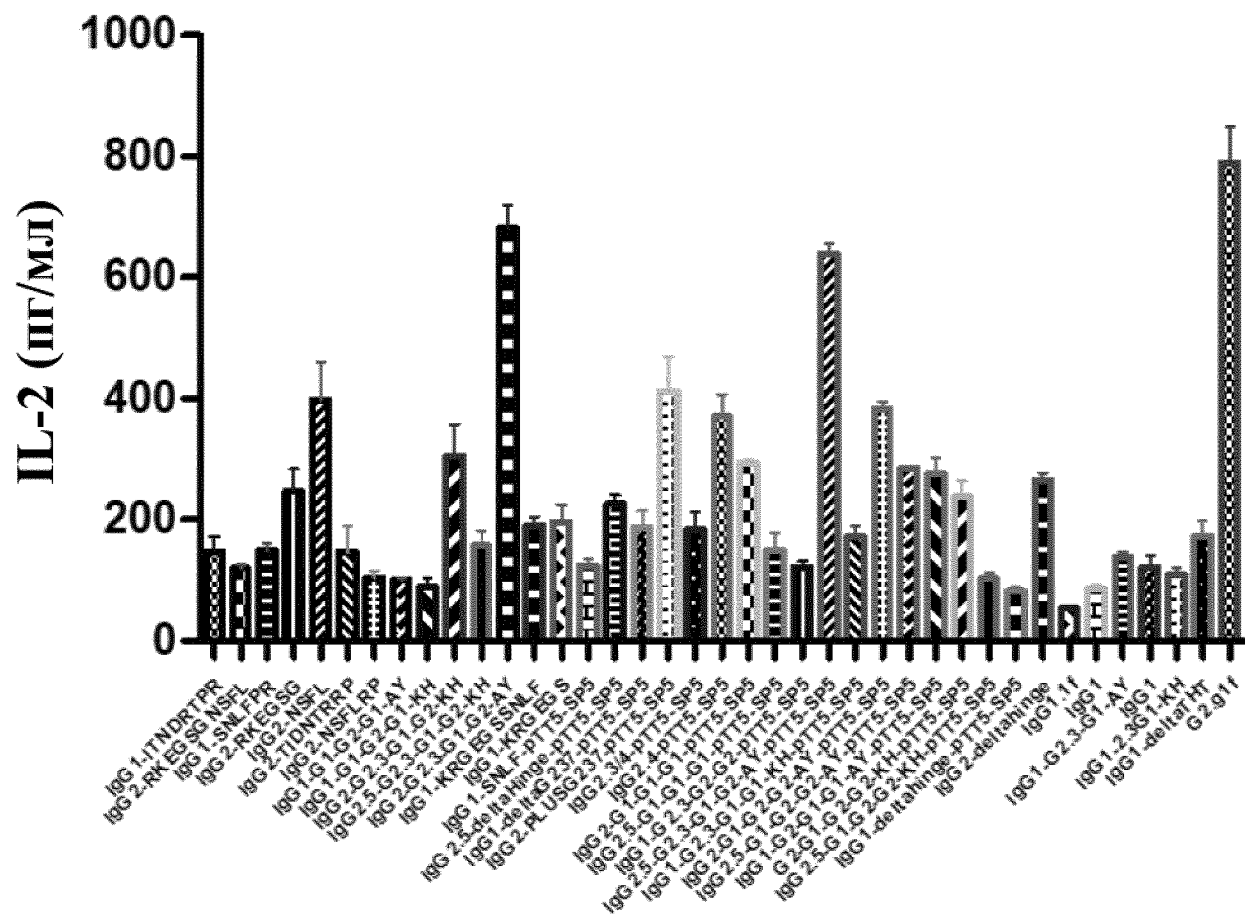
ФИГ. 20В

секреция IL-2 варианта GITR.6 из CD4+ Т-клеток в совместной культуре с CHO-ОКТ3 (стимулированные при 1,25 мкг/мл)



ФИГ. 20С

секреция IL-2 варианта GITR.6 из CD4+ Т-клеток в совместной
культуре с СНО-ОКТ3 (стимулированные при 0,313 мкг/мл)



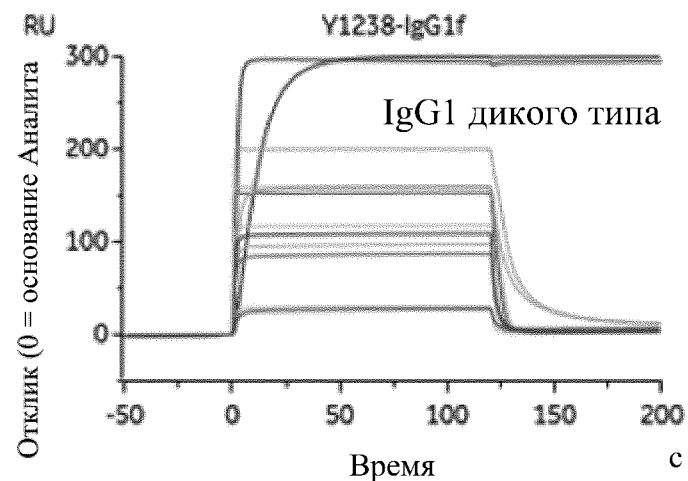
ФИГ. 20D

hIgG1f

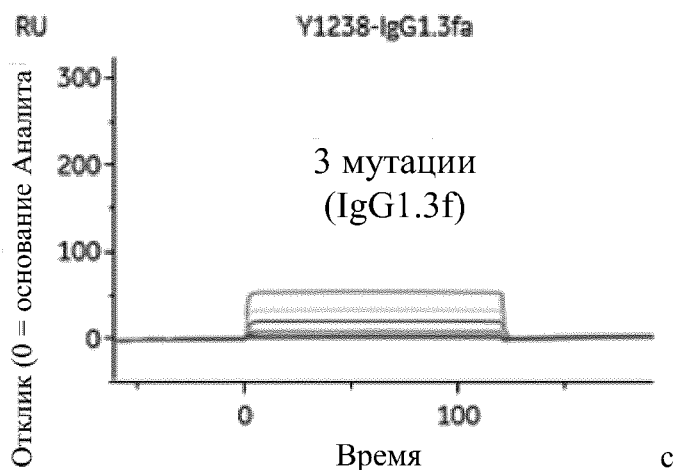
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

		$\begin{array}{c} \text{L234} \\ \diagdown \\ \text{L235} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{G237} \\ \diagup \\ \text{P238} \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{K322} \\ \text{---} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{A330} \\ \diagdown \\ \text{P331} \end{array}$	
hIgG1f	...CPPCPAPE	LL	GG	PSVFL.....	YKCK	VSNKALP	API IEK...
hIgG1.1f	...CPPCPAPE	AE	GA	PSVFL.....	YKCK	VSNKALP	SS IEK...
hIgG1.3f	...CPPCPAPE	AE	GA	PSVFL.....	YKCK	VSNKALP	APIEK...
hIgG1-P238K	...CPPCPAPE	LL	GGK	SVFL.....	YKCK	VSNKALP	APIEK...

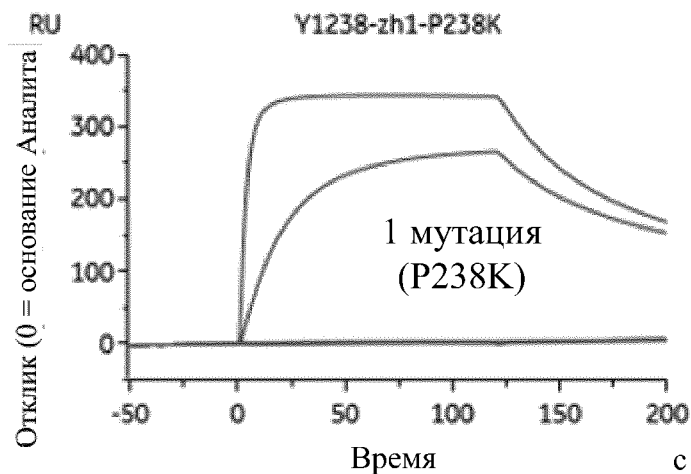
ФИГ. 21



ФИГ. 22А

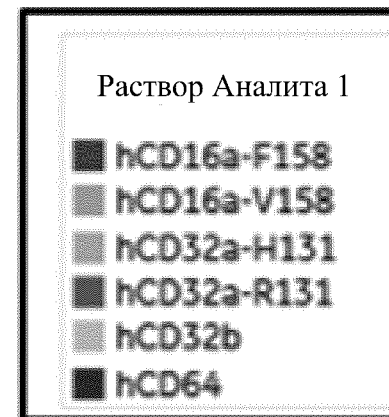


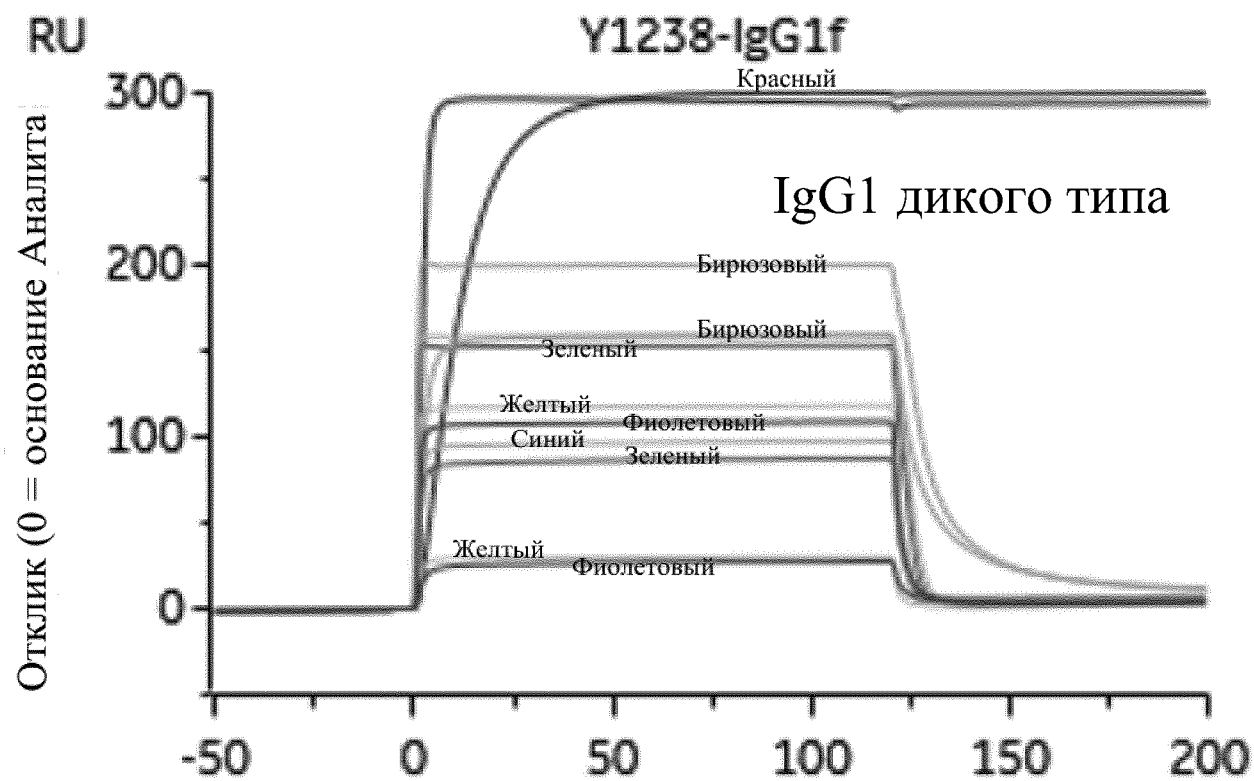
ФИГ. 22В



ФИГ. 22С

Данные сенсограммы показывают 1мкМ / 100 нМ hCD64 и 10 мкМ / 1 мкМ для всех других FcyR



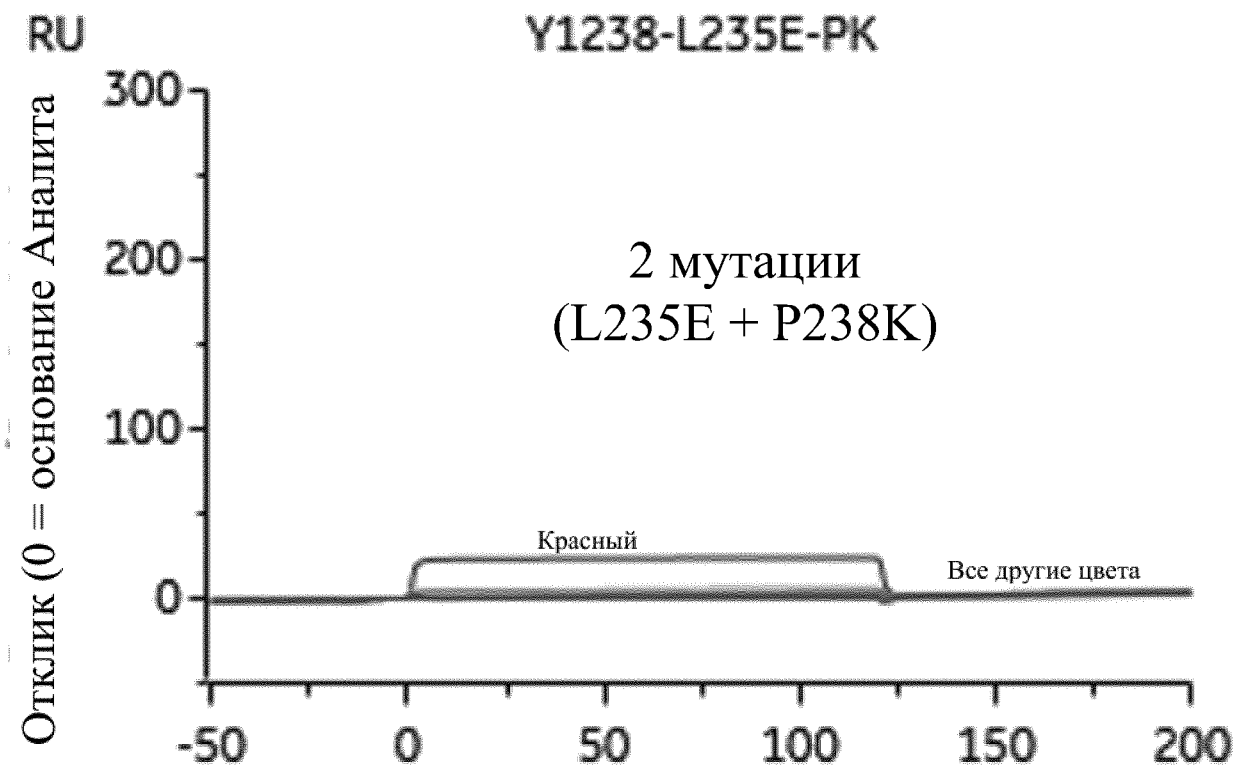


ФИГ. 22D

Данные сенсограммы показывают 1мкМ / 100 нМ hCD64 и 10 мкМ / 1 мкМ для всех других FcγR

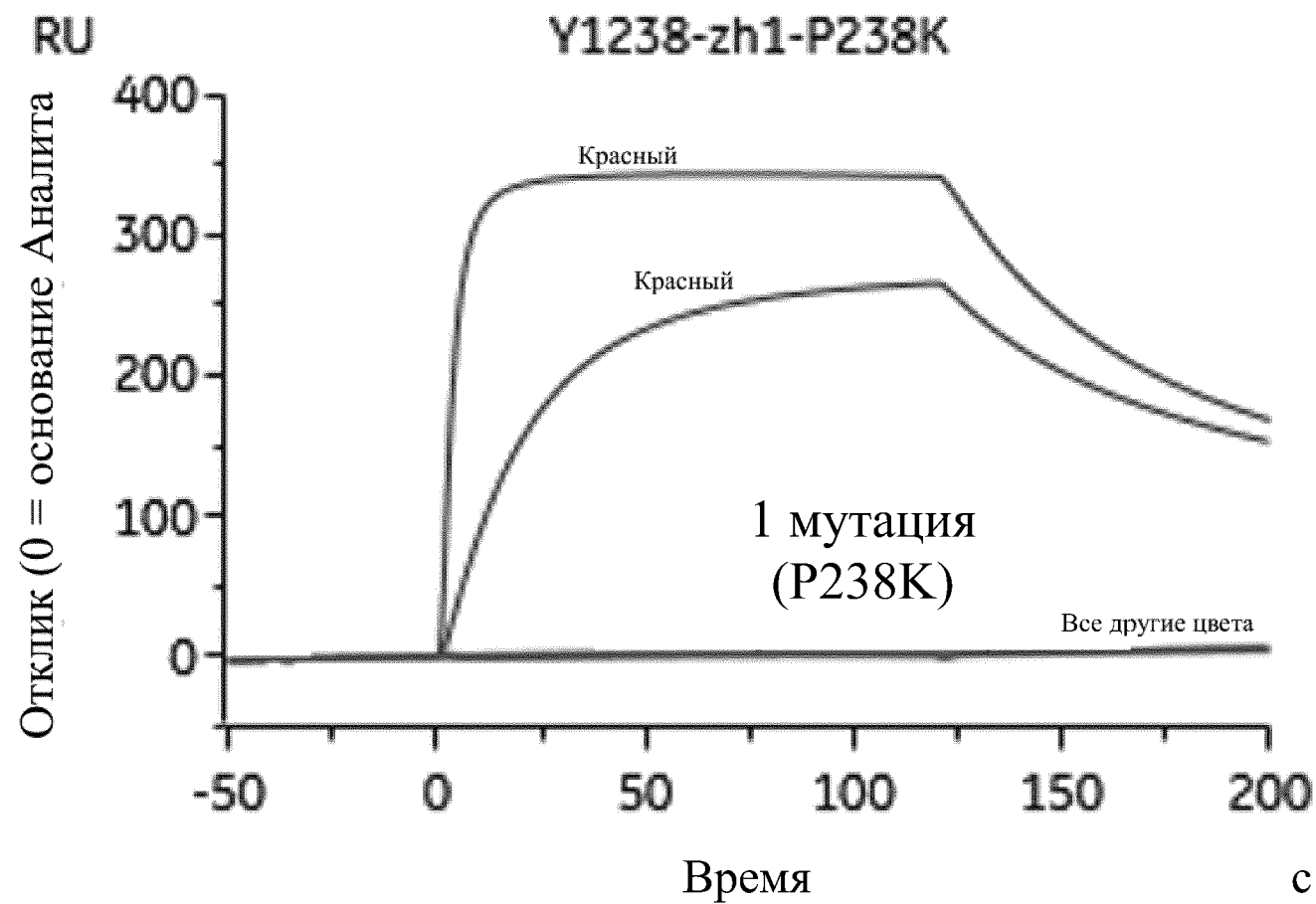
Раствор Аналита 1

- hCD16a-F158 Фиолетовый
- hCD16a-V158 Бирюзовый
- hCD32a-H131 Синий
- hCD32a-R131 Зеленый
- hCD32b Желтый
- hCD64 Красный



ФИГ. 22Е

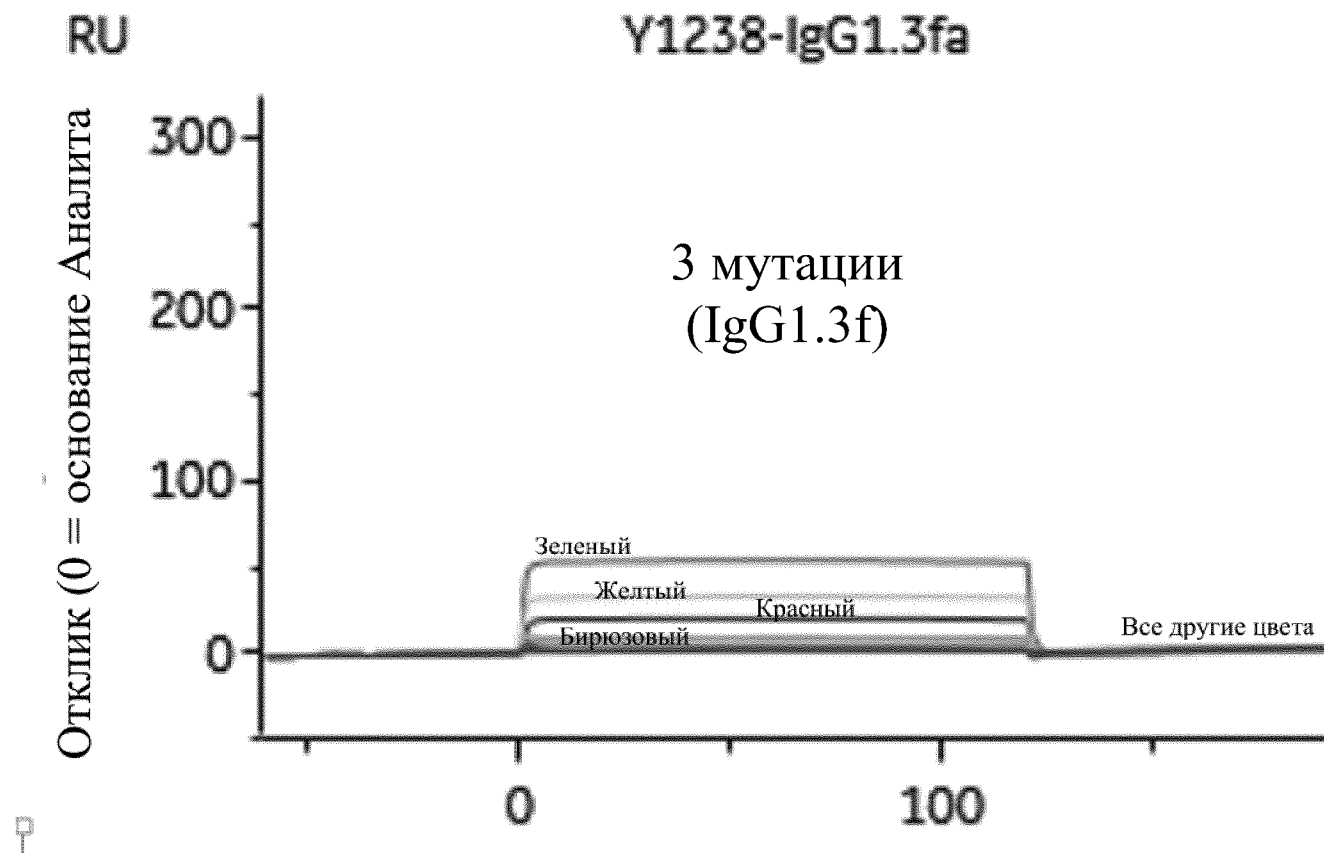
Раствор Аналита 1	
■ hCD16a-F158	Фиолетовый
■ hCD16a-V158	Бирюзовый
■ hCD32a-H131	Синий
■ hCD32a-R131	Зеленый
■ hCD32b	Желтый
■ hCD64	Красный



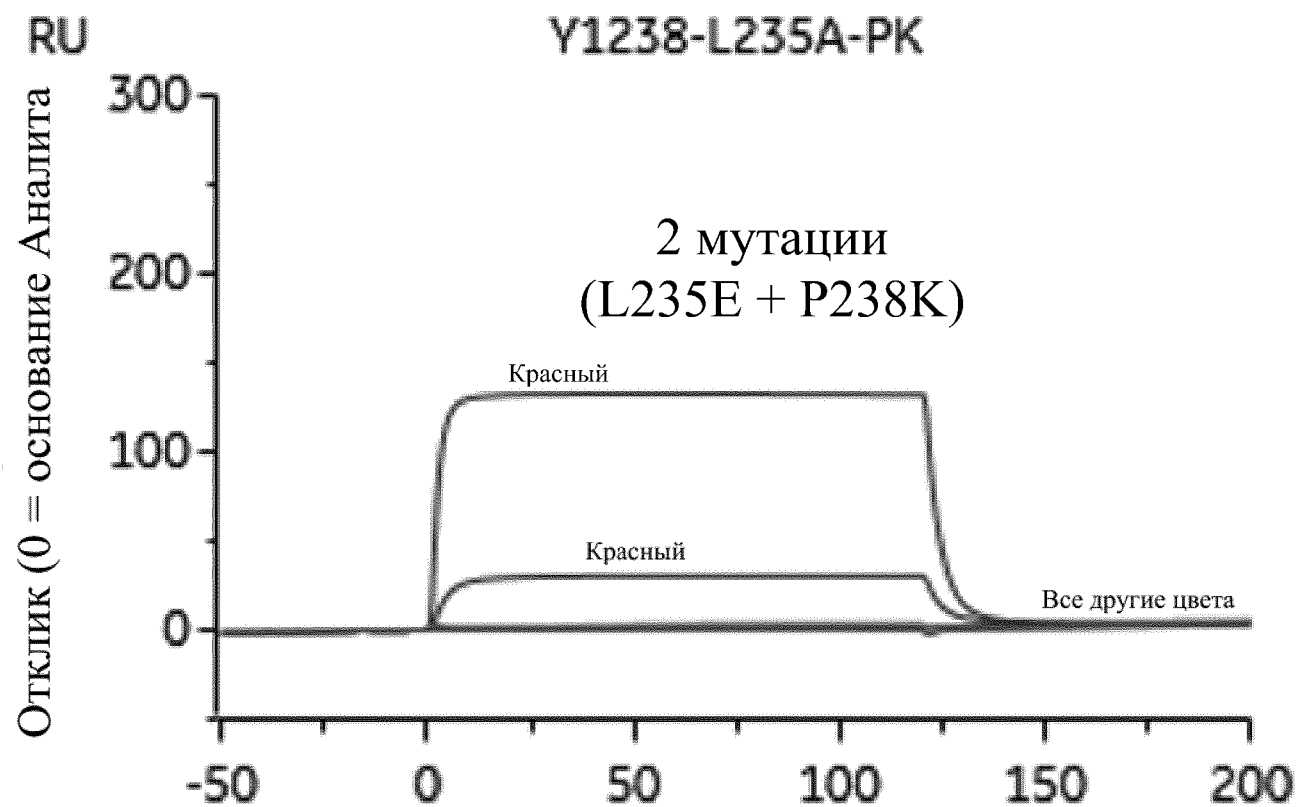
Раствор Аналита 1

- hCD16a-F158 Фиолетовый
- hCD16a-V158 Бирюзовый
- hCD32a-H131 Синий
- hCD32a-R131 Зеленый
- hCD32b Желтый
- hCD64 Красный

ФИГ. 22F



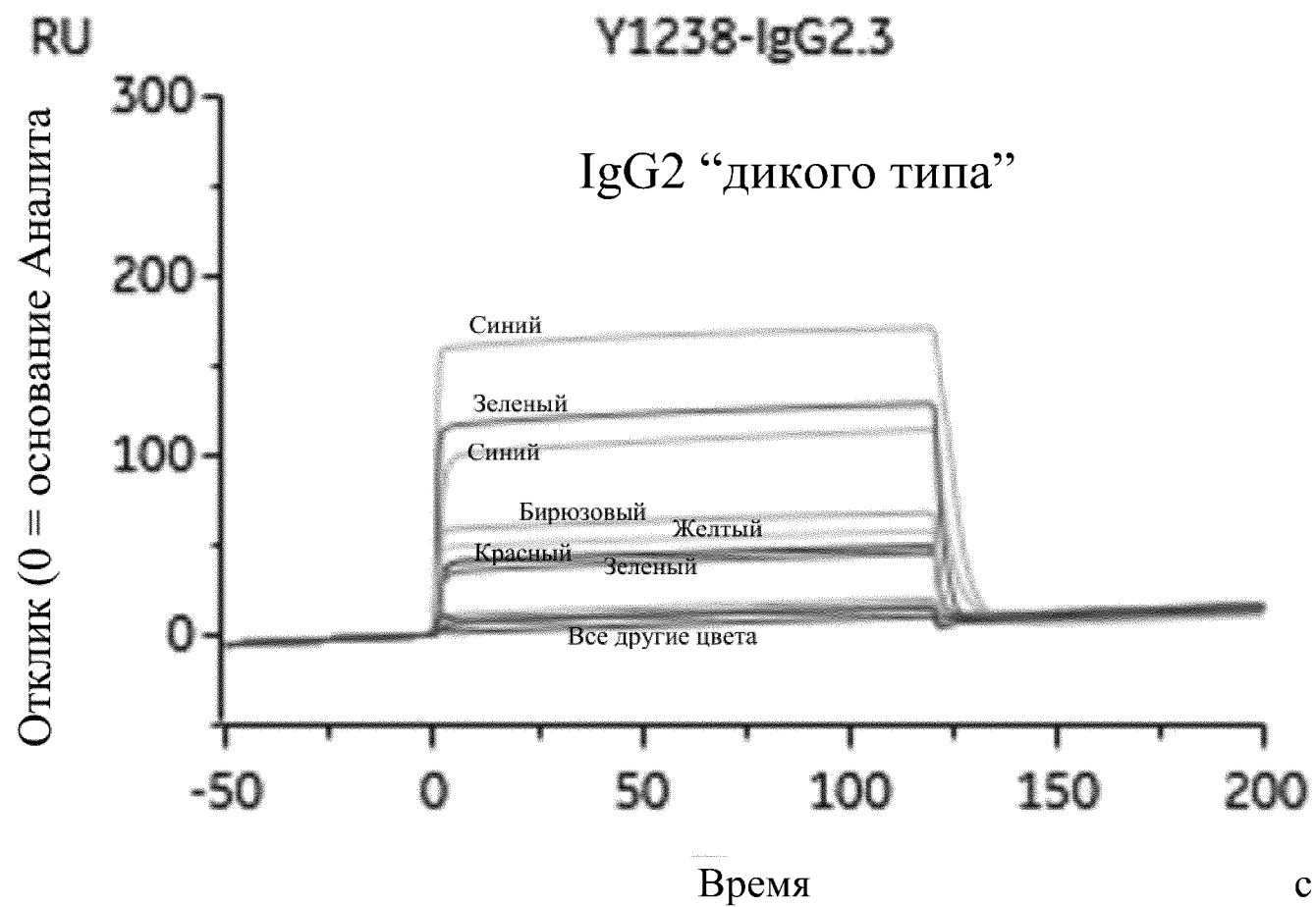
Раствор Аналита 1	
hCD16a-F158	Фиолетовый
hCD16a-V158	Бирюзовый
hCD32a-H131	Синий
hCD32a-R131	Зеленый
hCD32b	Желтый
hCD64	Красный



ФИГ. 22Н

Раствор Аналита 1

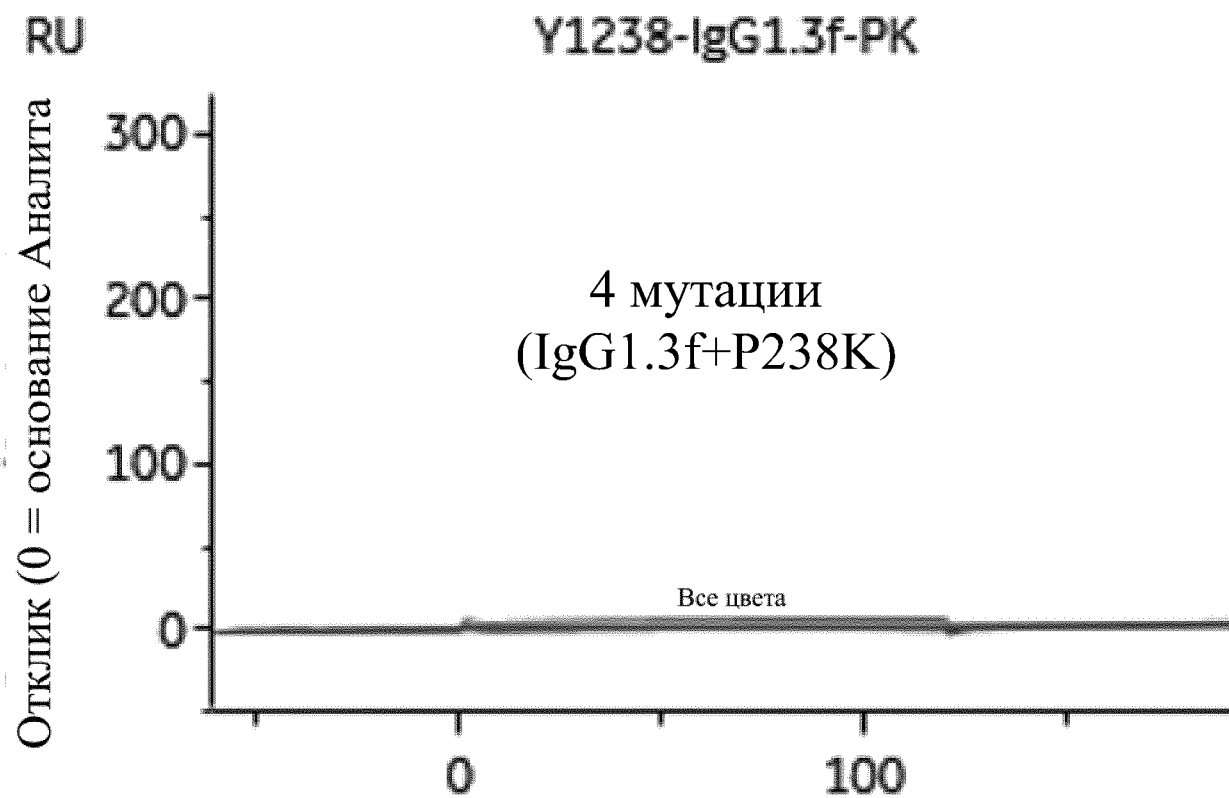
■	hCD16a-F158	Фиолетовый
■	hCD16a-V158	Бирюзовый
■	hCD32a-H131	Синий
■	hCD32a-R131	Зеленый
■	hCD32b	Желтый
■	hCD64	Красный



Раствор Аналита 1

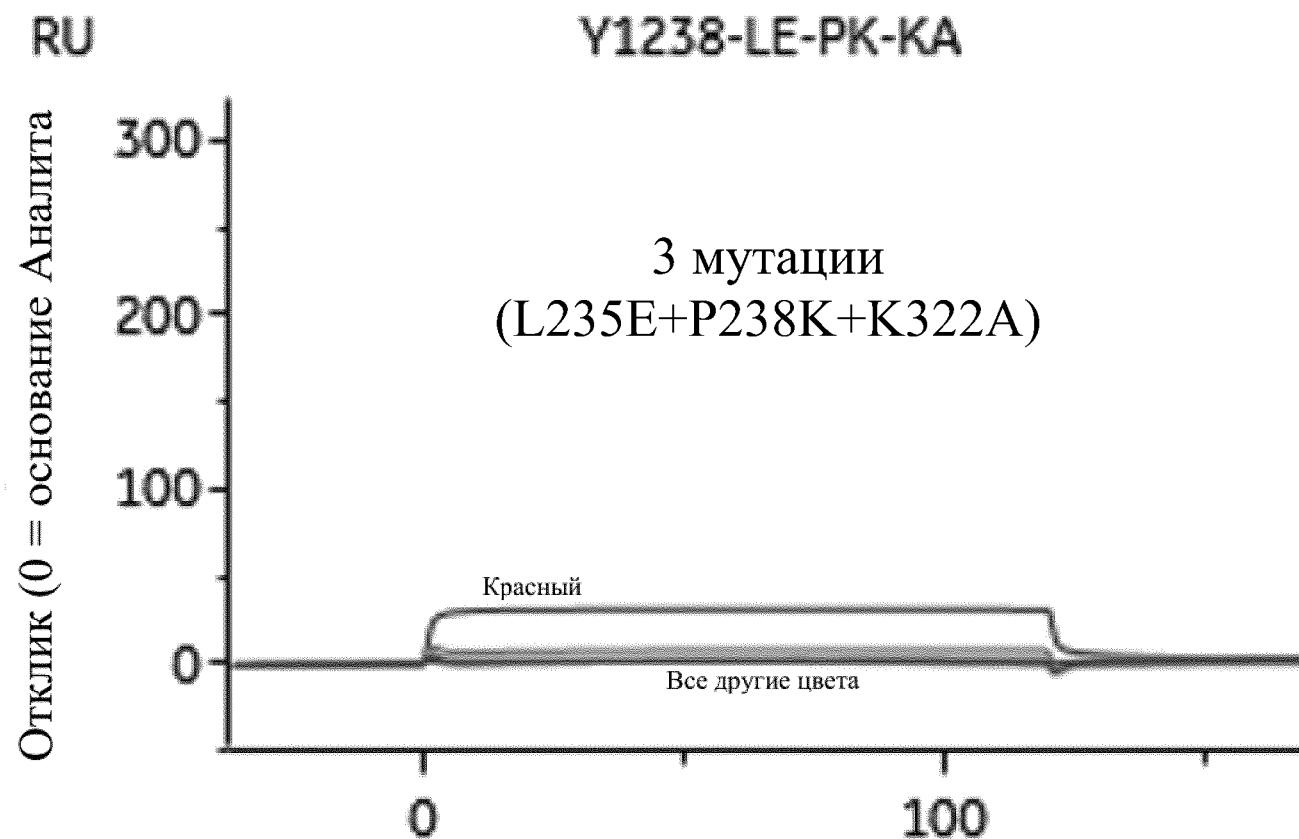
■	hCD16a-F158	Фиолетовый
■	hCD16a-V158	Бирюзовый
■	hCD32a-H131	Синий
■	hCD32a-R131	Зеленый
■	hCD32b	Желтый
■	hCD64	Красный

ФИГ. 22I



Раствор Аналита 1

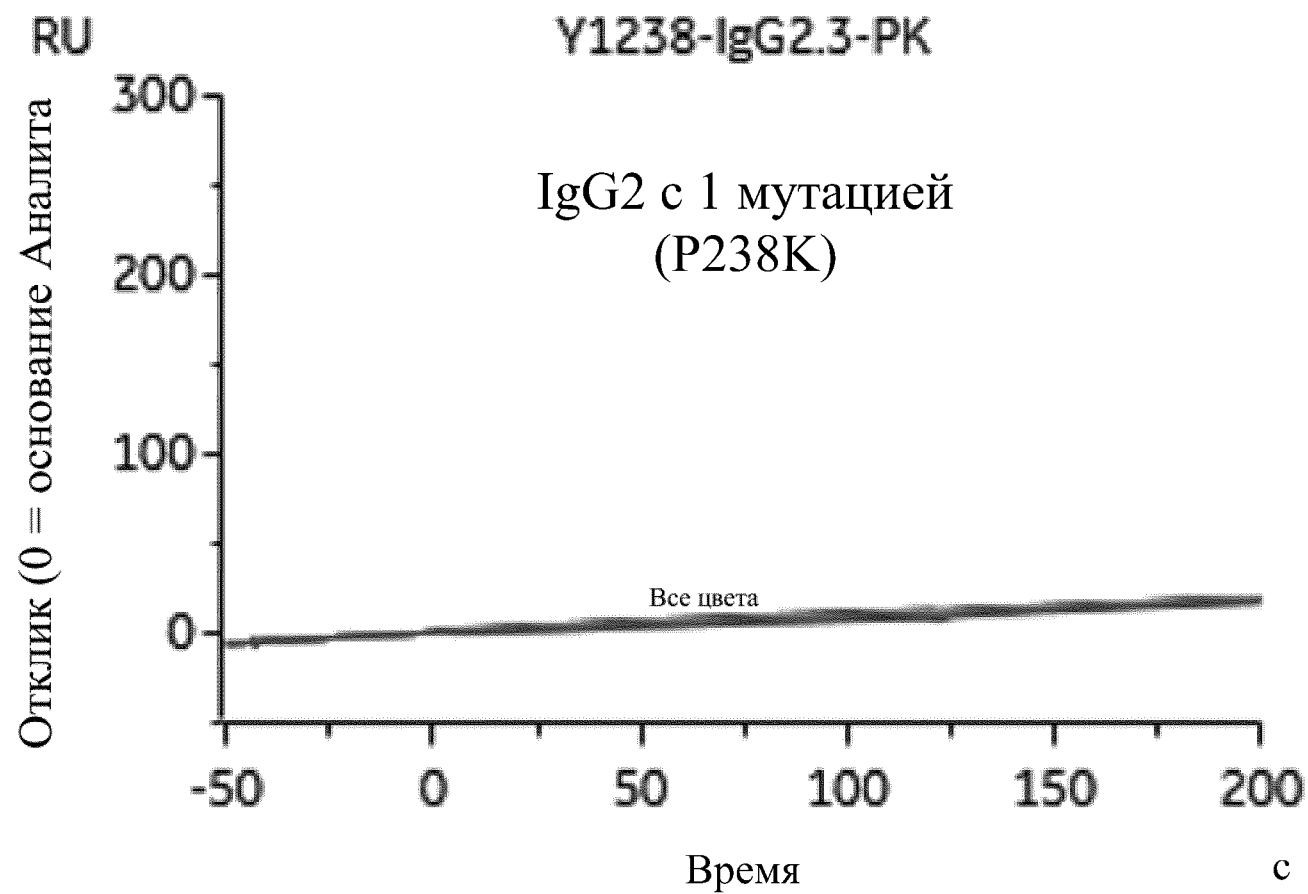
■ hCD16a-F158	Фиолетовый
■ hCD16a-V158	Бирюзовый
■ hCD32a-H131	Синий
■ hCD32a-R131	Зеленый
■ hCD32b	Желтый
■ hCD64	Красный



Раствор Аналита 1

- hCD16a-F158 Фиолетовый
- hCD16a-V158 Бирюзовый
- hCD32a-H131 Синий
- hCD32a-R131 Зеленый
- hCD32b Желтый
- hCD64 Красный

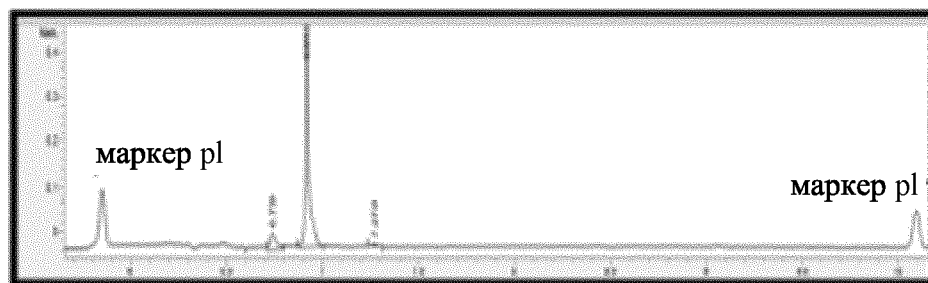
ФИГ. 22К



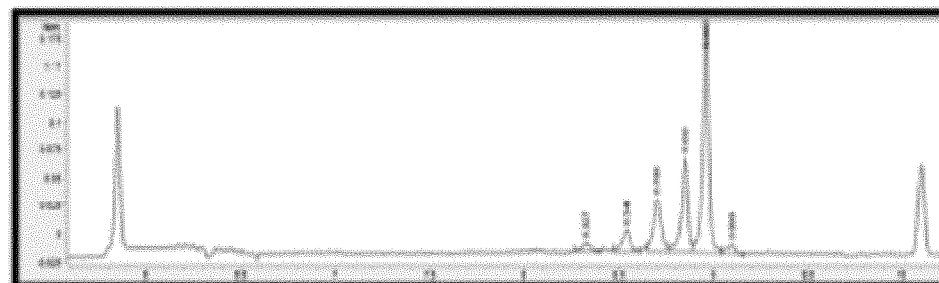
Раствор Аналита 1

■ hCD16a-F158	Фиолетовый
■ hCD16a-V158	Бирюзовый
■ hCD32a-H131	Синий
■ hCD32a-R131	Зеленый
■ hCD32b	Желтый
■ hCD64	Красный

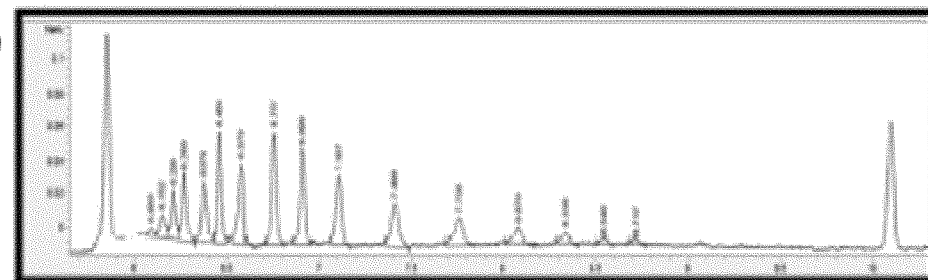
ФИГ. 22L



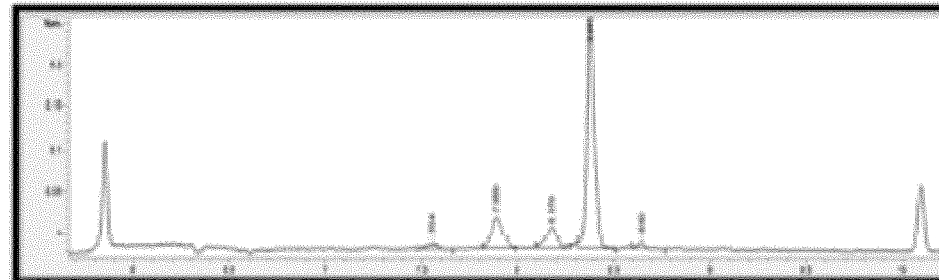
ФИГ. 23А



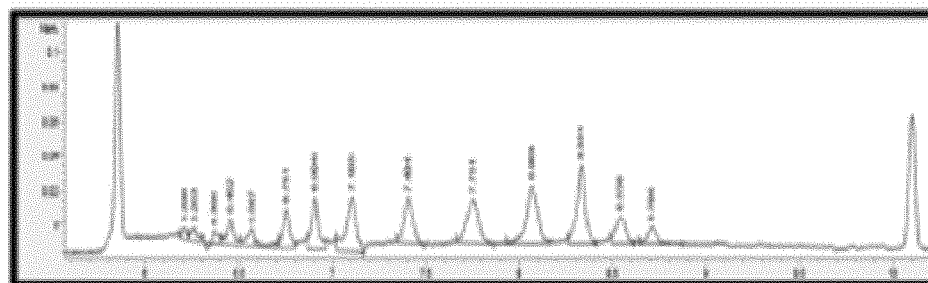
ФИГ. 23D



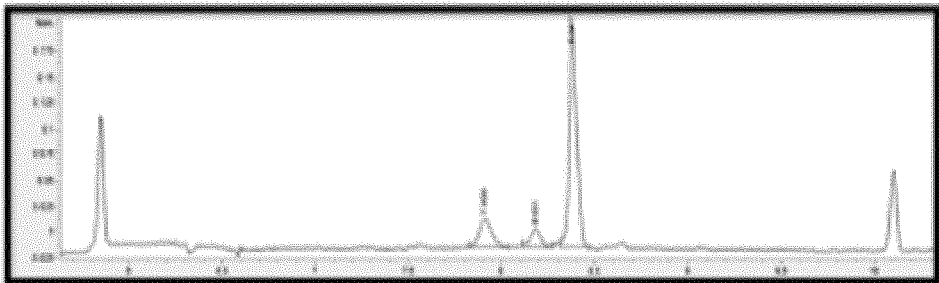
ФИГ. 23В



ФИГ. 23Е



ФИГ. 23С



ФИГ. 23F