

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038349**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.12

(21) Номер заявки
201791127

(22) Дата подачи заявки
2015.11.19

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

(54) **АНТИТЕЛА, СОДЕРЖАЩИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КОНСТАНТНЫЕ УЧАСТКИ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ**

(31) **62/083,021**

(32) **2014.11.21**

(33) **US**

(43) **2017.11.30**

(86) **PCT/US2015/061632**

(87) **WO 2016/081746 2016.05.26**

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

(72) Изобретатель:
**Лонберг Нилс, Корман Алан Дж.,
Селби Марк Дж., Барнхарт Брайан,
Ямнюк Аарон П., Сринивасан Мохан,
Хеннинг Карла, Хан Мишель Минхуа,
Лей Мин, Швайцер Лиан, Хэтчер
Сандра В., Раджпал Арвинд (US)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(56) CHAPPEL M.S. ET AL.: "IDENTIFICATION OF THE FC-GAMMA RECEPTOR CLASS I BINDING SITE IN HUMAN IGG THROUGH THE USE OF RECOMBINANT IGG1-IGG2 HYBRID AND POINT-MUTATED ANTIBODIES", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 88, no. 20, 1 October 1991 (1991-10-01), pages 9036-9040, XP002392092, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.88.20.9036 figure 1

WO-A2-2005007809

EP-A1-2784091

WO-A2-2009036209

EP-A1-2206775

OMID VAFA ET AL.: "An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations", METHODS, vol. 65, no. 1, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 114-126, XP055191082, ISSN: 1046-2023, DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.06.035 figures 4, 6, 10

WO-A1-2015145360

WO-A2-2015187835

(57) В документе представлены константные участки тяжелой цепи (называемые "модифицированными константными участками тяжелой цепи") или их функционально эквивалентные фрагменты, которые улучшают биологические свойства антител по сравнению с такими же антителами в немодифицированной форме. Иллюстративный модифицированный константный участок тяжелой цепи включает в себя шарнир IgG2 и три константных домена (т.е. CH1, CH2 и CH3 домены), причем один или несколько из доменов константного участка не относятся к изотипу IgG2 (например, IgG1, IgG3 или IgG4). Константный участок тяжелой цепи может содержать последовательности домена человеческого IgG дикого типа или варианты этих последовательностей. В документе также представлены способы улучшения определенных биологических свойств антител, которые содержат шарнир, не относящийся к IgG2, таких как интернализация, агонизм и антагонизм, причем способ предусматривает замену у антитела шарнира, не относящегося к IgG2, на шарнир IgG2.

B1**038349****038349****B1**

Ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/083021, поданной 21 ноября 2014 г. Содержание любых патентов, патентных заявок и источников, цитируемых в настоящем описании, таким образом, включено посредством отсылки во всей их полноте.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Терапевтические средства на основе антител являются одной из наиболее быстро развивающихся областей в лечении заболеваний, таких как злокачественные заболевания и иммунные нарушения. Тем не менее, эффективное целенаправленное воздействие на антиген с помощью терапевтического антитела остается основной задачей в здравоохранении. Следовательно, основное внимание в области фармацевтики в мире сосредоточилось на конструировании антител. В результате этого внимания появилось огромное количество новых сконструированных антител, таких как фрагменты антител, конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), антитела с модифицированными эффекторными участками и биспецифичные антитела.

Антитела содействуют их терапевтическим свойствам посредством многих различных механизмов. Антитела могут напрямую ингибировать или активировать целевой антиген, тем самым регулируя передачу сигнала в клетке. Антитела могут ингибировать связывание лиганда с рецептором. Антитела также могут индуцировать или подавлять иммунную реакцию, например, посредством бустирования иммунной системы субъекта для борьбы с инфекцией или злокачественной опухолью (например, в качестве костимуляторов при активации Т-клеток).

Более того, опосредованная антителом интернализация рецептора/антигена клеточной поверхности считается основным механизмом действия для терапевтических антител. В этом случае антитело удаляет мишень с клеточной поверхности и препятствует выполнению ее функции посредством индукции интернализации в клетку. В действительности, одним из предшественников терапевтических средств на основе антител является трастузумаб для лечения злокачественной опухоли молочной железы. Трастузумаб целенаправленно воздействует на ErbB2 рецептор и индуцирует интернализацию комплекса рецептор/антитело, тем самым ингибируя передачу сигнала с участием EGFR. Тем не менее, у антител не всегда проявляются качества эффективной интернализации, следовательно, существует постоянная потребность в антителах с функциями улучшенной интернализации. Соответственно, способы улучшения интернализации известных терапевтических антител являются очень желательными.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящим изобретением предполагаются константные участки тяжелой цепи (называемые "модифицированными константными участками тяжелой цепи") или их функционально эквивалентные фрагменты, которые улучшают биологические свойства антител по сравнению с такими же антителами в немодифицированной форме. Например, антитела, содержащие такие модифицированные константные участки, проявляют повышенную интернализацию и/или агонистическую или антагонистическую активность. Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению представляют собой оптимизированные варианты исходного немодифицированного антитела. В частности, модифицированный константный участок тяжелой цепи включает в себя шарнир IgG2 и три константных домена (т.е. CH1, CH2 и CH3 домены), причем один или несколько из доменов константного участка не относятся к человеческому изотипу IgG2 (например, IgG1, IgG3 или IgG4), или их функционально эквивалентные фрагменты. Модифицированный константный участок может включать в себя соответствующую аминокислотную последовательность дикого типа или ее вариант, например, с одной или несколькими (например, в диапазоне от 1 до 10 или более) аминокислотными заменами или делециями в шарнире или CH1, CH2, CH3 доменах по сравнению с аминокислотной последовательностью дикого типа. Соответственно, аминокислотная последовательность шарнира и/или каждого константного домена по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95% или более (т.е. 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентична соответствующей аминокислотной последовательности дикого типа.

В соответствии с одним вариантом осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи включает в себя 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 дисульфидных связей. В соответствии с одним вариантом осуществления шарнир включает в себя аминокислотную замену C219S по сравнению с шарниром человеческого IgG2 дикого типа. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир содержит аминокислотную последовательность, изложенную 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 соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи включает в себя CH1 домен IgG2, например CH1 домен человеческого IgG2 дикого типа, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности CH1 домена человеческого IgG2 дикого типа (SEQ ID NO: 7).

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный

участок тяжелой цепи включает в себя CH2 домен IgG1, например CH2 домен человеческого IgG1 дикого типа, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности CH2 домена человеческого IgG1 дикого типа. CH2 домен может содержать дополнительные модификации (например, для ослабления или устранения эффекторных функций). В соответствии с определенными вариантами осуществления CH2 домен содержит аминокислотные замены A330S и P331S по сравнению с полноразмерным CH2 человеческого IgG1 дикого типа. В соответствии с определенными вариантами осуществления CH2 домен содержит SEQ ID NO: 24.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи включает в себя CH3 домен IgG1, например CH3 домен человеческого IgG1 дикого типа, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности CH3 домена человеческого IgG1 дикого типа. CH3 домен может дополнительно содержать дополнительные модификации для придания конкретного аллотипа. В соответствии с одним вариантом осуществления CH3 домен содержит аминокислотный остаток E в положении 356 и аминокислоту M в положении 358 по сравнению с полноразмерным человеческим IgG1 дикого типа, относящимся к другому аллотипу. В соответствии с определенными вариантами осуществления CH3 домен содержит SEQ ID NO: 5.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, в котором (a) CH1 домен представляет собой CH1 домен человеческого IgG2 дикого типа или CH1 домен IgG1 дикого типа с дополнительной модификацией или без нее, (b) шарнир представляет собой шарнир IgG2 дикого типа с заменой C219S или без нее, (c) CH2 домен представляет собой CH2 домен человеческого IgG1 дикого типа или CH2 домен IgG2 дикого типа с дополнительными модификациями или без них, и (d) CH3 домен представляет собой CH3 домен человеческого IgG1 дикого типа или CH3 домен человеческого IgG2 дикого типа с аминокислотой E в положении 356 и аминокислотой M в положении 358 или без них. В соответствии с конкретным вариантом осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, например изложенную в любой из SEQ ID NO: 26-37 и 78-93.

Антитела согласно настоящему изобретению (т.е. антитела, имеющие модифицированный константный участок) могут представлять собой полностью человеческие антитела или гуманизированные антитела, и они дополнительно проявляют один или несколько улучшенных или измененных признаков в сравнении с такими же антителами без модифицированного константного участка тяжелой цепи. Эти признаки могут включать в себя повышенную или измененную интернализацию клеткой, агонистическую активность, образование больших перекрестно-сшитых комплексов, ADCC, опосредованную рецептором передачу сигнала, антагонистическую активность, иммуномодулирующую активность и противовоспалительную активность или привнесение нового свойства, например агонистической активности.

Также предполагаются биспецифичные молекулы и иммуноконъюгаты, содержащие модифицированные константные участки согласно настоящему изобретению, а также композиции, которые содержат антитела, биспецифичные молекулы или иммуноконъюгаты и приемлемый фармацевтический носитель. Такие композиции также могут включать в себя одно или несколько дополнительных терапевтических средств, например средство, которое стимулирует иммунную систему, такое как ингибитор иммунных контрольных точек, костимулирующая молекула, антитело к CD39 или антитело к A2AR.

Также предполагаются способы получения антитела, содержащего модифицированный константный участок тяжелой цепи. Определенные способы, представленные в данном документе, включают в себя способы повышения интернализации антитела клеткой и способы повышения агонистической активности антитела в сравнении с таким же антителом, содержащим шарнир, не относящийся к изотипу IgG2. Такие способы предусматривают стадии обеспечения антитела, имеющего шарнир, который не является шарниром IgG2, и замены шарнира на шарнир IgG2 (такой как шарнир, который представляет собой шарнир человеческого IgG2 дикого типа, шарнир, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности шарнира человеческого IgG2 дикого типа, или шарнир, который модифицирован для уменьшения образования дисульфидных связей, например шарнир, который содержит аминокислотную замену C219S). В соответствии с одним вариантом осуществления интернализация антитела усиливается или повышается по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более, приводя в результате к сокращению $T_{1/2}$ по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратному, 3-кратному, 5-кратному или большему сокращению. В соответствии с определенными вариантами осуществления агонистическая активность повышается или усиливается по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более, что определяют по повышенному высвобождению цитокинов или повышенной пролиферации в эффекторных T-клетках; пониженной активности регуляторных T-клеток, если захват на Treg снижает функцию Treg; или по повышенному сокращению количества Treg.

В соответствии с определенными вариантами осуществления способ дополнительно включает в себя стадию замены по меньшей мере одного CH1, CH2 или CH3 доменов на CH1, CH2 или CH3 домен отличающегося изотипа. Такие замены включают в себя, например, (a) замену CH1 домена на CH1 домен IgG1 или CH1 домен IgG2; (b) замену CH2 домена на CH2 домен IgG1 или CH2 домен IgG2 и/или (b) за-

мену СН3 домена на СН3 домен IgG1 или СН3 домен IgG2, причем заменяющий домен имеет последовательность дикого типа или по меньшей мере на 95% идентичен последовательности дикого типа. В соответствии с определенными вариантами осуществления СН1 домен содержит аминокислотную последовательность, которая изложена в SEQ ID NO: 7. В соответствии с определенными вариантами осуществления СН2 домен модифицирован для ослабления или устранения эффекторных функций, например, СН2 домен содержит аминокислотные замены А330S и Р331S (SEQ ID NO: 24). В соответствии с определенными вариантами осуществления СН3 домен содержит аминокислотный остаток Е в положении 356 и аминокислоту М в положении 358 (SEQ ID NO: 5).

Способы, представленные в данном документе, включают в себя способы лечения субъекта посредством введения антитела, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата, содержащих модифицированный константный участок тяжелой цепи. Также можно совместно вводить одно или несколько дополнительных терапевтических средств, например терапевтическое средство, которое стимулирует иммунную систему, такое как ингибитор иммунных контрольных точек, костимулирующая молекула.

В данном документе представлены антитела, содержащие модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит СН1 домен, шарнир, СН2 домен и СН3 домен в порядке от N- к C-концу, и при этом (а) СН1 домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или аминокислотную последовательность, которая отличается от нее не более чем 5 аминокислотами или которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 7, и при этом по меньшей мере одна из С131, R133, E137, S138 или R217 не заменена или удалена; (b) шарнир, содержащий любую 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 5 аминокислотами, причем шарнир не содержит замену или делецию в обеих из C219 и C220; (c) антитело характеризуется по меньшей мере одним улучшенным свойством или новым привнесенным свойством по сравнению с таким же антителом, которое содержит шарнир и СН1 домен IgG1; и (d) модифицированный константный участок тяжелой цепи не представляет собой константный участок IgG2 дикого типа или константный участок IgG2, содержащий C219S и/или C220S. Шарнир может содержать аминокислотную последовательность ERKX-CVECPCPCAP (SEQ ID NO: 129) или ERKXCVECPCPCAP (SEQ ID NO: 130), в которой X представляет собой любую аминокислоту, за исключением цистеина. Например, шарнир может содержать аминокислотную последовательность ERKSCVECPCPCAP (SEQ ID NO: 131) или ERKCSVECPCPCAP (SEQ ID NO: 132). В соответствии с определенными вариантами осуществления по меньшей мере один из или все из аминокислотных остатков P233, V234, A235 и G237 удалены или заменены на другой аминокислотный остаток, например соответствующую аминокислоту в шарнире IgG1. В соответствии с определенными вариантами осуществления ни один из аминокислотных остатков R133, E137, S138 и R217 или ни один из C131, R133, E137, S138 и R217 не заменен или удален. В соответствии с определенными вариантами осуществления N192 и/или F193 заменены на другую аминокислоту. Антитело может содержать СН2 домен, который является по меньшей мере на 95% идентичным СН2 домену у IgG1 дикого типа. Антитело может содержать СН3 домен, который является по меньшей мере на 95% идентичным СН2 домену у IgG1 дикого типа. В соответствии с определенными вариантами осуществления СН2 и/или СН3 домен не представляют собой СН2 и/или СН3 домен IgG1 дикого типа, и антитело обладает эффекторной функцией, которая является более сильной, чем у IgG1 дикого типа. В соответствии с определенными вариантами осуществления СН2 и/или СН3 домен не представляет собой СН2 и/или СН3 домен IgG1 дикого типа, и антитело обладает эффекторной функцией, которая является менее сильной, чем у IgG1 дикого типа. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит СН2 домен и/или СН1 домен, которые по меньшей мере на 95% идентичны таковым у IgG1 или IgG4 дикого типа. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело характеризуется по меньшей мере одним улучшенным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителом интернализации рецептора, ADCC, опосредованной рецептором передачи сигнала, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или вновь привнесенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, в котором (а) СН1 домен представляет собой СН1 домен человеческого IgG2 дикого типа; (b) шарнир содержит любую SEQ ID NO 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) СН2 домен представляет собой СН2 домен человеческого IgG1 дикого типа или модифицированный СН2 домен, придающий антителу усиленную или ослабленную эффекторную функцию; и (d) СН3 домен представляет собой СН3 домен человеческого IgG1 дикого типа или модифицированный СН3 домен, придающий антителу усиленную или ослабленную эффекторную функцию. Модифицированный константный домен тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, причем константный участок тяжелой цепи содержит СН1 до-

мен и шарнир, содержащий последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS

GLYLSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPPAPVLAG (SEQ

ID NO: 133)

или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 133 не более чем 10 аминокислотами или является по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 133, при этом (i) по меньшей мере одна из C131, R133, E137, S138 и R217 не заменена на другую аминокислоту или удалена; (ii) C219 и C220 могут быть заменены на другую аминокислоту или удалены, но обе из C219 и C220 могут быть заменены или удалены; (iii) 1-3 аминокислоты могут быть вставлены между CVE и CPP в шарнире; (iv) шарнир необязательно содержит дополнительную аминокислоту на С-конце, например, G; (v) одна или несколько из аминокислот P233, V234, A235 и G237 могут быть заменены на другую аминокислоту (например, соответствующую аминокислоту из IgG1) или удалены; (vi) CH2 и CH3 домены могут представлять собой CH2 и CH3 домены IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа или модифицированные CH2 и CH3 домены IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; (vii) модифицированный константный участок тяжелой цепи не представляет собой константный участок тяжелой цепи IgG2 дикого типа или константный домен тяжелой цепи IgG2 дикого типа с C219S или C220S; и (viii) антитело характеризуется по меньшей мере одним улучшенным свойством или новым привнесенным свойством по сравнению с таким же антителом, которое содержит шарнир и CH1 домен IgG1. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело характеризуется по меньшей мере одним улучшенным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителом интернализации рецептора, ADCC, опосредованной рецептором передачи сигнала, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или вновь привнесенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность. В соответствии с определенными вариантами осуществления ни одна из аминокислот C131; R133; E137; S138; R217 не заменена другой аминокислотой или удалена. В соответствии с определенными вариантами осуществления N192 и/или F193 не заменены или представляют собой N192S и/или F193L соответственно. В соответствии с определенными вариантами осуществления C219 представляет собой C219S, C220 представляет собой C220S, P233-G237 заменены или удалены; V234-G237 заменены или удалены; A235-G237 заменены или удалены; G237 заменена или удалена; P233 заменена или удалена; P233-V234 заменены или удалены; или P233-A235 заменены или удалены. Антитело может обладать эффекторной функцией, или оно может быть лишено эффекторной функции. Антитело может содержать CH2 домен IgG1 дикого типа или модифицированный CH2 домен IgG1 и или CH3 домен IgG1 дикого типа или модифицированный CH3 домен IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, причем константный участок тяжелой цепи содержит CH1 домен, содержащий последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS

GLYLSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTVE (SEQ ID NO: 7)

или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 7 не более чем 10 аминокислотами или является по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 7, при этом (i) по меньшей мере одна из C131, R133, E137, S138 и R217 не заменена или удалена; (ii) модифицированный константный участок тяжелой цепи не представляет собой константный участок тяжелой цепи IgG2 дикого типа или константный домен тяжелой цепи IgG2 дикого типа с C219S или C220S; и (iii) антитело характеризуется по меньшей мере одним улучшенным свойством или новым привнесенным свойством по сравнению с таким же антителом, которое содержит шарнир и CH1 домен IgG1. Антитело может характеризоваться по меньшей мере одним улучшенным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителом интернализации рецептора, ADCC, опосредованной рецептором передачи сигнала, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или вновь привнесенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность. В соответствии с определенными вариантами осуществления ни одна из аминокислот C131; R133; E137 и S138 не заменена на другую аминокислоту или удалена. В соответствии с определенными вариантами осуществления N192 и/или F193 не заменены или представляют собой N192S и/или F193L соответственно. Антитело может обладать эффекторной функцией, или оно может быть лишено эффекторной функции. Антитело может содержать CH2 домен IgG1 дикого типа или модифицированный CH2 домен IgG1 и/или CH3 домен IgG1 дикого типа или модифицированный CH3 домен IgG1.

Антитело может содержать модифицированный константный участок тяжелой цепи, причем константный участок тяжелой цепи содержит шарнир, содержащий последовательность ERKCCVECPCPPAPVLAG (SEQ ID NO: 8) или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 8 не более чем 5 аминокислотами, при этом (i) C219 и C220 могут быть заменены на другую аминокислоту или удалены, но обе из C219 и C220 могут быть не заменены или удалены; (ii) одна или несколько из аминокислот P233, V234, A235 и G237 могут быть заменены или удалены; (iii) 1-3 аминокислоты могут быть вставлены между CVE и CPP в шарнире; (iv) шарнир необязательно содержит до-

полнительную аминокислоту на С-конце, например, G; (v) CH2 и CH3 домены могут представлять собой CH2 и CH3 домены IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа или модифицированные CH2 и CH3 домены IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4; (vi) модифицированный константный участок тяжелой цепи не представляет собой константный участок тяжелой цепи IgG2 дикого типа или константный домен тяжелой цепи IgG2 дикого типа с C219S или C220S; и (vii) антитело характеризуется по меньшей мере одним улучшенным свойством или новым привнесенным свойством по сравнению с таким же антителом, которое содержит шарнир и CH1 домен IgG1. Антитело может характеризоваться по меньшей мере одним улучшенным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителом интернализации рецептора, ADCC, опосредованной рецептором передачи сигнала, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или вновь привнесенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность. В соответствии с определенными вариантами осуществления C219 представляет собой C219S, C220 представляет собой C220S, P233-G237 заменены или удалены; V234-G237 заменены или удалены; A235-G237 заменены или удалены; G237 заменена или удалена; P233 заменена или удалена; P233-V234 заменены или удалены; или P233-A235 заменены или удалены. Антитело может обладать эффекторной функцией, или оно может быть лишено эффекторной функции. Антитело может содержать CH2 домен IgG1 дикого типа или модифицированный CH2 домен IgG1 и/или CH3 домен IgG1 дикого типа или модифицированный CH3 домен IgG1.

Также предполагаются антитела, содержащие модифицированный константный участок тяжелой цепи, причем константный участок тяжелой цепи содержит шарнир IgG1 или IgG2, и при этом у шарнира отсутствуют 1-7 аминокислот, и при этом антитело характеризуется по меньшей мере одним улучшенным свойством или новым привнесенным свойством по сравнению с таким же антителом, которое содержит шарнир и CH1 домен IgG1. Антитело может характеризоваться по меньшей мере одним улучшенным свойством, выбранным из агонистической активности, опосредованной антителом интернализации рецептора, ADCC, опосредованной рецептором передачи сигнала, антагонистической активности, иммуномодулирующей активности или противоопухолевой активности; или вновь привнесенным свойством, которое представляет собой агонистическую активность. Шарнир может представлять собой шарнир IgG2, у которого отсутствуют 1-4 аминокислоты, например аминокислоты C219, C220, V222 и E224. Шарнир представляет собой шарнир IgG1, у которого отсутствуют аминокислоты S219, C220, D221, K222, T223, H224 и T225. Антитело может содержать CH1 домен IgG2, который является доменом дикого типа или модифицирован; CH1 домен IgG1, который является доменом дикого типа или модифицирован, и CH2 домен IgG1, IgG2 или IgG4 и CH3 домен IgG1, IgG2 или IgG4.

Антитела с модифицированными константными участками тяжелой цепи могут представлять собой человеческие или гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие части. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело специфично связывается с антигеном, который задействован в иммунной регуляции. Антитело может представлять собой агонист костимулирующего рецептора или антагонист ингибирующего рецептора. Например, антитело может связываться с костимулирующим рецептором, например, 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, например, выбранным из группы CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, галектина-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектина-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4. Антиген может представлять собой антиген, чья интернализация требуется, например, CD73. Антиген может представлять собой CD39.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, специфично связывается с костимулирующим рецептором, например GITR, OX40, 4-1BB, CD28, ICOS, CD40, CD27 или любым другим членом суперсемейства TNFR, и содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело проявляет усиленную или измененную агонистическую активность по сравнению с антителом, имеющим такие же переменные участки и легкую цепь, но содержащим константный участок тяжелой цепи IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, специфично связывается с молекулой клеточной поверхности, например CD73, и запускает опосредованную антителом интернализацию молекулы клеточной поверхности, а также содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело характеризуется улучшенными или измененными свойствами интернализации по сравнению с антителом, имеющим такие же переменные участки и легкую цепь, но содержащим константный участок тяжелой цепи IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, специфично связывается с ингибирующим рецептором, например CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, галектином-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектином-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4, и содержит модифицирован-

ный константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело проявляет более сильную или измененную антагонистическую активность или привносит новую активность по сравнению с таким же антителом, имеющим константный участок тяжелой цепи IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, специфично связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает внутриклеточную передачу сигнала, причем антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168. В соответствии с определенными вариантами осуществления внутриклеточная передача сигнала опосредует агонистическую активность, антагонистическую активность, интернализацию молекулы клеточной поверхности или ADCC. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело запускает более сильную внутриклеточную передачу сигнала по сравнению с антителом, имеющим такие же переменные участки и легкую цепь, но содержащим константный участок тяжелой цепи IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, специфично связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает образование высокомолекулярных комплексов антитело-молекула клеточной поверхности, причем антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело запускает образование комплексов с более высокой молекулярной массой по сравнению с антителом, имеющим такие же переменные участки и легкую цепь, но содержащим константный участок тяжелой цепи IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, специфично связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает агрегацию или олигомеризацию молекулы клеточной поверхности, причем антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело запускает большую агрегацию или олигомеризацию молекулы клеточной поверхности по сравнению с антителом, имеющим такие же переменные участки и легкую цепь, но содержащим константный участок тяжелой цепи IgG1.

В данном документе также представлена биспецифичная молекула, содержащая антитело, которое содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, связанное с молекулой, которая характеризуется второй специфичностью связывания. В данном документе также представлены иммуноконъюгаты, содержащие антитело, которое содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, связанное со вторым средством. Также предполагается композиция, содержащая антитело, биспецифичную молекулу или иммуноконъюгат, описанные в данном документе, и носитель. Композиции могут содержать одно или несколько дополнительных терапевтических средств, например терапевтическое средство стимулирует иммунную систему и представляет собой, например, антагонист ингибитора иммунных контрольных точек или костимулирующий рецептор.

В данном документе также представлены способы получения антитела, содержащего модифицированный константный участок тяжелой цепи, причем антитело содержит СН1 домен, шарнир, СН2 домен и СН3 домен в порядке от N- к C-концу, при этом способ предусматривает стадии: (a) обеспечения антитела, содержащего шарнир и/или СН1 домен, которые не являются шарниром IgG2 и/или СН1 доменом IgG2; и (b) замены шарнира и/или СН1 домена на шарнир IgG2 и/или СН1 домен IgG2 соответственно. Кроме того, в данном документе представлены способы повышения интернализации антитела клеткой, предусматривающие: (a) обеспечение антитела, содержащего шарнир и/или СН1 домен, которые не являются шарниром IgG2 и/или СН1 доменом IgG2; и (b) замену шарнира и/или СН1 домена на шарнир IgG2 и/или СН1 домен IgG2 соответственно. Интернализация антитела может быть повышена в сравнении с интернализацией такого же антитела, содержащего шарнир, не относящийся к изотипу IgG2, например антитела, содержащего константный участок IgG1. Также предполагаются способы повышения агонистической активности антитела, предусматривающие: (a) обеспечение антитела, содержащего шарнир и/или СН1 домен, которые не являются шарниром IgG2 и/или СН1 доменом IgG2; и (b) замену шарнира и/или СН1 домена на шарнир IgG2 и/или СН1 домен IgG2 соответственно. Агонистическая активность антитела может быть повышена в сравнении с агонистической активностью такого же антитела, содержащего шарнир, не относящийся к изотипу IgG2, например антитела, содержащего константный участок IgG1. Шарнир IgG2 может представлять собой шарнир человеческого IgG2 дикого типа или содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности шарнира человеческого IgG2 дикого типа и может содержать, например, последовательность, изложенную в табл. 4. Способ может предусматривать стадию замены по меньшей мере одного из СН1, СН2 или СН3 доменов на СН1, СН2 или СН3 домен отличающегося изотипа соответственно. Способ может предусматривать стадии (a) замены СН1 домена на СН1 домен IgG2; (b) замены СН2 домена на СН2 домен IgG1 и/или (b) замены СН3 домена на СН3 домен IgG1. Способ может предусматривать стадии (a) замены СН1 домена на СН1 домен человеческого IgG2 дикого типа или домен, по мень-

шей мере на 95% идентичный ему; (b) замены CH2 домена на CH2 домен человеческого IgG1 дикого типа или домен, по меньшей мере на 95% идентичный ему; и/или (b) замены CH3 домена на CH3 домен человеческого IgG1 дикого типа или домен, по меньшей мере на 95% идентичный ему. Способ может предусматривать стадию замены константного участка тяжелой цепи на модифицированный константный участок тяжелой цепи, содержащий любую из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168, или участок, по меньшей мере на 95% идентичный SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168. Шарнир может быть модифицирован для уменьшения или изменения образования дисульфидных связей. Шарнир может содержать аминокислотную замену C219S. Шарнир может содержать аминокислотную последовательность, изложенную 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. CH1 домен может содержать аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO: 7).

CH2 домен может быть модифицирован для ослабления или устранения эффекторных функций. CH2 домен может содержать аминокислотные замены A330S и P331S. CH2 домен может содержать аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDITLMISRTPREVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO: 4).

CH2 домен может содержать аминокислотные замены A330S и P331S. CH3 домен может содержать аминокислотную последовательность

GQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD

DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMNEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5).

Также предполагаются антитела или их антигенсвязывающая часть, полученные с помощью способов, описанных в данном документе, например, изложенных выше, например, человеческие или гуманизированные антитела. Также в данный документ включены способы лечения субъекта, например субъекта, имеющего злокачественную опухоль, с помощью любого из антител, описанных в данном документе. Способы могут предусматривать введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, например, терапевтических средств, которые стимулируют иммунную систему. Например, терапевтическое средство может целенаправленно воздействовать на ингибитор иммунных контрольных точек или костимулирующую молекулу. Способы могут включать в себя введение композиции, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата, описанных в данном документе.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 в H2228 клетках (линия клеток немелкоклеточной карциномы легкого) под действием следующих антител: антитела 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") в H2228 клетках. Антитела 11F11 (которое относится к изолипу IgG2), CD73.4-IgG2CS, CD73.10-IgG2CS и CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f интернализируются быстрее и в большей степени, чем остальные исследуемые антитела, которые относятся к изолипу IgG1.

На фиг. 1B показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 для тех же антител, что показаны на фиг. 1A, в HCC15 клетках (линия клеток немелкоклеточной карциномы легкого), показывающие результаты, подобные полученным в H2228 клетках.

На фиг. 1C показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 для тех же антител, что показаны на фиг. 1A и 1B, а также для CD73.11-IgG2CS ("11-Vh-hVC-IgG2-C219S") в Calu6 клетках, показывающие результаты, подобные полученным в H2228 и HCC15 клетках.

На фиг. 1D показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 для тех же антител, что показаны на фиг. 1C, в NCI-2030 клетках (линия клеток немелкоклеточной карциномы легкого), показывающие результаты, подобные полученным в H2228, HCC15 и Calu6 клетках.

На фиг. 1E показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 для указанных антител в Calu6 клетках, которые измерены с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 1F показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 для указанных антител в NCI-H292 клетках (линии клеток мукоэпидермоидной карциномы легкого), которые измерены с помощью проточной цитометрии, но в этом случае антитела не отмывали после первого инкубирования клеток с антителами.

На фиг. 1G показано процентное содержание CD73, интернализованного в Calu6 клетки, обработанные указанными антителами, показывающее опосредованную антителом интернализацию CD73 под действием указанных антител в Calu6 клетки со временем.

На фиг. 1H показано процентное содержание CD73, интернализованного в NCI-H292 клетки, обработанные указанными антителами со временем, показывающее опосредованную антителом интернали-

зацию CD73 под действием указанных антител в NCI-H292 клетки со временем.

На фиг. 11 показано процентное содержание CD73, интернализированного в SNU-C1 клетки (линия клеток карциномы ободочной кишки), обработанные указанными антителами со временем, показывающее опосредованную антителом интернализацию CD73 под действием указанных антител в SNU-C1 клетки со временем.

На фиг. 1J показано процентное содержание CD73, интернализированного в NCI-H1437 клетки (линия клеток немелкоклеточной карциномы легкого), обработанные указанными антителами со временем, показывающее опосредованную антителом интернализацию CD73 под действием указанных антител в NCI-H1437 клетки со временем.

На фиг. 2 показаны кинетические характеристики связывания указанных антител к человеческому GITR с активированными антителом к CD3 (в виде покрытия на планшете) и CD28 человеческими CD4 T-клетками и соответствующие величины EC_{50} для них, полученные из графика.

На фиг. 3A-C показана секреция IFN- γ и IL-2 из донорских CD4 T-клеток, стимулируемых растворимыми антителами к человеческому GITR с разными константными участками тяжелой цепи. На фиг. 3A показана секреция IFN- γ из донорских CD4 T-клеток, стимулируемых экспрессирующими ОКТ3 СНО клетками и различными концентрациями антител к человеческому GITR с константным участком IgG2-IgG1. На фиг. 3B показана секреция IL-2 из донорских CD4 T-клеток, стимулируемых экспрессирующими ОКТ3 СНО клетками и различными концентрациями константного домена тяжелой цепи IgG1 или гибридного константного домена тяжелой цепи IgG2-IgG1. На фиг. 3C показана секреция IL-2 из донорских CD4 T-клеток, стимулируемых экспрессирующими ОКТ3 СНО клетками и различными концентрациями вариантов с отсутствующей эффекторной функцией (IgG1.1) антител на фиг. 3A и B.

На фиг. 4 показана секреция IL-2 из 3A9-hGITR клеток, культивируемых на планшетах, покрытых моноклональным антителом к CD3, в присутствии возрастающих количеств указанных антител к человеческому GITR: полученное с использованием гибридомы антитело к GITR (IgG2) и рекомбинантные производные в виде IgG1f, IgG1.1 (с отсутствующей эффекторной функцией) или в виде химеры с шарниром IgG2.

На фиг. 5A-D показан эффект шарнира IgG2 в отношении размера комплексов антитело/антиген. На фиг. 5A-C показаны данные SEC-хроматограммы, данные DLS и данные MALS для комплексов hCD73-his с антителом CD73.4, содержащим разные константные участки. На фиг. 5D показана схематическая модель комплексов hCD73-his/mAb, полученная на основании определенных с помощью MALS масс 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 показано процентное содержание CD73, интернализированного в Calu6 клетки, обработанные указанными антителами со временем, показывающее опосредованную антителом интернализацию CD73 под действием указанных антител в Calu6 клетки со временем.

На фиг. 8B показано процентное содержание CD73, интернализированного в NCI-H292 клетки, обработанные указанными антителами со временем, показывающее опосредованную антителом интернализацию CD73 под действием указанных антител в Calu6 клетки со временем.

На фиг. 8C показан уровень CD73 на поверхности Calu6 клеток, которые обрабатывали указанными антителами в концентрации 5 мкг/мл в течение 0, 5, 15 или 30 мин.

На фиг. 9 показан уровень IL-2, секретируемого CD4+ T-клетками, культивируемыми совместно с СНО-ОКТ3 клетками в присутствии антитела к GITR, имеющего указанные константные участки.

На фиг. 10 показан процент опосредованной антителом интернализации CD73 через 1, 4 или 21 ч после добавления каждого из показанных антител. Столбики для каждого антитела показаны в порядке от 21 ч (слева), 4 ч (посередине) и 1 ч (справа).

На фиг. 11A показано наложение данных SEC-хроматограммы для комплексов в молярном соотношении 1:1 hCD73-his с 16 разными антителами CD73.4, содержащими разные последовательности константного участка.

На фиг. 11B показана детализация данных хроматограммы с 11 по 19,5 мин на хроматограмме с фиг. 10A с указанными 4 отличающимися элюируемыми молекулами.

На фиг. 11C показано процентное отношение площади сигнала на UV-хроматограмме для пика 2 с фиг. 11B, нанесенное на график для 16 разных комплексов антитело/CD73-his. Данные отсортированы слева направо в порядке возрастания площади пика.

На фиг. 12 показано связывание антитела с Fc γ R-his белками, захваченными на Fab к his. Данные отклика на связывание наносят на график в виде процента от теоретического R_{max} из расчета стехиометрического соотношения mAb:Fc γ R 1:1 для реакции связывания. Столбики для каждого антитела показаны в порядке, представленном цветовой легендой внизу слайда.

На фиг. 13 показано связывание антитела с Fc γ R-his белками, захваченными на Fab к his. Данные отклика на связывание наносят на график в виде процента от теоретического R_{max} из расчета стехиометрического соотношения mAb:Fc γ R 1:1 для реакции связывания. Столбики для каждого антитела пока-

заны в порядке, представленном цветовой легендой внизу слайда.

На фиг. 14А показано связывание антитела с FcγR-his белками, захваченными на Fab к his. Данные отклика на связывание наносят на график в виде процента от теоретического Rmax из расчета стехиометрического соотношения mAb:FcγR 1:1 для реакции связывания. Столбики для каждого антитела показаны в порядке, представленном цветовой легендой внизу слайда.

На фиг. 14В показано связывание антитела с FcγR-his белками, захваченными на Fab к his. Данные отклика на связывание наносят на график в виде процента от теоретического Rmax из расчета стехиометрического соотношения mAb:FcγR 1:1 для реакции связывания. Столбики для каждого антитела показаны в порядке, представленном цветовой легендой внизу слайда.

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

На фиг. 16А показан анализ совместной локализации GITR и маркера ранних эндосом EEA2 в момент начала отсчета времени.

На фиг. 16В показан анализ совместной локализации GITR и маркера ранних эндосом EEA2 в момент времени 30 и 120 мин.

На фиг. 16С показаны результаты количественного определения эндосомальной совместной локализации, показанной на фиг. 16А и В, представленные на графике в виде отношения интенсивности совместно локализованных пикселей к общему окрашиванию.

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

На фиг. 17В показана активация передачи сигнала с участием NFκB в CD4+ Т-клетках, обработанных указанными антителами к GITR.

На фиг. 18 показана активация P38 в CD4+ Т-клетках, обработанных указанными антителами к 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, культивируемыми совместно с СНО-ОКТ3 клетками в присутствии разных концентраций антитела к GITR, имеющего указанные константные участки.

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

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

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

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение основывается, по меньшей мере отчасти, на данных, что следующие свойства антител являются улучшенными или измененными, когда антитела содержат шарнир IgG2, по сравнению с такими же антителами, которые содержат шарнир, не относящийся к IgG2 (или по сравнению с такими же антителами, содержащими константный участок IgG1): (i) интернализация; (ii) агонистическая функция; (iii) опосредованная рецептором внутриклеточная передача сигнала; (iv) ADCC и (v) масса комплексов антитело/антиген. Кроме того, эти улучшенные или измененные признаки антител дополнительно улучшаются или изменяются, когда антитела содержат в дополнение к шарниру IgG2 СН1 домен IgG2. Также наблюдали, что антитела, имеющие СН1 домен IgG2, но не имеющие шарнира IgG2, характеризуются повышенными или измененными активностями в сравнении с такими же антителами, имеющими СН1 домен IgG1. Не вдаваясь в конкретный механизм действия, было обнаружено, что усиленные эффекты шарнира IgG2 коррелируют с увеличением размера комплексов антитело/антиген. Увеличенный размер комплексов антитело/антиген в случае, когда антитело имеет шарнир IgG2, может являться результатом более высокой жесткости шарниров IgG2 по сравнению с жесткостью у других изотипов. Более того, было показано, что для сохранения усиленных или измененных активностей в шарнире и СН1 домене IgG2 могут быть модифицированы конкретные участки или аминокислотные остатки, тогда как остальные предпочтительно не модифицируют.

Как дополнительно описано в данном документе, эти модифицированные константные участки тяжелой цепи, придающие антителам (или их антигенсвязывающим участкам) усиленные или модифицированные активности, могут обладать эффекторной функцией. Таким образом, было показано, что можно создать антитела, которые характеризуются полезными свойствами, придаваемыми шарниром и/или СН1 доменом IgG2, а также обладают эффекторной функцией.

Настоящее изобретение по меньшей мере отчасти основывается также на данных, что удаление определенных частей шарнира в антителе IgG1 или IgG2 дает в результате антитело, характеризующееся

улучшенными или измененными свойствами по сравнению с антителом с константным участком IgG1.

Соответственно, в данном документе представлены (i) антитела, имеющие модифицированные константные участки тяжелой цепи, которые придают антигенсвязывающим участкам антител улучшенные или измененные свойства, и способы их применения, а также (ii) способы улучшения или изменения определенных биологических свойств антител, которые содержат шарнир и/или СН1 домен, не относящиеся к IgG2, таких как интернализация, агонизм и антагонизм, причем способ предусматривает замену у антитела шарнира и/или СН1 домена, не относящихся к IgG2, на шарнир IgG2 и/или СН1 домен IgG2 или их часть.

В данном документе представлены "модифицированные константные участки тяжелой цепи", которые улучшают определенные биологические свойства антител, например антител, которые имеют шарнир, не относящийся к IgG2, и/или СН1 домен, не относящийся к IgG2, по сравнению с такими же антителами, имеющими отличающиеся константные участки. Иллюстративные модифицированные константные участки тяжелой цепи включают в себя шарнир IgG2, СН1 домен, СН2 домен и СН3 домен, причем по меньшей мере один из этих константных доменов не относится к изотипу IgG2 и может относиться, например, к IgG1, IgG3 или IgG4. В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир IgG2 и СН2 и СН3 домены IgG1. В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит СН1 домен IgG2 и шарнир IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит СН1 домен IgG2, шарнир IgG2, СН2 домен IgG1 и СН3 домен IgG1. Модифицированный константный участок тяжелой цепи может обладать эффекторной функцией, подобной эффекторной функции у IgG1 дикого типа, или может быть сконструирован таким образом, чтобы он обладал ослабленной или усиленной эффекторной функцией по сравнению с эффекторной функцией у IgG дикого типа. Модифицированный константный участок тяжелой цепи может содержать СН1 дикого типа, шарнир, СН2 и/или СН3 домен или их вариант, например СН1, шарнир, СН2 и/или СН3 домен, имеющие одну или несколько аминокислотных замен, делеций или добавлений, по сравнению с соответствующим доменом дикого типа и/или имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или более идентична соответствующей последовательности дикого типа.

Определения.

Для того чтобы настоящее описание можно было легче понять, в первую очередь определены некоторые термины. Дополнительные определения изложены в подробном описании.

Используемый в данном документе термин "антитело" может включать в себя целые антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (например, антигенсвязывающий фрагмент, который включает в себя шарнир, антигенсвязывающий фрагмент, который включает в себя шарнир и СН1 домен, антигенсвязывающий фрагмент, который включает в себя шарнир и СН2 домен, или антигенсвязывающий фрагмент, который включает в себя шарнир, СН2 домен и часть СН3 домена) или отдельные их цепи. В соответствии с одним вариантом осуществления "антитело" относится к белку, например гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, или к его антигенсвязывающей части. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка тяжелой цепи (обозначаемого в данном документе сокращением V_H) и константного участка тяжелой цепи. В определенных встречающихся в естественных условиях антителах IgG, IgD и IgA константный участок тяжелой цепи состоит из шарнира, СН1 домена, СН2 домена и СН3 домена. В определенных встречающихся в естественных условиях антителах каждая легкая цепь состоит из переменного участка легкой цепи (обозначаемого в данном документе сокращением V_L) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена, C_L . V_H и V_L участки можно дополнительно подразделить на участки с гипервариабельностью, называемые гипервариабельными участками (CDR), чередующиеся с участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента.

Имуноглобулин может происходить из любого из общеизвестных изотипов, в том числе без ограничения IgA, секреторного IgA, IgG и IgM. Изотип IgG делится на подклассы у определенных видов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, описанные в данном документе, относятся к подтипу человеческого IgG1 или IgG2. Имуноглобулины, например человеческий IgG1, существуют в виде нескольких аллотипов, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. Например, "антитело" может включать в себя как встречающиеся в естественных условиях, так и не встречающиеся в естественных условиях антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие антитела и антитела, отличные от человеческих; полностью синтетиче-

ские антитела и одноцепочечные антитела.

В соответствии с определенными вариантами осуществления тяжелая цепь антитела содержит С-концевую лизин; С-концевую глицин (у нее потерян С-концевой лизин), или у нее отсутствует GK или отсутствует К. Что касается антител, содержащих модифицированный константный участок тяжелой цепи, описанный в данном документе, антитело может содержать представленную последовательность, имеющую С-концевые GK или К или в качестве альтернативы лишённую GK или К.

Нумерация аминокислот соответствует нумерации аминокислот в антителе EU, как описано у Kabat. Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD, и соответствует фиг. 3с-3f в публикации заявки на патент США № 2008/0248028.

Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающая часть" антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность к специфичному связыванию с антигеном. Антигенсвязывающая часть антитела может представлять собой "шарнир, содержащий антигенсвязывающую часть". Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином "антигенсвязывающая часть" антитела, описанного в данном документе, включают в себя (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из V_L , V_H , CL и CH1 доменов; (ii) F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из V_H и CH1 доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из V_L и V_H доменов одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из V_H домена; и (vi) выделенный гипервариабельный участок (CDR) или (vii) комбинацию двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Более того, хотя два домена в Fv-фрагменте, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, их можно соединить синтетическим линкером с использованием методов на основе рекомбинации, что обеспечивает возможность их получения в виде одной белковой цепи, в которой V_L и V_H участки спариваются с образованием моновалентных молекул, известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; и Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающая часть" антитела. Эти и другие возможные конструкторы описаны в Chan & Carter (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10:301. Эти фрагменты антитела получают с использованием традиционных методик, известных специалисту в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу в отношении полезности таким же образом, что и интактные антитела. Антигенсвязывающие части можно получить с помощью методик с использованием рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

"CDR" вариабельного домена представляют собой аминокислотные остатки в пределах гипервариабельного участка, которые идентифицированы в соответствии с определениями по Kabat, по Chothia, сочетанием определений Kabat и Chothia, AbM, определением с использованием участков, образующих контакт, и/или конформационным определением или любого способа определения CDR, хорошо известного в уровне техники. CDR антитела можно идентифицировать как гипервариабельные участки, первоначально определенные Kabat et al. См., например, Kabat et al., 1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Положения CDR также можно идентифицировать как петлеобразные структуры, первоначально описанные Chothia и др. См., например, Chothia et al., 1989, *Nature* 342:877-883. Другие подходы к идентификации CDR включают в себя "AbM определение", которое является компромиссом между Kabat и Chothia и получено с использованием программного обеспечения для моделирования антитела AbM от Oxford Molecular (теперь Accelrys®), или "определение с использованием участков, образующих контакт" в CDR, основанное на наблюдаемых контактах с антигеном, изложено в MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745. В еще одном подходе, называемом в данном документе "конформационным определением" CDR, положения CDR можно идентифицировать как остатки, которые вносят энтальпийные вклады в связывание антигена. См., например, Makabe et al., 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166. Другие определения границ CDR могут не следовать точно одному из вышеуказанных подходов, но, тем не менее, перекрываются по меньшей мере с частью CDR согласно Kabat, хотя они могут быть укороченными или удлиненными с учетом результатов прогнозирования или экспериментальных данных о том, что конкретные остатки, или группы остатков, или даже полные CDR не оказывают значительного воздействия на связывание с антигеном. Как используется в данном документе, CDR может относиться к CDR, определенным с помощью любого подхода, известного в уровне техники, в том числе сочетания подходов. В способах, применяемых в данном документе, могут использоваться CDR, определенные в соответствии с любым из этих подходов. Для любого заданного варианта осуществления, содержащего более чем один CDR, CDR могут быть определены в соответствии с любым из определений по Kabat, по Chothia, расширенного определения, AbM, определения с использованием участков, образующих контакт, и/или конформационного определения.

Используемый в данном документе "изотип" относится к классу антител (например, антителу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), который кодируется генами константного домена тяжелой

цепи. Полноразмерная аминокислотная последовательность каждого константного участка человеческого IgG дикого типа (в том числе все домены, т.е. CH1 домен, шарнир, CH2 домен и CH3 домен) занесена в каталог в базе данных UniProt, доступной в режиме онлайн, например, в виде P01857 (IgG1), P01859 (IgG2), P01860 (IgG3) и P01861 (IgG4) или их различных аллотипов (SEQ ID NO: 1, 6, 11 и 16 соответственно). Как используется в данном документе, домен константного участка тяжелой цепи, например шарнир, относится к "изотипу IgG1", "изотипу IgG2", "изотипу IgG3" или "изотипу IgG4", если домен содержит аминокислотную последовательность соответствующего домена из соответствующего изотипа или ее вариант (который характеризуется более высокой гомологией с соответствующим доменом соответствующего изотипа, чем с доменом других изотипов).

"Аллотип" относится к встречающимся в естественных условиях вариантам в пределах группы с конкретным изотипом, причем данные варианты отличаются несколькими аминокислотами (см., например, Jefferies et al. (2009) mAbs 1:1). Антитела, описанные в данном документе, могут относиться к любому аллотипу.

Белок "дикого типа" или его часть представляет собой вариант белка, в виде которого он обнаруживается в естественных условиях. Аминокислотная последовательность белка дикого типа, например константного участка тяжелой цепи, представляет собой аминокислотную последовательность белка, в виде которой он встречается в естественных условиях. Вследствие аллотипических различий может существовать более чем одна аминокислотная последовательность для белка дикого типа. Например, существует несколько аллотипов встречающихся в естественных условиях константных участков тяжелой цепи человеческого IgG1 (см., например, Jeffries et al. (2009) mAbs 1:1).

"Fc-участок" (участок кристаллизуемого фрагмента), или "Fc-домен", или "Fc" относится к C-концевому участку тяжелой цепи антитела, который опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе связывание с Fc-рецепторами, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках), или с первым компонентом (Clq) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-участок антитела изотипа IgG содержит константный участок тяжелой цепи антитела, за исключением первого домена константного участка иммуноглобулина (CH1). У изотипов антител IgG, IgA и IgD Fc-участок содержит константные домены C_{H2} и C_{H3} в каждой из двух тяжелых цепей антитела; Fc-участки IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (C_H домены 2-4) в каждой полипептидной цепи. В случае IgG Fc-участок содержит иммуноглобулиновые домены, состоящие из шарнира, CH2 и CH3. В контексте данного документа Fc-участок определен как начинающийся с аминокислоты 216 и заканчивающийся на аминокислоте 447, причем нумерация соответствует нумерации аминокислот в антителе EU, как описано у Kabat. Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, и соответствует фиг. 3c-3f в публикации заявки на патент США № 2008/0248028. Fc может представлять собой нативный Fc (или Fc, встречающийся в естественных условиях, или Fc дикого типа), в том числе любой аллотипический вариант, или вариантный Fc (например, Fc, встречающийся в естественных условиях), содержащий, например, мутации 1, 2, 3, 4, 5, 1-5, 1-10 или 5-10 или более аминокислот, например замены, добавления или делеции. Например, вариантный 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 мутантные Fc могут обладать усиленной или ослабленной эффекторной функцией и/или характеризоваться увеличенным или уменьшенным периодом полувыведения. CH2 и CH3 участки являются основным сайтом для эффекторных функций и связывания с FcRn. Fc может относиться к этому участку при выделении или в контексте полипептида Fc-содержащего белка, такого как "связывающий белок, содержащий Fc-участок", также называемый "Fc-слитый белок" (например, антитело или иммуноадгезин).

"Эффекторная функция" относится к взаимодействию Fc-участка антитела с Fc-рецептором или лигандом или к биохимическому явлению, которое является результатом такого взаимодействия. Иллюстративные "эффекторные функции" включают в себя связывание Clq, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание с Fc-рецептором, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP) и снижение количества рецептора на клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR). Такие эффекторные функции обычно требуют объединения Fc-участка со связывающим доменом (например, вариативным доменом антитела).

"Fc-рецептор" или "FcR" представляет собой рецептор, который связывается с Fc-участком в иммуноглобулине. FcR, которые связываются с антителом IgG, включают в себя рецепторы семейства FcγR, в том числе аллельные варианты и полученные в ходе альтернативного сплайсинга формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRII и FcγRIV у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIA у людей) и одного ингибирующего (FcγRIIB) рецептора. Различные свойства человеческих FcγR приведены в табл. 1. Большинство характерных типов эффекторных клеток коэкспрессируют один или несколько активирующих FcγR и ингибирующий FcγRIIB, тогда как клетки-натуральные киллеры (NK) селективно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор (FcγRII у мышей и FcγRIIA у людей),

а не ингибирующий FcγRIIB у мышей и людей. Человеческий IgG1 связывается с большинством Fc-рецепторов человека и считается эквивалентным мышинному IgG2a относительно типов активирующих Fc-рецепторов, с которыми он связывается.

Таблица 1

Свойства человеческих FcγR

Fcγ	Аллельные варианты	Аффинность в отношении человеческого IgG	Предпочтение к изотипу	Распространение в клетках
FcγRI	Не описаны	Высокая (K _D ~10 нМ)	IgG1=3>4>>2	Моноциты, макрофаги, активированные нейтрофилы, дендритные клетки?
FcγRIIA	H131	Низкая-средняя	IgG1>3>2>4	Нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки, тромбоциты
	R131	Низкая	IgG1>3>4>2	
FcγRIIA	V158	Средняя	IgG1=3>>4>2	NK-клетки, моноциты, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки?
	F158	Низкая	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIB	I232	Низкая	IgG1=3=4>2	B-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки
	T232	Низкая	IgG1=3=4>2	

"Шарнир", "шарнирный домен", или "шарнирный участок", или "шарнирный участок антитела" относится к домену в константном участке тяжелой цепи, который соединяет CH1 домен с CH2 доменом и включает в себя верхнюю, среднюю и нижнюю части шарнира (Roux et al. J. Immunol. 1998 161:4083). Шарнир обеспечивает изменяющиеся уровни гибкости между связывающими и эффекторными участками антитела, а также обеспечивает сайты для образования межмолекулярных дисульфидных связей между константными участками двух тяжелых цепей. Как используется в данном документе, шарнир начинается в Glu216 и заканчивается в Gly237 для всех изотипов IgG (Roux et al., 1998 J. Immunol. 161:4083). Последовательности шарниров IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 дикого типа приведены в табл. 2.

Таблица 2

Аминокислоты шарнирного участка

Тип Ig	С-концевой C _{H1} *	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 (SEQ ID NO:57)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:61)	CPRCP (SEQ ID NO:66) (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (SEQ ID NO:67)	APELLGG (SEQ ID NO:70)
IgG3 (17-15-15)	VDKRV (SEQ ID NO:57)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:61)	CPRCP (SEQ ID NO:66) (EPKSCDTPPPCPRCP) ₂ (SEQ ID NO:67)	APELLGG (SEQ ID NO:70)
IgG3 (17-15)	VDKRV (SEQ ID NO:57)	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:61)	CPRCP (SEQ ID NO:66) (EPKSCDTPPPCPRCP) ₁ (SEQ ID NO:67)	APELLGG (SEQ ID NO:70)
IgG3 (15-15-15)	VDKRV(SEQ ID NO:57)	EPKS (SEQ ID NO:62)	CDTPPPCPRCP (SEQ ID NO:68) (EPKSCDTPPPCPRCP) ₂ (SEQ ID NO:67)	APELLGG (SEQ ID NO:70)
IgG3 (15)	VDKRV (SEQ ID NO:57)	EPKS (SEQ ID NO:62)	CDTPPPCPRCP (SEQ ID NO:68)	APELLGG (SEQ ID NO:70)
IgG4	VDKRV (SEQ ID NO:57)	ESKYGPP (SEQ ID NO:63)	CPSCP(SEQ ID NO:69)	APEFLGG (SEQ ID NO:70)

* С-концевые аминокислотные последовательности CH1 доменов.

Термин "шарнир" включает в себя шарниры дикого типа (такие как изложенные в табл. 3), а также

их варианты (например, шарниры, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные шарниры). Например, термин "шарнир IgG2" включает в себя шарнир IgG2 дикого типа, который приведен в табл. 3, и варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например, замены, делеции или добавления. Иллюстративные варианты шарнира IgG2 включают в себя шарниры IgG2, в которых 1, 2, 3 или все 4 цистеина (C219, C220, C226 и C229) заменены на другую аминокислоту. В соответствии с конкретным вариантом осуществления шарнир IgG2 содержит замену C219X или C220X, причем X представляет собой любую аминокислоту, за исключением цистеина. Шарнир IgG2 может содержать замену, которая отдельно или вместе с одной или несколькими заменами в других участках тяжелой или легкой цепи будет приводить к тому, что антитело, содержащее шарнир, будет принимать форму А или В (см., например, Allen et al. (2009) *Biochemistry* 48:3755). В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир представляет собой гибридный шарнир, который содержит последовательности от по меньшей мере двух изотипов. Например, шарнир может содержать верхний, средний или нижний шарнир от одного изотипа, а остальную часть шарнира от одного или нескольких других изотипов. Например, шарнир может представлять собой шарнир IgG2/IgG1 и может содержать, например, верхний и средний шарниры IgG2 и нижний шарнир IgG1. Шарнир может обладать эффекторной функцией или может 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 "СН1 домен" относится к константному участку тяжелой цепи, связывающему вариabельный домен с шарниром в константном домене тяжелой цепи. Как используется в данном документе, СН1 домен начинается в А118 и заканчивается в V215. Термин "СН1 домен" включает в себя СН1 домены дикого типа (такие как имеющие SEQ ID NO: 2 для IgG1 и SEQ ID NO: 7 для IgG2; табл. 3), а также их варианты (например, СН1 домены, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные СН1 домены). Например, термин "СН1 домен" включает в себя СН1 домены дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например, замены, делеции или добавления. Иллюстративные СН1 домены включают в себя СН1 домены с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полувыведения. В данном документе предполагается модификации в СН1 домене, которые оказывают воздействие на биологическую активность антитела.

Термин "СН2 домен" относится к константному участку тяжелой цепи, связывающему шарнир с СН3 доменом в константном домене тяжелой цепи. Как используется в данном документе, СН2 домен начинается в P238 и заканчивается в K340. Термин "СН2 домен" включает в себя СН2 домены дикого типа (такие как имеющие SEQ ID NO: 4 для IgG1; табл. 3), а также их варианты (например, СН2 домены, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные СН2 домены). Например, термин "СН2 домен" включает в себя СН2 домены дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например, замены, делеции или добавления. Иллюстративные СН2 домены включают в себя СН2 домены с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полувыведения. В соответствии с определенными вариантами осуществления СН2 домен содержит замены A330S/P331S, которые ослабляют эффекторную функцию. В данном документе предполагается другие модификации в СН2 домене, которые оказывают воздействие на биологическую активность антитела.

Термин "СН3 домен" относится к константному участку тяжелой цепи, который является С-концевым относительно СН2 домена в константном домене тяжелой цепи. Как используется в данном документе, СН3 домен начинается в G341 и заканчивается в K447. Термин "СН3 домен" включает в себя СН3 домены дикого типа (такие как имеющие SEQ ID NO: 5 для IgG1; табл. 3), а также их варианты (например, СН3 домены, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные СН3 домены). Например, термин "СН3 домен" включает в себя СН3 домены дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например, замены, делеции или добавления. Иллюстративные СН3 домены включают в себя СН3 домены с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полувыведения. В данном документе предполагается модификации в СН3 домене, которые оказывают воздействие на биологическую активность антитела.

Таблица 3

Домен	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
CH1 IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KV	2
Шарнир IgG1	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG	3
CH2 IgG1	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAK	4
CH3 IgG1	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKLSLSPGK	5
CH1 IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDK V	7
Шарнир IgG2	ERKCCVECPAPPVAG	8
CH2 IgG2	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI EKTISKTK	9
CH3 IgG2	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE- NNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKLSLSPGK	10
CH1 IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSNTKVDK RV	12
Шарнир IgG3	ELKTPLGDTTHTCPRCE	13
CH2 IgG3	PKSCDTPPPCPRCEPKSCDTPPPCPRCEPKSCDTPPPCPRCPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTFRVVSFLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKTK	14
CH3 IgG3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPE NNYNTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNR FTQKLSLSPGK	15
CH1 IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNHNKPSNTKVDK V	17
Шарнир IgG4	ESKYGPPCPCPAPEFLGG	18
CH2 IgG4	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAK	
CH3 IgG4	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKLSLSLGK	20

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое проявляет одну специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа, или к композиции антител, в которой все антитела проявляют одну специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа. Как правило, такие моноклональные антитела будут происходить из

одной клетки или нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, и они будут передаваться по наследству без намеренного внесения каких-либо изменений в последовательность. Соответственно, термин "человеческое моноклональное антитело" относится к моноклональному антителу, которое имеет переменные и необязательные константные участки, происходящие из последовательностей зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов. В соответствии с одним вариантом осуществления человеческие моноклональные антитела получают с помощью гибридомы, например, полученной путем слияния В-клетки, полученной из трансгенного или трансхромосомного отличного от человека животного (например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи) с иммортализованной клеткой.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает в себя все человеческие антитела, которые получены, экспрессируются, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, такие как (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по отношению к генам человеческих иммуноглобулинов, или из гибридомы, полученной из него, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител, и (d) антитела, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные с помощью любых других средств, которые затрагивают сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные участки, в которых используются конкретные последовательности зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов, кодируемые генами зародышевой линии, но включающие последующие перегруппировки и мутации, которые происходят, например, в ходе созревания антитела. Как известно из уровня техники (см., например, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9): 1117-1125), переменный участок содержит антигенсвязывающий домен, кодируемый различными генами, которые перегруппировываются с образованием антитела, специфичного к чужеродному антигену. Помимо перегруппировки переменный участок может дополнительно модифицироваться за счет многочисленных изменений отдельных аминокислот (называемых соматической мутацией или гипермутацией), повышая аффинность антитела к чужеродному антигену. Константный участок будет меняться при дальнейшем ответе на антиген (т.е. переключение изотипа). Таким образом, подвергшиеся перегруппировке и соматической мутации последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, могут быть не идентичными с исходными последовательностями зародышевого типа, но вместо этого они будут практически идентичными или подобными (т.е. идентичными по меньшей мере на 80%).

"Человеческое" антитело (HuMAb) относится к антителу, имеющему переменные участки, в которых как каркасные участки, так и CDR участки происходят из последовательностей зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов. Более того, если антитело содержит константный участок, константный участок также происходит из последовательностей зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов. Антитела, описанные в данном документе, могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов (например, мутации, вводимые посредством неспецифического или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или при соматической мутации *in vivo*). Тем не менее, не предполагается, что термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, включает антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были пересажены на человеческие каркасные последовательности. Термины "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используются синонимично.

"Гуманизированное" антитело относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все из аминокислот за пределами CDR доменов антитела, не являющегося человеческим, заменены соответствующими аминокислотами, происходящими из человеческих иммуноглобулинов. В соответствии с одним вариантом осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все из аминокислот за пределами CDR доменов были заменены аминокислотами из человеческих иммуноглобулинов, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одного или нескольких CDR участков являются неизменными. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот являются допустимыми при условии, что они не нарушают способность антитела к связыванию с конкретным антигеном. "Гуманизированное" антитело сохраняет антигенную специфичность, подобную специфичности исходного антитела.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором переменные участки происходят из одного вида, а константные участки происходят из другого вида, такому как антитело, в котором переменные участки происходят из мышинового антитела, а константные участки происходят из человеческого антитела.

"Биспецифичное" или "бифункциональное антитело" представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две отличающиеся пары тяжелых/легких цепей, что приводит к образованию двух сайтов связывания антигена со специфичностью в отношении отличающихся антигенов. Биспецифичные антитела можно получить с помощью ряда способов, в том числе слияния гибридом или связывания Fab'-

фрагментов. См., например, 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 в отношении антигена" используются в данном документе взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфично связывается с антигеном".

Используемый в данном документе термин "выделенное антитело", как предполагается, относится к антителу, которое практически не содержит других антител с отличающимися антигенами специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфично связывается с антигеном "х", практически не содержит антител, которые специфично связываются с антигенами, отличными от антигена "х"). Выделенное антитело, которое специфично связывается с эпитопом антигена "х", тем не менее, может характеризоваться перекрестной реактивностью с другими белками антигена "х" из отличающихся видов.

Используемый в данном документе термин "агонистическое антитело" относится к антителу, которое является агонистом костимулирующего рецептора, например к антителу, которое способно бустировать иммунную систему (или иммунную реакцию) субъекта посредством стимуляции активности белка, который, в свою очередь, стимулирует иммунную клетку, например Т-клетку, такого как белок В7-1, В7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, или CD27, DR3, или CD28H. В соответствии с определенными вариантами осуществления агонистическое антитело представляет собой антитело, которое усиливает активность ингибирующего рецептора, например CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 или LAG-3, TIM-3, галектина-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектина-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, CD73, PD1H, LAIR1, TIM-1 или TIM-4, и тем самым подавляет иммунную реакцию.

Используемый в данном документе термин "антагонистическое антитело" относится к антителу, которое является антагонистом ингибирующего сигнала на иммунной клетке, например Т-клетке, например, к антителу, которое способно ингибировать или блокировать белок, который подавляет активацию Т-клеток (например, ингибиторы иммунных контрольных точек), такой как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 или LAG-3, TIM-3, галектин-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, CD73, PD1H, LAIR1, TIM-1, или TIM-4, и тем самым стимулирует иммунную реакцию. В соответствии с определенными вариантами осуществления антагонистическое антитело представляет собой антитело, которое подавляет активность стимулирующего рецептора, например В7-1, В7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, или CD27, DR3, или CD28H, и тем самым подавляет иммунную реакцию.

Как агонистические, так и антагонистические антитела приводят в результате к усилению антиген-специфических Т-клеточных реакций или к подавлению антигенспецифических Т-клеточных реакций (регуляторы иммунных контрольных точек).

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту на антигене (например, GITR), с которым специфично связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы в антигенах белков могут быть образованы как из смежных аминокислот (обычно линейный эпитоп), так и из несмежных аминокислот, расположенных рядом при свертывании белка в третичную структуру (обычно конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, но не всегда сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные при свертывании в третичную структуру, как правило, теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает в себя 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 связываются заданным антителом (т.е. картирования эпитопов), являются широко известными в уровне техники и включают, например, анализы с использованием иммуноблоттинга и иммунопреципитации, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды исследуют в отношении способности реагировать с заданным антителом. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают в себя методики из уровня техники, а также методики, описанные в данном документе, например рентгеноструктурную кристаллографию, 2-мерный ядерный магнитный резонанс и HDX-MS (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)).

Используемый в данном документе термин "встречающийся в естественных условиях" применительно к объекту относится к тому факту, что объект может обнаруживаться в природе. Например, встречающийся в естественных условиях является последовательность полипептида или полинуклеотида, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории.

"Полипептид" относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка при отсутствии верхнего предела в отношении длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как без ограничения гликозилирование, фосфорилирование или дисульфидная связь. "Белок" может содержать один или несколько полипептидов.

Используемый в данном документе термин "молекула нуклеиновой кислоты", как предполагается, включает молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одонитевой

или двунитевой и может представлять собой кДНК.

Также предполагаются "консервативные модификации последовательности" для последовательностей, изложенных в данном документе, которые включают в себя, например, консервативные нуклеотидные и аминокислотные замены, а также добавления и делеции нуклеотидов и аминокислот. Например, модификации можно вводить в SEQ ID NO: 1-74, с помощью стандартных методик, известных в уровне техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные модификации последовательности включают в себя консервативные аминокислотные замены, при которых аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток с подобной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков с подобными боковыми цепями были определены в уровне техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), β -разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

В соответствии с одним вариантом осуществления модификации аминокислотной последовательности в константном участке тяжелой цепи или его домене не модифицируют или нарушают определенные свойства константного участка тяжелой цепи. Эти свойства включают в себя, например, жесткость или негибкость шарнира, а также агонистическую или антагонистическую активность антитела. В соответствии с определенными вариантами осуществления модификации аминокислотной последовательности в константном участке тяжелой цепи или его домене модифицируют или нарушают определенные свойства константного участка тяжелой цепи.

Способы идентификации консервативных аминокислотных замен, которые нарушают и не нарушают свойства антитела и/или константного участка, хорошо известны в уровне техники, например, описаны в данном документе в разделе примеры.

Применительно к нуклеиновым кислотам термин "значительная гомология" указывает на то, что две нуклеиновые кислоты или их определенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными, при соответствующих нуклеотидных вставках или делециях, по меньшей мере приблизительно на 80% нуклеотидов, обычно по меньшей мере приблизительно на 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 98-99,5% нуклеотидов. В качестве альтернативы, значительная гомология существует, когда сегменты будут гибридизоваться при условиях селективной гибридизации с последовательностью, комплементарной их нити.

Применительно к полипептидам термин "значительная гомология" указывает на то, что два полипептида или их определенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными, при соответствующих аминокислотных вставках или делециях, по меньшей мере приблизительно на 80% аминокислот, обычно по меньшей мере приблизительно на 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 98-99,5% аминокислот.

Процентная идентичность двух последовательностей зависит от числа идентичных положений, которые есть в обеих последовательностях в случае, когда последовательности подвергаются оптимальному выравниванию (т.е. % гомологии = число идентичных положений/общее число положений \times 100), причем при определении с помощью оптимального выравнивания принимают во внимание число гэпов и длину каждого гэпа, которые следует ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности двух последовательностей можно выполнить с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Процентную идентичность двух нуклеотидных последовательностей можно определить с помощью программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступен на сайте <http://www.gcg.com>) при использовании матрицы NWSgapdna.CMP, и штрафа за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 80, и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процентную идентичность двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей также можно определить с помощью алгоритма по E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), при использовании таблицы веса остатков PAM120, штрафа за продолжение гэпа 12 и штрафа за открытие гэпа 4. Кроме того, процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей можно определить с помощью алгоритма по Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), который бы включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступен на сайте <http://www.gcg.com>), при использовании 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.

Описанные в данном документе последовательности нуклеиновой кислоты и белка также можно использовать в качестве "последовательности запроса" для проведения поиска в базах данных общего пользования, например для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски можно проводить с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) из Altschul, et al. (1990) J. Mol.

Biol. 215:403-10. Поиски нуклеотидов с помощью BLAST можно проводить с использованием программы NBLAST, вес = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в данном документе. Поиски белков с помощью BLAST можно проводить с использованием программы XBLAST, вес = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам, описанным в данном документе. Для получения выравниваний с гэпами с целью сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию в соответствующих программах (например, XBLAST и NBLAST). См., www.ncbi.nlm.nih.gov.

Используемый в данном документе термин "антиген" относится к любому натуральному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антиген может представлять собой полноразмерный или зрелый белок или его фрагмент.

"Иммунная реакция" относится к биологической реакции внутри позвоночного на чужеродные агенты, причем данная реакция защищает организм от этих агентов и вызываемых ими заболеваний. Иммунная реакция опосредуется действием клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, клетки-натурального киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью (в том числе антитела, цитокины и компоненты комплемента), что приводит в результате к селективному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из организма позвоночного проникших патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, злокачественных или других ненормальных клеток, или, в случаях аутоиммунных реакций или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей. Иммунная реакция включает в себя, например, активацию или подавление Т-клетки, например эффекторной Т-клетки или Th-клетки, такой как CD4+ или CD8+ Т-клетка, или подавление Treg клетки.

"Иммуномодулятор" или "иммунорегулятор" относится к средству, например компоненту пути передачи сигнала, который может быть задействован в модуляции, регуляции или модификации иммунной реакции. "Модуляция", "регуляция" или "модификация" иммунной реакции относится к любому изменению в клетке иммунной системы или изменению активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки). Такая модуляция включает в себя стимуляцию или подавление иммунной системы, которые могут проявляться как повышение или снижение числа различных типов клеток, повышение или снижение активности этих клеток или любые другие изменения, которые могут происходить в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых усиленно функционируют в опухолевом микроокружении. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления иммуномодулятор расположен на поверхности Т-клетки. "Иммуномодулирующая мишень" или "иммунорегуляторная мишень" представляет собой иммуномодулятор, на который оказывает целенаправленное воздействие связывание вещества, средства, фрагмента, соединения или молекулы, и чья активность изменяется при таком связывании. Иммуномодулирующие мишени включают в себя, например, рецепторы на поверхности клетки ("иммуномодулирующие рецепторы") и лиганды рецепторов ("иммуномодулирующие лиганды").

"Иммунотерапия" относится к лечению субъекта, пораженного заболеванием, или имеющего риск заражения, или страдающему от рецидива заболевания, с помощью способа, предусматривающего индукцию, усиление, подавление или иную модификацию иммунной реакции.

"Иммуностимулирующая терапия" или "иммуностимуляторная терапия" относится к терапии, результатом которой является повышение (индукция или усиление) иммунной реакции у субъекта, например, для лечения злокачественной опухоли.

"Усиление эндогенной иммунной реакции" означает повышение эффективности или силы существующей иммунной реакции у субъекта. Это повышение эффективности и силы может быть достигнуто, например, посредством преодоления механизмов, которые подавляют эндогенную иммунную реакцию хозяина, или посредством стимуляции механизмов, которые усиливают эндогенную иммунную реакцию хозяина.

"Т-эффекторные" ("T_{eff}") клетки относятся к Т-клеткам (например, CD4+ и CD8+ Т-клеткам) с цитолитическими активностями, а также к Т-хелперам (Th) клеткам, которые секретируют цитокины, а также активируют другие иммунные клетки и управляют ими, но не включают регуляторные Т-клетки (Treg клетки).

Используемый в данном документе термин "связанный" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т.е. полученной путем слияния с использованием методов на основе рекомбинации). Такие связи можно получать с использованием широкого спектра методов, принятых в данной области техники, таких как химическая конъюгация и получение рекомбинантных белков.

Как используется в данном документе, "введение" относится к физическому введению субъекту композиции, содержащей терапевтическое средство, с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Предпочтительные пути введения

для антител, описанных в данном документе, включают внутривенный, внутривнутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в данном документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, за исключением энтерального и местного введения, обычно путем инъекции и включает в себя без ограничения внутривенную, внутривнутрибрюшинную, внутримышечную, внутриаартериальную, интраклеточную, интралимфатическую, внутривнутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, транстрахеальную, подкожную, внутривнутрикожную, внутривнутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также *in vivo* электропорацию. В качестве альтернативы описанное в данном документе антитело можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно осуществлять, например, однократно, множество раз и/или в течение одного или нескольких длительных периодов.

Используемый в данном документе термин "опосредованная Т-клетками реакция" относится к реакции, опосредованной Т-клетками, в том числе эффекторными Т-клетками (например, CD8+ клетками) и хелперными Т-клетками (например, CD4+ клетками). Опосредованные Т-клетками реакции включают, например, Т-клеточную цитотоксичность и пролиферацию.

Используемый в данном документе термин "реакция цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)" относится к иммунной реакции, индуцируемой цитотоксическими Т-клетками. CTL-реакции преимущественно опосредуются CD8+ Т-клетками.

Используемые в данном документе термины "ингибирует" или "блокирует" (например, в отношении ингибирования/блокирования связывания лиганда с его рецептором или последующей внутриклеточной реакции) используются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело ингибирует связывание по меньшей мере приблизительно на 50%, например по меньшей мере приблизительно на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100%, что определено, например, как описано далее в данном документе.

Используемый в данном документе термин "злокачественная опухоль" относится к обширной группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом ненормальных клеток в организме. Нерегулируемое деление клеток приводит в результате к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые внедряются в прилегающие ткани и могут метастазировать в удаленные части организма через лимфатическую систему или кровоток.

Используемые в данном документе термины "лечить", "осуществлять лечение" и "лечение" относятся к любому типу вмешательства или процессу, осуществляемому с субъектом, или к введению субъекту активного средства с целью обеспечения регрессии, облегчения, ослабления, ингибирования, или замедления, или предупреждения прогрессирования, развития, тяжести или повторного проявления симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. Профилактика относится к введению субъекту, который не имеет заболевания, для предупреждения возникновения заболевания или сведения к минимуму его воздействий, если оно возникло.

"Гематологическая злокачественная опухоль" включает в себя лимфому, лейкоз, миелому или злокачественную опухоль из лимфотканной ткани, а также злокачественную опухоль селезенки и лимфатических узлов. Иллюстративные 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 в себя диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому ассоциированную со слизистой лимфоидной ткани, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (перекликается с хроническим лимфоцитарным лейкозом), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому Беркитта, средостенную В-крупноклеточную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, узловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, селезеночную лимфому из клеток краевой зоны, внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, лимфоидный гранулематоз. Неограничивающие примеры Т-клеточных лимфом включают в себя внеузловую Т-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому кожи, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому. Гематологические злокачественные опухоли также включают в себя лейкоз, такой как, без ограничения, вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелолейкоз и острый лимфобластный лейкоз. Гематологические злокачественные опухоли дополнительно включают в себя миеломы, такие как, без ограничения, множественная миелома и вялотекущая множественная миелома. Термином "гематологическая злокачественная опухоль" охватываются другие гематологические злокачественные опухоли и/или ассоциированные с В-клетками или Т-клетками злокачественные опухоли.

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 доза" лекарственного или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при применении от-

дельно или в комбинации с другим терапевтическим средством способствует регрессии заболевания, подтверждаемой снижением тяжести симптомов заболевания, повышением частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждением ухудшения или инвалидизации, обусловленных поражением заболеванием. "Профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективная доза" лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством субъекту, имеющему риск развития заболевания или риск подвергнуться рецидиву заболевания, подавляет развитие или появление рецидива заболевания. Способность терапевтического или профилактического средства содействовать регрессии заболевания или подавлять развитие или появление рецидива заболевания можно оценить с использованием ряда способов, известных практикующему специалисту в данной области техники, как, например, в ходе клинических испытаний на субъектах-людях, в модельных системах на животных, прогнозирующих эффективность у людей, или путем анализа активности средства в *in vitro* анализах.

Например, противораковое средство представляет собой лекарственное средство, которое замедляет развитие злокачественной опухоли или способствует регрессии злокачественной опухоли у субъекта. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии злокачественной опухоли до момента ликвидации злокачественной опухоли. "Способствует регрессии злокачественной опухоли" означает, что введение эффективного количества лекарственного средства самого по себе или в комбинации с противоопухолевым средством приводит в результате к уменьшению опухолевого роста или размера опухоли, некрозу опухоли, снижению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, повышению частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания, предупреждению ухудшения или инвалидизации, обусловленных поражением заболеванием, или иному ослаблению симптомов заболевания у пациента. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства способствовать регрессии злокачественной опухоли у пациента. Физиологическая безопасность относится к приемлемо низкому уровню токсичности или других неблагоприятных физиологических эффектов на клеточном уровне, на уровне органа и/или организма (неблагоприятные эффекты), являющихся результатом введения лекарственного средства.

В качестве примера для лечения опухолей терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства предпочтительно подавляет рост клеток или опухолевый рост по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60% и даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% в сравнении с субъектами, не получавшими лечение. В соответствии с наиболее предпочтительными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество или доза лекарственного средства полностью подавляет рост клеток или опухолевый рост, т.е. предпочтительно подавляет рост клеток или опухолевый рост на 100%. Способность соединения к подавлению опухолевого роста можно оценить с помощью анализов, описанных ниже. В качестве альтернативы это свойство композиции можно оценить путем исследования способности соединения к подавлению роста клеток, такое подавление можно измерить *in vitro* с помощью анализов, известных практикующему специалисту в данной области техники. В соответствии с другими предпочтительными вариантами осуществления, описанными в данном документе, можно наблюдать регрессию опухоли, и она может длиться в течение периода по меньшей мере приблизительно 20 суток, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 суток или еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60 суток.

Термины "пациент" и "субъект" относятся к любому человеку или животному, отличному от человека, которое получает либо профилактическое, либо терапевтическое лечение. Например, способы и композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения субъекта, имеющего злокачественную опухоль. Термин "отличное от человека животное" включает в себя всех позвоночных, например, млекопитающих и позвоночных, отличных от млекопитающих, как, например, приматов, за исключением человека, овцу, собаку, корову, кур, амфибий, рептилий и т.д.

Описанные в данном документе различные аспекты описаны более подробно в следующих подразделах.

I. Модифицированные константные участки тяжелой цепи.

В данном документе описаны "модифицированные константные участки тяжелой цепи", которые, когда они присутствуют в антителах, улучшают или изменяют определенные биологические свойства или признаки антител по сравнению с такими же антителами, которые не имеют модифицированного константного участка тяжелой цепи, такие как антитела, которые содержат шарнир, не относящийся к IgG2, например антитела IgG1. Улучшенные или измененные биологические свойства антител включают в себя:

- (a) повышенную или измененную интернализацию клеткой;
- (b) повышенную или измененную агонистическую активность;
- (c) повышенную или измененную антагонистическую или блокирующую активность;
- (d) усиленную ADCC;

- (d) получение нового свойства;
- (e) повышенную или измененную передачу сигнала;
- (f) образование больших перекрестно-сшитых комплексов антитело/антиген;
- (g) повышенную агрегацию или олигомеризацию целевой молекулы клеточной поверхности;
- (h) повышенную стимуляцию или усиление иммунной реакции и/или
- (i) повышенное подавление иммунной реакции.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, опосредует антителозависимую интернализацию рецептора (или лиганда или поверхностной молекулы) более эффективно, например антитело интернализирует мишень или поверхностную молекулу (например, рецептор или лиганд) и/или интернализуется 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 таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи и содержит, например, тяжелую цепь IgG1. Скорость и степень интернализации антитела можно определить, например, как показано в разделе Примеры. Скорость интернализации, которая измеряется, например, по $T_{1/2}$ интернализации, например, как показано в разделе Примеры, может быть улучшена или повышена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более, приводя в результате к сокращению $T_{1/2}$ по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратному, 3-кратному, 5-кратному или большему сокращению. Например, вместо имеющегося $T_{1/2}$, составляющего 10 мин, модифицированный константный участок тяжелой цепи может повышать скорость интернализации и тем самым сокращать $T_{1/2}$ до 5 мин (т.е. двукратное повышение скорости интернализации или двукратное снижение $T_{1/2}$). " $T_{1/2}$ " определен как время, за которое достигается половина от максимальной интернализации, которое измеряется с момента времени, когда антитело добавляют к клеткам. В соответствии с определенными вариантами осуществления $T_{1/2}$ снижается по меньшей мере на 10 мин, 30 мин или 1 ч. Максимальный уровень интернализации может представлять собой уровень интернализации при плато на графике, представляющем зависимость интернализации от концентраций антитела или времени. Модифицированный константный участок тяжелой цепи может повышать максимальный уровень интернализации антитела по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более. Другой способ сравнения эффективностей интернализации у разных антител, таких как антитело с модифицированным константным участком тяжелой цепи и такое же антитело без него, заключается в сравнении уровня их интернализации при заданной концентрации антитела (например, 100 нМ) и/или в течение заданного времени (например, 2 мин, 5 мин, 10 мин или 30 мин). Сравнение уровней интернализации также можно выполнить путем сравнения уровней EC_{50} для интернализации. Можно определить уровень интернализации одного антитела по сравнению с уровнем интернализации у заданного (эталонного) антитела, например антитела, описанного в данном документе, например, 11F11 или CD73.4-IgG2CS-IgG1, и его можно указать в виде процента от величины, полученной с заданным (эталонным) антителом. Степень интернализации может быть повышена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более, что можно сравнить с помощью любого из этих способов.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, характеризуется более сильной агонистической активностью по сравнению с таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи и содержит, например, тяжелую цепь IgG1. В соответствии с определенными вариантами осуществления повышенная агонистическая активность усиливает стимулирующую активность целевой молекулы, например G1TR, или других молекул, которые стимулируют или костимулируют иммунную реакцию, например активность Т-клеток. В соответствии с определенными вариантами осуществления повышенная агонистическая активность усиливает ингибирующую активность целевой молекулы, которая подавляет иммунную реакцию, например активность Т-клеток (например, ингибитор иммунных контрольных точек). Усиленную агонистическую активность антитела, которое модулирует активность Т-клеток, можно определить, например, как показано в разделе Примеры, например, путем измерения уровня секреции IFN- γ или IL-2 из Т-клеток, которые приводят в контакт с антителом. Агонистическая активность антитела, которое связывается со стимулирующей мишенью, может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более, что определяют по повышенному высвобождению цитокинов или повышенной пролиферации эффекторных Т-клеток; пониженной активности регуляторных Т-клеток, если захват на Treg снижает функцию Treg; или по повышенному сокращению количества Treg. Например, количество IFN- γ или IL-2, секретируемого из Т-клеток, стимулируемых антителом, которое связывается со стимулирующей мишенью и содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, может быть выше по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более, чем такое количество у Т-клеток, стимулируемых таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи. Агонистическая активность антитела, которое связывается с ингибирующей мишенью, может быть понижена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более, что определяют по повышенному

высвобождению цитокинов или пониженной пролиферации эффекторных Т-клеток; повышенной активности регуляторных Т-клеток или по пониженному сокращению количества Treg. Например, количество IFN- γ или IL-2, которые секретируются из Т-клеток, стимулируемых антителом, которое связывается с ингибирующей мишенью и содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, может быть ниже по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более, чем такое количество у Т-клеток, стимулируемых таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, характеризуется более сильной антагонистической или блокирующей активностью по сравнению с таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи и содержит, например, тяжелую цепь IgG1. Повышенную антагонистическую активность антитела, можно определить, например, путем измерения высвобождения цитокинов и/или пролиферации в условиях, которые включают в себя условия активации Т-клеток. Антагонистическая активность может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, характеризуется усиленной агонистической активностью ADCC по сравнению с таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи и содержит, например, тяжелую цепь IgG1. Усиленную ADCC можно определить в соответствии со способами, известными в уровне техники. ADCC может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 2-кратно, 5-кратно или более.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, характеризуется способностью к образованию больших перекрестно-сшитых комплексов антитело/антиген по сравнению с таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи и содержит, например, тяжелую цепь IgG1. Способность к образованию комплексов можно определить, как описано, например, в разделе Примеры. Комплексы антитело/антиген, образованные с антителом, которое содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, могут быть по меньшей мере на 50%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или 10-кратно больше, чем комплексы, образованные с таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи. В соответствии с определенными вариантами осуществления комплексы массой по меньшей мере 2000; 3000; 5000; 10000, 50000 или 100000 кДа образуются с антителами, имеющими модифицированный константный участок тяжелой цепи.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, запускает большую агрегацию или олигомеризацию целевой молекулы на поверхности клетки по сравнению с таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи и содержит, например, тяжелую цепь IgG1. Степень агрегации и олигомеризации можно определить, например, посредством измерения размера комплексов антитело/антиген.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, участвует в передаче более высокого уровня или отличающегося типа сигнала или передачи сигнала по сравнению с таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи и содержит, например, тяжелую цепь IgG1. Передачу сигнала можно отслеживать посредством определения уровня активации одного или нескольких белков, участвующих в пути передачи сигнала. В соответствии с определенными вариантами осуществления передачу сигнала определяют посредством измерения активности (или фосфорилирования) белка, участвующего в передаче сигнала, например, NKkB или p38, как описано, например, в разделе Примеры. Передача сигнала, запускаемая антителом, которое содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, может быть выше или ниже по меньшей мере на 10%, 20%, 50%, 2-кратно, 5-кратно или более, чем передача сигнала с участием такого же антитела, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи. Например, передача сигнала, запускаемая антителом, которое связывается со стимулирующей молекулой (например, GTR) и содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, может быть усилена по меньшей мере на 10% по сравнению с таковой, полученной с таким же антителом, имеющим тяжелую цепь IgG1. Например, EC₅₀ для активности (например, фосфорилирования) NKkB или p38 может быть снижена по меньшей мере на 50%, 2-кратно, 5-кратно или более.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, характеризуется повышенной способностью к стимуляции или усилению иммунной реакции или иммунной системы по сравнению с таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи и содержит, например, тяжелую цепь IgG1. Повышенная способность к стимуляции иммунной реакции или иммунной системы может являться результатом усиленной агонистической активности костимулирующих Т-клеточных рецепторов и/или усиленной антагонистической активности ингибирующих рецепторов. Повышенная способность к

стимуляции иммунной реакции или иммунной системы может отражаться в кратном повышении EC_{50} или максимального уровня активности в анализе, в котором измеряют иммунную реакцию, например в анализе, в котором измеряют изменения высвобождения цитокинов или хемокинов, цитолитическую активность (определяемую непосредственно на клетках-мишенях или опосредованно через выявление CD107a или гранзимов) и пролиферацию. Способность к стимуляции иммунной реакции или активности иммунной системы может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, характеризуется повышенной антипролиферативной или противоопухолевой активностью по сравнению с таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи и содержит, например, тяжелую цепь IgG1. Повышенную противоопухолевую активность антитела можно определить, например, по росту опухоли у животного, которое было обработано антителом. Противоопухолевая активность может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более. Противоопухолевую активность можно измерить, например, по уменьшению опухолевой нагрузки, например, проявляющемуся в уменьшенных кинетических характеристиках опухолевого роста и полной регрессии опухолей.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, характеризуется повышенной способностью к ингибированию или подавлению иммунной реакции или иммунной системы по сравнению с таким же антителом, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи и содержит, например, тяжелую цепь IgG1. Повышенная способность к ингибированию или подавлению иммунной реакции или иммунной системы может являться результатом усиленной антагонистической активности костимулирующих Т-клеточных рецепторов и/или усиленной агонистической активности ингибирующих рецепторов. Повышенная способность к стимуляции иммунной реакции или иммунной системы может отражаться в кратном повышении EC_{50} или максимального уровня активности в анализе, в котором измеряют иммунную реакцию, например в анализе, в котором измеряют изменения высвобождения цитокинов или хемокинов, цитолитическую активность (определяемую непосредственно на клетках-мишенях или опосредованно через выявление CD107a или гранзимов) и пролиферацию. Способность к ингибированию или подавлению иммунной реакции или активности иммунной системы может быть усилена по меньшей мере на 10%, 30%, 50%, 75%, 2-кратно, 3-кратно, 5-кратно или более.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи или его часть, например шарнир, является более жестким в сравнении с другими константными участками тяжелой цепи, например константными участками тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4. Например, модифицированный константный участок тяжелой цепи представляет собой не встречающийся в естественных условиях константный участок тяжелой цепи, который является более жестким, чем встречающийся в естественных условиях константный участок тяжелой цепи или его шарнир, или имеет часть, например шарнир, которая является более жесткой, чем встречающийся в естественных условиях константный участок тяжелой цепи или его шарнир. Жесткость константного участка тяжелой цепи или ее части, такой как шарнир, можно определить, например, с помощью компьютерного моделирования, электронной микроскопии, спектроскопии, такой как ядерный магнитный резонанс (NMR), рентгеноструктурной кристаллографии (B-факторы) или по скорости осаждения при аналитическом ультрацентрифугировании (AUC) для измерения или сравнения радиуса инерции у антител, содержащих шарнир. В качестве альтернативы жесткость константного участка тяжелой цепи или его части можно определить посредством измерения размеров комплексов антитело/антиген, например, как дополнительно описано в данном документе.

Антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи и проявляющее улучшенное функциональное свойство, которое определено в соответствии с методиками, известными в уровне техники и описанными в данном документе, как будет понятно, относится к статистически значимому различию в конкретной активности по сравнению с такой активностью, наблюдаемой у такого же антитела, но с отличающимся константным участком тяжелой цепи.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир из изотипа IgG2 ("шарнир IgG2") и CH1, CH2 и CH3 доменов. В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир IgG2 и CH1, CH2 и CH3 доменов, причем по меньшей мере один CH1, CH2 и CH3 домен не относится к изотипу IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир IgG2 и CH1, CH2 и CH3 доменов, причем константный домен тяжелой цепи не является константным участком IgG2 дикого типа или не является константным участком IgG2 с мутацией по аминокислоте 219 или 220. Шарнир IgG2 может представлять собой шарнир IgG2 дикого типа, например шарнир человеческого IgG2 дикого типа (например, имеющий SEQ ID NO: 8), или его вариант при условии, что шарнир IgG2 сохраняет способность к приданию антителу усиленной активности по сравнению со способностью такого же антитела, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или содержит тяжелую цепь IgG1. В соответствии с опреде-

ленными вариантами осуществления вариант шарнира IgG2 сохраняет жесткость или негибкость, подобные таковым у шарнира IgG2 дикого типа. Жесткость шарнира можно определить, например, с помощью компьютерного моделирования, электронной микроскопии, спектроскопии, такой как ядерный магнитный резонанс (NMR), рентгеноструктурной кристаллографии (B-факторы) или по скорости осаждения при аналитическом ультрацентрифугировании (AUC) для измерения или сравнения радиуса инерции у антител, содержащих шарнир. Шарнир характеризуется подобной или более высокой жесткостью в сравнении с таковой у другого шарнира, если содержащее шарнир антитело характеризуется значением, полученным в одном из анализов, описанных в предыдущем предложении, которое отличается от значения для такого же антитела с отличающимся шарниром, например шарниром IgG1, менее чем на 5, 10, 25, 50, 75 или 100%. Специалист в данной области техники будет способен определить на основании анализов, характеризуется ли шарнир жесткостью, по меньшей мере подобной жесткости другого шарнира, интерпретируя результаты этих анализов.

Иллюстративный вариант шарнира человеческого IgG2 представляет собой шарнир IgG2, который содержит замену одного или нескольких из четырех цистеиновых остатков (т.е. C219, C220, C226 и C229) на другую аминокислоту. Цистеин может быть заменен серином. Иллюстративный шарнир IgG2 представляет собой шарнир человеческого IgG2, содержащий мутацию C219X или мутацию C220X, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением серина. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир IgG2 не содержит обе из замен C219X и C220X. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир IgG2 содержит C219S или C220S, но не обе из C219S и C220S. Другие варианты шарнира IgG2, которые можно применять, включают в себя шарниры человеческого IgG2, содержащие замену C220, C226 и/или C229, например мутацию C220S, C226S или C229S (которую можно комбинировать с мутацией C219S). Шарнир IgG2 также может представлять собой шарнир IgG2, в котором часть шарнира относится к другому изотипу (т.е. он представляет собой химерный или гибридный шарнир) при условии, что жесткость химерного шарнира является, по меньшей мере, подобной жесткости шарнира IgG2 дикого типа. Например, шарнир IgG2 может представлять собой шарнир IgG2, в котором нижний шарнир (который определен в табл. 2) относится к изотипу IgG1 и представляет собой, например, нижний шарнир IgG1 дикого типа.

"Гибридный" или "химерный" шарнир считается относящимся к конкретному изотипу, если более половины последовательных аминокислот в шарнире происходят из этого изотипа. Например, шарнир, имеющий верхний и средний шарнир из IgG2 и нижний шарнир из IgG1, считают гибридным шарниром IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит шарнир IgG2, содержащий последовательность, которая изложена в табл. 4, например одну из следующих аминокислотных последовательностей: 8, 21, 22, 23, 126-129 и 134-147. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 8, 21, 126, 134 или 135, в которых 1, 2, 3 или все 4 аминокислоты P233, V234, A235 и G237 (соответствующие 4 С-концевым аминокислотам "PVAG" (SEQ ID NO: 148) удалены или заменены на другую аминокислоту, например аминокислоты С-конца шарнира IgG1 (ELLG (SEQ ID NO: 150) или ELLGG (SEQ ID NO: 151)). В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 8, 21, 126, 134 или 135, в которых V234, A235 и G237 удалены или заменены на другую аминокислоту. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 8, 21, 126, 134 или 135, в которых A235 и G237 удалены или заменены на другую аминокислоту. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 8, 21, 126, 134 или 135, в которых V234 и A235 удалены или заменены на другую аминокислоту. Замена PVAG (SEQ ID NO: 143) в IgG2 на соответствующие аминокислоты шарнира IgG1, т.е. (ELLG (SEQ ID NO: 150) или ELLGG (SEQ ID NO: 151)) с получением гибридного шарнира, имеющего SEQ ID NO: 22 или 138 или их варианты (см., например, табл. 4), дает шарнир, обладающий преимуществами шарнира IgG2 и эффекторной функцией шарниров IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир, который состоит из или состоит, по существу, из одной из последовательностей в табл. 4, например SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 127-132 и 134-141, и в соответствии с определенными вариантами осуществления он не содержит дополнительные аминокислотные остатки в шарнире.

Иллюстративные 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-концевой X	ERKCCVECPCPAPPVAGX	143
IgG2 с C219S и с С-концевой X	ERKSCVECPCPAPPVAGX	144
IgG2 с C220S и с С-концевой X	ERKCSVECPCPAPPVAGX	145
IgG2 с C219X и с С-концевой X	ERKXCVECPCPAPPVAGX	146
IgG2 с C220X и с С-концевой X	ERKCXVECPCPAPPVAGX	147
Гибрид IgG2/IgG1	ERKCCVECPCPAPELLGG	22
Гибрид IgG2/IgG1 с C219S	ERKSCVECPCPAPELLGG	23
Гибрид IgG2/IgG1 с C220S	ERKCSVECPCPAPELLGG	127
Гибрид IgG2/IgG1 с C219X	ERKXCVECPCPAPELLGG	136
Гибрид IgG2/IgG1 с C220X	ERKCXVECPCPAPELLGG	137
Гибрид IgG2/IgG1 deltaG	ERKCCVECPCPAPELLG	138
Гибрид IgG2/IgG1 с C219S deltaG	ERKSCVECPCPAPELLG	139
Гибрид IgG2/IgG1 с C220S deltaG	ERKCSVECPCPAPELLG	140
Гибрид IgG2/IgG1 с C219X deltaG	ERKXCVECPCPAPELLG	141
Гибрид IgG2/IgG1 с C220X deltaG	ERKCXVECPCPAPELLG	142
Усеченный IgG2 дикого типа	ERKCCVECPCPAP	128
Усеченный IgG2 дикого типа с C219S	ERKSCVECPCPAP	129
Усеченный IgG2 дикого типа с C220S	ERKCSVECPCPAP	130
Усеченный IgG2 дикого типа с C219X	ERKXCVECPCPAP	131
Усеченный IgG2 дикого типа с C220X	ERKCXVECPCPAP	132

X представляет собой любую аминокислоту, за исключением цистеина.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир IgG2, изложенный в табл. 4, в котором 1-5, 1-3, 1-2 или 1 аминокислота вставлены между аминокислотными остатками CVE и CPP. В соответствии с определенными вариантами осуществления вставлены THT или GGG. В соответствии с определенными вариантами осуществления 1, 1-2 или 1-3 аминокислоты могут быть вставлены между шарниром и CH2 доменом. Например, дополнительный глицин может быть вставлен между шарниром и CH2 доменом.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи представляет собой константный участок IgG1 или IgG2, в котором шарнир содержит делецию 1-10 аминокислот. Как показано в разделе Примеры, антитело IgG1, у которого отсутствуют аминокислотные остатки SCDKTHG (S219, C220, D221, K222, T223, H224 и T225; SEQ ID NO: 149), обеспечивало опосредованную антителом интернализацию CD73 более эффективно, чем такое же антитело, имеющее константный участок IgG1 дикого типа. Аналогично, в случае антитела IgG2 антитело IgG2, у которого отсутствуют аминокислотные остатки CCVE (C219, C220, V222 и E224; SEQ ID NO: 170), обеспечивало опосредованную антителом интернализацию CD73 более эффективно, чем такое же антитело, имеющее константный участок IgG1 дикого типа. Соответственно, в данном документе представлен модифицированный константный участок тяжелой цепи, в котором шарнир содержит делецию 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 соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH1 домен, который представляет собой CH1 домен дикого типа из изоформа IgG1 или IgG2 ("CH1 домен IgG1" или "CH1 домен IgG2" соответственно). Также можно применять CH1 домены из изоформ IgG3 и IgG4 ("CH1 домен IgG3" и "CH1 домен IgG2" соответственно). CH1 до-

мен также может представлять собой вариант CH1 домена дикого типа, например вариант CH1 домена IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты CH1 доменов включают в себя A114C, C131S и/или T173C. CH1 домен, например CH1 домен IgG2, может содержать замену C131S, причем данная замена придает антителу IgG2 или антителу, имеющему CH1 и шарнир IgG2, В-форму (или конформацию).

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH1 домен, который относится к изотипу IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления CH1 домен представляет собой CH1 домен IgG2 дикого типа, например, имеющий аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVTVPSSEFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO: 7).

В соответствии с определенными вариантами осуществления CH1 домен представляет собой вариант SEQ ID NO: 7 и содержит 1-10, 1-5, 1-2 или 1 аминокислотную замену или делецию по сравнению с SEQ ID NO: 7. Как дополнительно описано в разделе Примеры, в данном документе было показано, что CH1 домен IgG2 или его варианты придают антителам улучшенные свойства по сравнению с антителами IgG1 и еще более улучшенные свойства, когда антитела также содержат шарнир IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления варианты CH1 IgG2 не содержат аминокислотную замену или делецию по одному или нескольким из следующих аминокислотных остатков: C131, R133, E137 и S138, причем данные аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом и подчеркиванием в SEQ ID NO: 7, приведенной выше. Например, модифицированный константный участок тяжелой цепи может содержать CH1 домен IgG2, в котором ни одна из R133, E137 и S138 не заменена на другую аминокислоту или удалена, или в котором ни одна из C131, R133, E137 и S138 не заменена на другую аминокислоту или удалена. В соответствии с определенными вариантами осуществления C131 заменена на другую аминокислоту, например C131S, причем данная замена запускает принятие антителом конформации В. Антитела как в конформации А, так и в конформации В, имеющие модифицированные константные участки тяжелой цепи, как было показано в данном документе, характеризуются повышенными активностями по сравнению с таким же антителом с константным участком IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления N192 и/или F193 (показаны в виде выделенных курсивом и подчеркиванием остатков в SEQ ID NO: 7, приведенной выше) заменены на другие аминокислоты, например соответствующие аминокислоты в IgG1, т.е. N192S и/или F193L.

В соответствии с определенными вариантами осуществления один или несколько аминокислотных остатков в CH1 домене IgG2 заменены на соответствующие аминокислотные остатки в IgG4. Например, N192 может представлять собой N192S; F193 может представлять собой F193L; C131 может представлять собой C131K; и/или T214 может представлять собой T214R.

Антитело может содержать модифицированный константный участок тяжелой цепи, содержащий CH1 домен IgG2 или его вариант и шарнир IgG2 или его вариант. Шарнир и CH1 домен могут представлять собой комбинацию любого шарнира IgG2 и CH1 домена IgG2, описанных в данном документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления CH1 и шарнир IgG2 содержат следующую аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVTVPSSEFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTVRKKCCVCEPPCPAPPVAG (SEQ

ID NO: 133)

или аминокислотную последовательность, которая отличается от нее не более чем 1-10 аминокислотами. Варианты аминокислот являются такими, как описано для шарнира и CH1 доменов выше.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела содержат по меньшей мере шарнир IgG2 и необязательно также CH1 домен IgG2 или фрагмент или производное шарнира и/или CH1 домена, и антитело приняло форму (конформации) А (см., например, Allen et al. (2009) Biochemistry 48:3755). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела содержат, по меньшей мере, шарнир IgG2 и необязательно также CH1 домен IgG2 или фрагмент или производное шарнира и/или CH1 домена, и антитело приняло форму В (см., например, Allen et al. (2009) Biochemistry 48:3755).

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH2 домен, который представляет собой CH2 домен дикого типа из изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 ("CH2 домен IgG1", "CH2 домен IgG2", "CH2 домен IgG3" или "CH2 домен IgG4" соответственно). CH2 домен также может представлять собой вариант CH2 домена дикого типа, например, вариант CH2 домена IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты CH2 доменов включают варианты, которые модулируют биологическую активность Fc-участка антитела, такую как ADCC или CDC, или модулируют период полувыведения антитела или его стабильность. В соответствии с одним вариантом осуществления CH2 домен представляет собой CH2 домен человеческого IgG1 с мутацией A330S и/или P331S, причем CH2 домен обладает ослабленной эффекторной функцией в сравнении с таким же CH2 доменом без мутаций. CH2 домен может обладать усиленной эффекторной функцией. CH2 домены 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 мутаций по следующим аминокислотам: E233, G237, P238, H268, P271, L328 и A330. Другие мутации дополнительно изложены в других местах в данном документе.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH3 домен, который представляет собой CH3 домен дикого типа из изо-типа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 ("CH3 домен IgG1", "CH3 домен IgG2", "CH3 домен IgG3" или "CH3 домен IgG4" соответственно). CH3 домен также может представлять собой вариант CH3 домена дикого типа, например вариант CH3 домена IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты CH3 доменов включают варианты, которые модулируют биологическую активность Fc-участка антитела, такую как ADCC или CDC, или модулируют период полувыведения антитела или его стабильность.

В целом, варианты CH1, шарнира, CH2 или CH3 доменов могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более мутаций, и/или не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, или 1-10 или 1-5 мутаций, или могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности дикого типа соответствующего домена (CH1, шарнира, CH2, или CH3 домена соответственно) при условии, что константный участок тяжелой цепи, содержащий конкретный вариант, сохраняет необходимую биологическую активность.

В табл. 5 изложены иллюстративные константные участки тяжелой цепи человека, содержащие человеческие CH1, шарнир, CH2 и/или CH3 домены, причем каждый домен представляет собой либо домен дикого типа, либо его вариант, который предоставляет желаемую биологическую активность константному участку тяжелой цепи. Незаполненная ячейка в табл. 5 указывает, присутствует ли домен или не присутствует, и если он присутствует, то может относиться к любому изотипу, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Например, антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, представленный в табл. 5 под номером 1, представляет собой антитело, которое содержит константный участок тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере шарнир IgG2, и которое также может содержать CH1, CH2 и/или CH3 домен, и если он присутствует, данный CH1, CH2 и/или CH3 домен относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В качестве еще одного примера для понимания табл. 5 антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, представленный под номером 8, представляет собой антитело, которое содержит константный участок тяжелой цепи, содержащий CH1 домен IgG1, шарнир IgG2 и CH2 домен IgG1, и которое также может содержать или не содержать CH3 домен, который, если он присутствует, может относиться к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

МНССР*	СН1	Шарнир	СН2	СН3
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

* модифицированный константный участок тяжелой цепи.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, содержащее константный участок тяжелой цепи, приведенный в табл. 5, характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит такой конкретный константный участок тяжелой цепи, или по сравнению с таким же антителом, которое содержит константный участок IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления способ улучшения биологической активности антитела, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2, и/или СН1 домен, не относящийся к IgG2, предусматривает обеспечение антитела, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2, и/или СН1 домен, не относящийся к IgG2, и замену шарнира, не относящегося к IgG2, и СН1 домена, не относящегося к IgG2, на шарнир IgG2 и СН1 домен IgG2 соответственно. Способ улучшения биологической активности антитела, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, может предусматривать обеспечение антитела, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, и замену его константного участка тяжелой цепи на модифицированный константный участок тяжелой цепи.

Иллюстративные модифицированные константные участки тяжелой цепи представлены в табл. 6, в которой изложена идентификационная информация для каждого из доменов.

Модифицированный константный участок тяжелой цепи	CH1	Шарнир	CH2	CH3	SEQ ID NO целого МНССР
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/I gG1 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/I gG1 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
CH1 IgG1-шарнир IgG2-CH2 IgG1(A330S, P331S)- CH3 IgG1 или IgG1-IgG2-IgG1.1	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:2	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:8	IgG1 A330S/P331 S SEQ ID NO:24	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:30
CH1 IgG1-шарнир IgG2(C219S)-CH2 IgG1(A330S, P331S)- CH3 IgG1	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:2	IgG2 C219S SEQ ID NO:21	IgG1 A330S/P331 S	IgG1 дикого типа	SEQ ID NO:36
или IgG1-IgG2CS-IgG1.1			SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:5	
IgG2-IgG1.1	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:7	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:8	IgG1 A330S/P331 S 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/P331 S SEQ ID NO:24	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:37

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, содержащий шарнир IgG2, который содержит любую из SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 и 137 или их 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 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (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 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (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 является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной любой из SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 или 137, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с таковой у другого константного участка тяжелой цепи, например константного участка тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или по сравнению с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир содержит последовательность, которая представляет собой вариант любой из SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 и 137, причем R217 (вторая аминокислота в шарнире IgG2 дикого типа (SEQ ID NO: 8) не удалена или заменена на другую аминокислоту. В соответствии с определенными вариантами осуществления, при которых шарнир представляет собой вариант любой из SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 и 137, шарнир характеризуется жесткостью, которая является подобной жесткости у IgG2 дикого типа.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит CH1 домен IgG1, содержащий SEQ ID NO: 2, или CH1 домен IgG2, содержащий SEQ ID NO: 7 или вариант SEQ ID NO: 2 или 7, причем данный вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 2 или 7 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 2 или 7 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (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 является по меньшей мере приблизительно на 7%, 8%, 8%, 9%, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 2 или 7, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с активностью другого константного участка тяжелой цепи, например константного участка тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или по сравнению с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит CH2 домен IgG1, содержащий SEQ ID NO: 4 или 24 или вариант SEQ ID NO: 4 или 24, причем данный вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 4 или 24 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 4 или 24 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (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 является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 4 или 24, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с активностью другого константного участка тяжелой цепи, например константного участка тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или по сравнению с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит CH3 домен IgG1, содержащий SEQ ID NO: 5 или вариант SEQ ID NO: 5, причем данный вариант (i) отличается от SEQ ID NO: 5 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 5 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (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 приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 5, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с активностью другого константного участка тяжелой

цепи, например константного участка тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или по сравнению с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

Модифицированные константные участки тяжелой цепи также могут содержать комбинацию СН1, шарнира, СН2 и СН3 доменов, описанных выше.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, описанный в данном документе, или вариант модифицированного константного участка тяжелой цепи, описанного в данном документе, причем данный вариант (i) отличается от модифицированного константного участка тяжелой цепи, описанного в данном документе, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от модифицированного константного участка тяжелой цепи, описанного в данном документе, не более чем 10, 9, 8, 7, 6,5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от модифицированного константного участка тяжелой цепи, описанного в данном 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 приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична модифицированному константному участку тяжелой цепи, описанному в данном документе, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с активностью у другого константного участка тяжелой цепи, например константного участка тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или по сравнению с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, содержащий любую из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168 или вариант любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168, причем данный вариант (i) отличается от любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168 не более чем 10, 9, 8, 7, 6,5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168 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 является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной любой из SEQ ID NO: 26-37, 54-56, 78-125 и 152-168, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с активностью другого константного участка тяжелой цепи, например константного участка тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или по сравнению с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

Модифицированные константные участки тяжелой цепи могут обладать (i) подобной, ослабленной или усиленной эффекторной функцией (например, связыванием с FcγR) в сравнении с константным участком тяжелой цепи дикого типа и/или (ii) подобным, пониженным или повышенным периодом полувыведения (или связыванием с FcRn-рецептором) в сравнении с константным участком тяжелой цепи дикого типа.

II. Антитела с модифицированными константными участками тяжелой цепи и их целевые антигены.

Модифицированные константные участки тяжелой цепи можно использовать у широкого спектра антител, таких как антитела, от которых требуется интернализация (например, конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) и антитела к CD73), агонистическая активность (например, антитела, которые являются эффективными при модулировании иммунных реакций, например при стимулировании активации Т-клеток, такие как агонистические антитела к GITR), антагонистическая активность (например, антитела, которые ингибируют или блокируют белок, который ингибирует иммунную реакцию, например активацию Т-клеток, такие как антагонистическое антитело к PD-1), ADCC, передача сигнала или противоопухолевая активность. Например, интернализация ингибирующего рецептора клеточной поверхности может ограничивать его способность к взаимодействию со своим(своими) рецептором(рецепторами) и снижению клеточной(клеточных) функции(функций).

В соответствии с одним вариантом осуществления антитела, содержащие модифицированный константный домен тяжелой цепи представляют собой антитела, для активности которых требуется их интернализация (например, антитела, которые являются специфичными в отношении рецепторов на поверхности клетки), например, посредством индукции опосредованного рецептором эндоцитоза в случае, когда они связываются с поверхностью клетки. Такие антитела можно применять в качестве средств доставки для целенаправленной доставки лекарственных средств, токсинов, ферментов или ДНК для терапевтических применений. Таким образом, повышение свойств интернализации этих антител является

желательным. Иллюстративные антитела, которые могут получать выгоду от эффективной интернализации, представляют собой конъюгаты антитело-лекарственное средство. Различные анализы для измерения свойств интернализации у антитела известны в уровне техники и описаны в данном документе. В этих анализах используется, например, широкий спектр красителей для мечения антитела, которые можно использовать в анализах с отмывкой или анализах на основе гашения флуоресценции для отслеживания интернализации. Интернализацию антитела также можно отслеживать в анализах без отмывки, которые основываются на флуоресцентных метках.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитела, содержащие модифицированный константный домен тяжелой цепи, представляют собой антитела, для активности которых требуется интернализация антигена, с которым они связываются, например, молекулы клеточной поверхности, такие как рецептор или лиганд. Следовательно, в антителах к белкам клеточной поверхности, понижающая регуляция которых требуется для биологической (например, терапевтической) активности, может применяться модифицированный константный участок тяжелой цепи, описанный в данном документе.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, содержащие модифицированный константный домен тяжелой цепи, связываются с молекулами клеточной поверхности и проявляют агонизм или антагонизм по отношению к биологической активности молекулы клеточной поверхности, например молекулы клеточной поверхности на иммунной клетке, например, Т-клетки, T_{eff}-клетки, Th1-клетки, Th2-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, Treg-клетки, дендритной клетки, макрофага, моноцита, клетки Лангерганса, NK-клетки, супрессорной клетки миелоидного происхождения, В-клетки или любой другой иммунной клетки. Молекула клеточной поверхности может представлять собой стимулирующую, например костимулирующую, молекулу (например, GITR, OX40, CD137, CD40, ICOS и другие члены семейства TNFR), и антитело может дополнительно стимулировать активность (агонистическое антитело), или антитело может ингибировать активность (антагонистическое антитело). Молекула клеточной поверхности может представлять собой ингибирующую молекулу (например, 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 соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, содержащие модифицированный константный домен тяжелой цепи, представляют собой агонистические антитела к стимулирующим (или костимулирующим) молекулам, которые, например, бустируют иммунную систему субъекта, например, посредством индукции секреции IL-2 и/или IFN- γ из Т-клеток (например, антитела к GITR). Другие агонистические антитела, как было показано, активируют APC, стимулируют противоопухолевые Т-клеточные реакции и/или способствуют развитию цитотоксических миелоидных клеток с потенциалом в отношении контроля злокачественной опухоли в отсутствие Т-клеточного иммунитета. Агонистические антитела к стимулирующим молекулам отличаются от антагонистических антител к ингибирующим молекулам, которые блокируют отрицательные иммунные контрольные точки, как, например, антитела к CTLA-4 или антитела к PD-1. Агонистическую активность, как, например, пролиферацию Т-клеток, можно измерить с использованием ряда способов, известных в уровне техники.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, содержащие модифицированный константный домен тяжелой цепи, представляют собой антагонистические антитела к ингибиторам иммунных контрольных точек, бустирующие иммунную реакцию у субъекта посредством блокирования или ингибирования отрицательной иммунной контрольной точки, как, например, антитела к CTLA-4 или антитела к PD-1, например, посредством целенаправленного воздействия на ингибирующий рецептор, экспрессирующийся на активированных Т-клетках. Антагонистическую активность, как, например, ингибирование пролиферации Т-клеток, можно измерить с использованием ряда способов, известных в уровне техники.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело представляет собой (i) агонист костимулирующего рецептора или (ii) антагонист ингибирующего сигнала, например, на Т-клетках, причем оба их этих воздействий могут приводить в результате к усилению антигенспецифических Т-клеточных реакций (регуляторы иммунных контрольных точек). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело представляет собой (i) антагонист костимулирующего рецептора или (ii) агонист ингибирующего сигнала, например, на Т-клетках. Большинство из костимулирующих и коингибирующих молекул являются членами суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), и антитела, имеющие модифицированные константные участки тяжелой цепи, могут связываться с любым из них. Одним важным семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство B7, которое включает в себя 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 участки тяжелой цепи, могут связываться с любым из них. Другим семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство молекул TNF, связывающихся с когнатными членами семейства TNF рецепторов (TNFR), которые включают в себя 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, TAC1, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT α , LT β , LT β R, лимфотоксин α β 2, FAS, FASL (CD178), DR3 (TNFRSF25), RELT, DR6, TROY, NGFR (см., например, Tansey (2009) *Drug Discovery Today* 00:1). Таким образом, антитела, описанные в данном документе, могут связываться с любой из этих поверхностных молекул, и они могут являться, например, (i) агонистами или антагонистами (или ингибиторами или блокирующими средствами) белков семейства IgSF, или семейства B7, или семейства TNFR, которые ингибируют активацию Т-клеток, или антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF; "иммуносупрессорные 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, например, стимуляции, иммунной реакции, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как злокачественная опухоль.

Соответственно, антитело с модифицированным константным доменом тяжелой цепи можно применять в качестве одного из следующих средств:

(1) агонист белка, который стимулирует, например, 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 или CD28H; или

(2) антагонист (ингибитор или блокирующее средство) белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторы иммунных контрольных точек), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 и LAG-3, как описано выше, и один из следующих белков: TIM-3, галектин-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, CD73, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4, CD39.

Другие антитела включают в себя антагонисты ингибирующих рецепторов на NK-клетках и агонисты активирующих рецепторов на NK-клетках, например KTR, TIGIT, NKG2A.

В целом, антитела, которые могут получать выгоду от модифицированного константного участка тяжелой цепи, включают в себя, например, агонистические антитела, которые связываются в качестве лиганда с положительно действующими костимулирующими рецепторами, блокирующие антитела, которые ослабляют передачу сигнала через ингибирующие рецепторы, антагонистические антитела и антитела, которые системно повышают встречаемость противоопухолевых Т-клеток, антитела, которые ослабляют определенные иммунодепрессивные пути в опухолевом микроокружении (например, блокируют захват ингибирующего рецептора (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), сокращают количество Treg или ингибируют их (например, моноклональное антитело к CD25, ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают/предотвращают анергию или истощение Т-клеток), и антитела, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаления в сайтах опухолей. Повышенная интернализация ингибирующих рецепторов может обуславливать более низкий уровень потенциального ингибитора.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, представляет собой антитело, которое конъюгировано с терапевтическим средством с образованием иммуноконъюгата, такого как конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), причем для активности данного иммуноконъюгата требуется интернализация. В ADC антитело функционирует в качестве нацеливающего средства для направления ADC к целевой клетке, экспрессирующей свой антиген, такой как антиген на клетке злокачественной опухоли. В этом случае антиген может представлять собой опухолеассоциированный антиген, т.е. антиген, который экспрессируется или сверхэкспрессируется исключительно клетками злокачественной опухоли. Попав туда, лекарственное средство высвобождается либо внутри целевой клетки, либо вблизи нее, действуя как терапевтическое средство. Для обзора механизма действия и применения ADC в терапии злокачественных опухолей, см. Schrama et al., *Nature Rev. Drug Disc.* 2006, 5, 147.

В случае лечения от злокачественных опухолей терапевтическое средство или лекарственное средство в ADC предпочтительно представляет собой цитотоксическое лекарственное средство, которое вызывает гибель подвергшейся целенаправленному воздействию клетки злокачественной опухоли. Цитотоксические лекарственные средства, которые можно применять в ADC, включают в себя следующие типы соединений, а также их аналоги и производные:

(a) енедины, такие как калихеамицин (см., например, Lee et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 3464 и 3466) и унциаламицин (см., например, Davies et al., WO 2007/038868 A2 (2007), и Chowdari et al., US 8709431 B2 (2012));

(b) тубулизины (см., например, Domling et al., US 7778814 B2 (2010); Cheng et al., US 8394922 B2 (2013); и Cong et al., US 2014/0227295 A1;

(c) CC-1065 и дуокармицин (см., например, Boger, US 6545853 B1 (2003); Sufi et al., US 8461117 B2 (2013); и Zhang et al., US 2012/0301490 A1 (2012));

(d) эпотилоны (см., например, Vite et al., US 2007/0275904 A1 (2007) и US RE42930E (2011));

(e) ауристатинны (см., например, Senter et al., US 6,844,869 B2 (2005), и Doronina et al., US 7498298 B2 (2009));

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

(g) майтансиноиды, такие как DM1 и DM4 (см., например, Chari et al., US 5208020 (1993), и Amphlett et al., US 7374762 B2 (2008)).

В ADC антитело и терапевтическое средство могут быть конъюгированы посредством линкера, например расщепляемого линкера, такого 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 (SEQ ID NO: 169), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser или Glu. ADC можно получать, как описано в патентах США №№ 7087600; 6989452 и 7129261; PCT публикациях международных заявок WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 и WO 08/103693; публикациях заявок на патент США 20060024317; 20060004081 и 20060247295; раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

Иллюстративные мишени ADC, воздействие на которые может быть усилено модифицированным константным участком тяжелой цепи, включают в себя B7H4 (Korman et al., US 2009/0074660 A1); CD19 (Rao-Naik et al., 8097703 B2); CD22 (King et al., US 2010/0143368 A1); CD30 (Keler et al., US 7387776 B2 (2008)); CD70 (Terrett et al., US 8124738 B2); CTLA-4 (Korman et al., US 6984720 B1 (2006)); PD-1 (Korman et al., US 8008449 B2 (2011)); PSMA (Huang et al., US 2009/0297438 A1, и Cardarelli et al., US 7875278 B2); PTK7 (Terrett et al., US 2010/0034826 A1); глипикан-3 (Terrett et al., US 2010/0209432 (A1)); RG1 (Harkins et al., US 7335748 B2(2008)); мезотелин (Terrett et al., US 8268970 B2 (2012)) и CD44 (Xu et al., US 2010/0092484 A1).

III. Способы повышения биологической активности антител.

В данном документе представлены способы повышения биологической активности определенных антител, как, например, одной 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 ADCC;
- (d) получение нового свойства;
- (e) повышенная или измененная передача сигнала;
- (f) образование больших перекрестно-сшитых комплексов антитело/антиген;
- (g) повышенная агрегация или олигомеризация целевой молекулы клеточной поверхности;
- (h) повышенная стимуляция или усиление иммунной реакции и/или
- (i) повышенное ингибирование иммунной реакции.

Способ повышения биологической активности антитела может предусматривать замену константного участка тяжелой цепи или его части, например шарнира и/или CH1 домена, на модифицированный константный участок тяжелой цепи или его часть, например шарнир IgG2 и/или CH1 домен IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления способ повышения биологической активности антитела предусматривает (i) обеспечение антитела, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, описанный в данном документе; и (ii) замену константного участка тяжелой цепи антитела на модифицированный константный участок тяжелой цепи или его часть, что повышает биологическую активность антитела. В соответствии с определенными вариантами осуществления способ повышения биологической активности антитела предусматривает (i) обеспечение антитела, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2 (например, шарнир IgG1, шарнир IgG3 или шарнир IgG4); и (ii) замену в антителе шарнира, не относящегося к IgG2, на шарнир IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления способ повышения биологической активности антитела предусматривает (i) обеспечение антитела, которое содержит шарнир IgG2, не обеспечивающий повышение; и (ii) замену в антителе шарнира IgG2, не обеспечивающего повышение, на шарнир IgG2. "Шарнир IgG2, не обеспечивающий повышение", представляет собой вариант шарнира IgG2, который отличается от шарнира IgG2 таким образом, что он больше не обладает необходимой характеристикой для повышенной биологической активности антитела, например, вариант шарнира, который больше не характеризуется жесткостью шарнира IgG2 дикого типа.

Иллюстративные способы повышения биологической активности антитела предусматривают (i) обеспечение антитела, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или шарнир IgG2, не обеспечивающий повышение, и (ii) замену шарнира на шарнир, содержащий SEQ ID NO: 8, 21, 22, 23, 126-132, 134-136 или 137 или их варианты, например варианты, описанные в данном документе. Способы повышения биологической активности антитела также могут предусматривать (i) обеспечение антитела, содержащего константный участок тяжелой цепи, который не является модифицированным константным участком тяжелой цепи, и (ii) замену константного участка тяжелой цепи на модифицированный константный участок тяжелой цепи. Замена константного участка тяжелой цепи может предусматривать замену CH1, шарнирного, CH2 и/или CH3 домена. Например, константный участок тяжелой цепи можно модифицировать посредством замены шарнира на шарнир IgG2 или его вариант и/или посредством замены CH1 домена на CH1 домен IgG1 или IgG2 или его вариант. В соответствии с определенными вари-

антами осуществления шарнир заменяют на шарнир IgG2, и CH2 домен заменяют на CH2 домен IgG1. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир заменяют на шарнир IgG2, и CH3 домен заменяют на CH3 домен IgG1. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир заменяют на шарнир IgG2, CH1 заменяют на шарнир IgG2, CH2 домен заменяют на CH2 домен IgG1, и CH3 домен заменяют на CH3 домен IgG1. В соответствии с определенными вариантами осуществления константный участок тяжелой цепи заменяют на модифицированные участки 1-27 тяжелой цепи, изложенные в табл. 5 выше, или константные участки тяжелой цепи, изложенные в табл. 6 или описанные в данном документе.

В данном документе также представлены способы повышения биологической активности антитела IgG1 или IgG2, предусматривающие удаление 1-10 аминокислот в шарнире антитела IgG1 или IgG2 соответственно. Например, одна или несколько из аминокислот S219, C22, D221, K222, T223, H224 и T225 могут быть удалены. В соответствии с одним вариантом осуществления все из аминокислот S219, C22, D221, K222, T223, H224 и T225 удалены.

Замена константного участка тяжелой цепи антитела для повышения его биологической активности предпочтительно не сопровождается снижением или значительным снижением активности его связывания с целевым антигеном. Как описано в разделе Примеры, замена константного участка тяжелой цепи антитела к GITR и антитела к CD73 не изменяла значительно их аффинность в отношении антигенов человеческого GITR и человеческого CD73 соответственно.

Будет понятно, что при упоминании замены домена конкретного изоформа на такой же домен отличающегося изоформа, не обязательно в прямом смысле заменять домен, вместо этого может быть необходимо только изменить аминокислоты, которые отличаются у двух изоформ.

Стандартные анализы для оценки связывающей способности антител в отношении антигена у различных видов известны в уровне техники, дополнительно описаны в данном документе и включают в себя, например, ELISA, вестерн-блоттинг и RIA. Подходящие анализы подробно описаны в разделе примеры. Кинетические характеристики связывания (например, аффинность связывания) для антител также можно оценить с помощью стандартных анализов, известных в уровне техники, как, например, с помощью анализа SPR BIACORE®. Анализы для оценки свойств антител, имеющих модифицированные константные участки, (например, связывание лиганда, пролиферация Т-клеток, продукция цитокинов) более подробно описаны ниже и в разделе Примеры.

Иллюстративные антитела, которые могут быть модифицированы, как описано в данном документе, включают в себя, например, антитела для лечения злокачественной опухоли, такие как: Yervoy™ (ипилимумаб) или тремелимумаб (для CTLA-4), галиксимаб (для B7.1), BMS-936558 (для PD-1), CT-011 (для PD-1), MK-3475 (для PD-1), AMP224 (для B7DC), BMS-936559 (для B7-H1), MPDL3280A (для B7-H1), MEDI-570 (для ICOS), AMG557 (для B7H2), MGA271 (для B7H3), IMP321 (для LAG-3), BMS-663513 (для CD137), PF-05082566 (для CD137), CDX-1127 (для CD27), антитело к OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (для OX40L), атацицепт (для TACI), CP-870893 (для CD40), лукатумумаб (для CD40), дацетузумаб (для CD40), муромонаб-CD3 (для CD3), ипилимумаб (для CTLA-4).

Другие антитела, которые могут быть модифицированы, как описано в данном документе, включают в себя антагонистические антитела к PD-1 и PD-L1. Иллюстративное антитело к PD-1, которое может быть модифицировано, как описано в данном документе, представляет собой ниволумаб (BMS-936558); антитело, которое содержит CDR или вариабельные участки одного из антител 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 и 4A11, описанных в международной заявке WO 2006/121168; MK-3475 (ламбролизумаб), описанный в международной заявке WO 2012/145493; AMP-514, описанный в международной заявке WO 2012/145493; CT-011 (пидилизумаб; ранее известный как CT-AcTibody или BAT; см., например, Rosenblatt et al. (2011) J. Immunotherapy 34:409); антитела, описанные в международных заявках WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, WO 2013/173223, патентах США № 7635757 и № 8217149 и публикации заявки на патент США № 2009/0317368.

Дополнительные антитела, которые могут быть модифицированы, включают в себя антитела к PD-L1, например, BMS-936559 (называемые 12A4 в международной заявке WO 2007/005874 и патенте США № 7943743); антитело, которое содержит CDR или вариабельные участки 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, которые описаны в PCT публикации международной заявки WO 07/005874 и патенте США № 7943743; MEDI4736 (также известное как Anti-B7-H1); MPDL3280A (также известное как RG7446); любое из антител к PD-L1, раскрытых в международных заявках WO 2013/173223, WO 2011/066389, WO 2012/145493, патентах США № 7635757 и № 8217149 и публикации заявки на патент США 2009/145493.

Другие антитела, которые могут быть модифицированы, включают в себя антитела к CTLA-4, например, Yervoy™ (ипилимумаб или антитело 10D1, описанное в PCT публикации международной заявки WO 01/14424), тремелимумаб (ранее трицилимумаб, CP-675,206); моноклональное антитело или антитело к CTLA-4, описанное в любой из следующих публикаций: международные заявки WO 98/42752; WO 00/37504; патент США № 6207156; 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 (антитело CP-675206); и Mokyr et al. (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304; и любое из антител к CTLA-4, раскрытых в международной заявке WO 2013/173223.

Другие антитела, которые могут быть модифицированы, включают в себя антитела к LAG-3, например, BMS-986016; IMP731, описанное в заявке на патент США 2011/007023; и IMP-321.

Другие антитела, которые могут быть модифицированы, включают в себя агонистические антитела к GITR, например, антитело 6C8 к GITR или его гуманизированные варианты, описанные в международной заявке WO 2006/105021; антитело, описанное в международной заявке WO 2011/028683; и антитело, описанное в патентном документе JP 2008278814.

Антитела, которые целенаправленно воздействуют на другие антигены, в том числе описанные в других местах в данном документе, также могут быть модифицированы. Например, антитела к Her2, для которых требуется интернализация, например, трастузумаб (герцептин), могут быть модифицированы, как описано в данном документе.

IV. Дополнительные модификации константного домена тяжелой цепи.

В дополнение к модификациям, описанным в данном документе применительно к антителам для повышения их биологической активности, могут быть введены дополнительные мутации, например, в СН1, шарнирный, СН2 или СН3 домен, чтобы воздействовать, например, на эффекторную функцию, связывание с Fc γ R или стабильность антител.

Fc и модифицированные Fc.

Антитела, описанные в данном документе, могут содержать Fc, содержащий одну или несколько модификаций, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полувыведения из сыворотки крови, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Например, можно производить модификации в Fc-участке с целью получения варианта Fc с (a) повышенной или пониженной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC), (b) повышенной или пониженной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC), (c) повышенной или пониженной аффинностью в отношении Clq и/или (d) повышенной или пониженной аффинностью в отношении Fc-рецептора по сравнению с исходным Fc. Такие варианты Fc-участка обычно будут содержать по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в Fc-участке. Полагают, что комбинирование модификаций аминокислот будет особенно желательным. Например, вариантный Fc-участок может включать в себя две, три, четыре, пять замен и т.д., например, в конкретных положениях в Fc-участке, идентифицированных в данном документе. Иллюстративные варианты последовательности Fc раскрыты в данном документе, а также представлены в патентах США №№ 5624821; 6277375; 6737056; 6194551; 7317091; 8101720; РСТ публикации международных заявок 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.

Ослабление эффекторной функции.

Активность ADCC можно снизить путем модификации Fc-участка. В соответствии с определенными вариантами осуществления можно удалить (например, посредством мутации) сайты, которые воздействуют на связывание с Fc-рецепторами, предпочтительно, сайты, отличные от сайтов связывания рецептора реутилизации. В соответствии с другими вариантами осуществления Fc-участок можно модифицировать с удалением сайта ADCC. Сайты ADCC являются известными в уровне техники; см., например, Sarmay et al. (1992) *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9, применительно к сайтам ADCC в IgG1. В соответствии с одним вариантом осуществления вариант человеческого IgG1 с G236R и L328R эффективно устраняет связывание с Fc γ R. Horton et al. (2011) *J. Immunol.* 186:4223; и Chu et al. (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926. В соответствии с другими вариантами осуществления Fc, характеризующийся пониженным связыванием с Fc γ R, содержал аминокислотные замены L234A, L235E и G237A. Gross et al. (2001) *Immunity* 15:289.

Активность CDC также можно снизить путем модификации Fc-участка. Мутации в IgG1 в положениях D270, K322, P329 и P331, в частности аланиновые мутации D270A, K322A, P329A и P331A, значительно снижают способность соответствующего антитела к связыванию Clq и активации комплемента. Idusogie et al. (2000) *J. Immunol.* 164:4178; в международной заявке WO 99/51642. Было показано, что модификация в положении 331 в IgG1 (например, P331S) снижает связывание комплемента. Tao 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 положениях аминокислот 231-239 изменяют, чтобы посредством этого снизить способность антитела фиксировать комплемент. WO 94/29351.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc с пониженной фиксацией комплемента имеет аминокислотные замены A330S и P331S. Gross et al. (2001) *Immunity* 15:289.

Для тех применений, когда эффекторная функция должна быть полностью исключена, например, когда только связывание с антигеном является достаточным для создания желаемого терапевтического благоприятного воздействия, а эффекторная функция приводит только к нежелательным побочным эффектам (или повышает их риск), можно применять антитела IgG4, или могут быть разработаны антитела

или фрагменты, у которых отсутствует Fc-участок или значительная его часть, или Fc может быть мутирован для полного исключения гликозилирования (например, N297A). В качестве альтернативы, был создан гибридный конструктор человеческого IgG2 (C_H1 домен и шарнирный участок) и человеческого IgG4 (C_H2 и C_H3 домены), который лишен эффекторной функции, лишен способности к связыванию с FcγR (подобно IgG2) и неспособен к активации комплемента (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 (обсуждаются модификации Fc для ослабления эффекторной функции в целом).

В соответствии с другими вариантами осуществления Fc-участок изменяют посредством замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на отличающийся аминокислотный остаток для ослабления эффекторной функции (всех эффекторных функций) антитела. Например, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, можно заменить отличающимся аминокислотным остатком так, чтобы антитело характеризовалось пониженной аффинностью в отношении эффекторного лиганда, но сохраняло способность к связыванию антигена, как у исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность в отношении которого изменяют, может представлять собой, например, Fc рецептор (остатки 234, 235, 236, 237, 297) или C1 компонент комплемента (остатки 297, 318, 320, 322). Патенты США № 5624821 и № 5648260, оба за авторством Winter et al.

В международной заявке WO 88/007089 предлагались модификации в Fc-участке IgG для снижения связывания с FcγRI с целью снижения ADCC (234A; 235E; 236A; G237A) или для блокирования связывания с Clq компонентом комплемента с целью исключения 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 (обсуждаются эффекты этих мутаций в отношении связывания с FcγRIII).

Модификации Fc, ослабляющие эффекторную функцию, также включают в себя замены, вставки и делеции в положениях 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325 и 328, как, например, 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L и 328R. Вариант Fc может содержать 236R/328R. Другие модификации для снижения взаимодействий с FcγR и комплементом включают в себя замены 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P и 234V. Эти и другие модификации рассматриваются в Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. Эффекторные функции (как ADCC, так и активация комплемента) могут быть ослаблены при сохранении связывания неонатального FcR (сохранение периода полувыведения) посредством мутирования остатков IgG в одном или нескольких из положений 233-236 и 327-331, как, например, E233P, L234V, L235A, необязательно G236A, A327G, A330S и P331S в IgG1; E233P, F234V, L235A, необязательно G236A в IgG4; и A330S и P331S в IgG2. См. Armour et al. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2613; международная заявка WO 99/58572. Другие мутации, которые ослабляют эффекторную функцию, включают в себя 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 патент США № 5834597); и S228P и L235E для IgG4 (Reddy et al. (2000) *J. Immunol.* 164:1925). Другая комбинация мутаций для ослабления эффекторной функции у человеческого IgG1, включают в себя 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. Дополнительными мутациями, которые, как было выявлено, ослабляют эффекторную функцию в случае слитого белка с Fc (IgG1) (абатацепт), являются C226S, C229S и P238S (нумерация остатков как в антителе EU). Davis et al. (2007) *J. Immunol.* 34:2204.

Другие варианты Fc, характеризующиеся пониженной ADCC и/или CDC, раскрыты в Glaesner et al. (2010) *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26:287 (F234A и L235A для снижения 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 публикации заявки на патент 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 соответствии с определенными вариантами осуществления выбран Fc, у которого, по сути, отсутствует эффекторная функция, т.е. он характеризуется пониженным связыванием с FcγR и пониженной фиксацией комплемента. Иллюстративный Fc, например, Fc IgG1, у которого отсутствует эффекторная функция, содержит следующие пять мутаций: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S. Gross et al. (2001) *Immunity* 15:289. Эти пять замен также можно объединить с N297A для исключения гликозилирования.

Усиление эффекторной функции.

В качестве альтернативы активность ADCC можно повысить путем модификации Fc-участка. По активности ADCC человеческий IgG1 \cong IgG3 \gg IgG4 \cong IgG2, следовательно, константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4, можно выбрать для применения в лекарственном средстве в случае, когда ADCC является желательной. В качестве альтернативы Fc-участок можно модифицировать для повышения антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или для повышения аффинности в отношении Fcγ-рецептора 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 международную заявку WO 00/42072. Иллюстративные замены включают в себя 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D и 332E. Иллюстративные варианты включают в себя 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T и 267E/268F/324T. Например, Fc человеческого IgG1, содержащие вариант с G236A, который необязательно можно объединить с I332E, как было показано, повышают аффинность связывания FcγIIA/FcγIIB примерно в 15 раз. Richards et al. (2008) *Mol. Cancer Therap.* 7:2517; Moore et al. (2010) *mAbs* 2:181. Другие модификации для усиления взаимодействий с FcγR и комплементом включают в себя замены 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I и 396L, но не ограничиваются ими. Эти и другие модификации рассматриваются в Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. В частности, как ADCC, так и CDC могут быть повышены за счет изменений в положении E333 в IgG1, например, E333A. Shields et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591. Применение мутаций P247I и A339D/Q для усиления эффекторной функции у IgG1 раскрыто в международной заявке WO 2006/020114, а применение D280H, K290S ± S298D/V раскрыто в международной заявке WO 2004/074455. Варианты K326A/W и E333A/S, как было показано, усиливают эффекторную функцию у человеческого IgG1, а E333S - у IgG2. Idusogie et al. (2001) *J. Immunol.* 166:2571.

В частности, сайты связывания для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn на человеческом IgG1 были нанесены на карту, а также были описаны варианты с улучшенным связыванием. Shields et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604. Было показано, что конкретные мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII, в том числе у мутантов с комбинациями T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A (характеризующихся повышенным связыванием с FcγRIIIa и активностью ADCC). Были идентифицированы другие варианты IgG1 с сильно повышенным связыванием с FcγRIIIa, в том числе варианты с мутациями S239D/I332E и S239D/I332E/A330L, у которых было показано наибольшее повышение аффинности в отношении FcγRIIIa, понижение связывания FcγRIIb и сильная цитотоксическая активность у особой яванского макака. 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 алектузумаб (CD52-специфичное), трастузумаб (HER2/neu-специфичное), ритуксимаб (CD20-специфичное) и цетуксимаб (EGFR-специфичное), обуславливало значительно усиленную активность ADCC *in vitro*, а вариант с S239D/I332E проявлял усиленную способность к сокращению количества В-клеток 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 и P396L, которые проявляли усиленное связывание с FcγRIIIa и одновременно усиленную активность ADCC у трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий FcγRIIIa, в моделях В-клеточных злокачественных новообразований и злокачественной опухоли молочной железы. Stavenhagen et al. (2007) *Cancer Res.* 67:8882; патент США № 8652466; Nordstrom et al. (2011) *Breast Cancer Res.* 13 :R123.

У разных изоформ IgG также проявляется различающаяся активность CDC (IgG3>IgG1>>IgG2≈IgG4). Dangi et al. (1988) *EMBO J.* 7:1989. Для применений, при которых желательной является повышенная CDC, также является возможным введение мутаций, которые повышают связывание с C1q. Способность к привлечению комплемента (CDC) может быть повышена за счет мутаций в K326 и/или E333 в IgG2, таких как K326W (которая снижает активность ADCC) и E333S, для повышения связывания с C1q, первым компонентом каскада реакций комплемента. Idusogie et al. (2001) *J. Immunol.* 166:2571. Введение S267E/H268F/S324T (по отдельности или в любой комбинации) в человеческий IgG1 усиливает связывание с C1q. Moore et al. (2010) *mAbs* 2:181. Fc-участок антитела "113F" гибридного типа IgG1/IgG3 из Natsume et al. (2008) *Cancer Res.* 68:3863 (фиг. 1 в данном источнике); также придает повышенную CDC. См. также Michaelsen et al. (2009) *Scand. J. Immunol.* 70:553; и Redpath et al. (1998) *Immunology* 93:595.

Дополнительные мутации, которые могут усиливать или ослаблять эффекторную функцию, раскрыты в Dall'Acqua et al. (2006) *J. Immunol.* 177:1129. См. также Carter (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6:343; Presta (2008) *Curr. Opin. Immunol.* 20:460.

Также можно применять варианты Fc, которые повышают аффинность в отношении ингибирующего рецептора FcγRIIb, например, для повышения апоптоз-индуцирующей или адьювантной активности. Li & Ravetch (2011) *Science* 333:1030; Li & Ravetch (2012) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 109:10966; публикация заявки на патент США 2014/0010812. Такие варианты могут предполагать антитело с иммуномодулирующими активностями в отношении FcγRIIb⁺ клеток, в том числе, например, В-клеток и моноцитов. В соответствии с одним вариантом осуществления варианты Fc обеспечивают селективно повышенную аффинность к FcγRIIb в сравнении с одним или несколькими активирующими рецепторами. Модификации для изменения связывания с FcγRIIb включают в себя 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 нумерацией аминокислот в антителе EU. Иллюстративные замены для усиления аффин-

ности к FcγRIIb включают в себя 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, но не ограничиваются ими. Иллюстративные замены включают в себя 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 человеческого IgG1 с мутациями S267E, G236D, S239D, L328F и I332E, в том числе вариант с двойной мутацией S267E + L328F, являются особенно ценными при специфичном повышении аффинности в отношении ингибирующего FcγRIIb рецептора. Chu et al. (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926; публикация заявки на патент США 2006/024298; международная заявка WO 2012/087928. Повышенная специфичность в отношении FcγRIIb (в отличие от FcγRIIa^{R131}) может быть получена путем добавления замены P238D. Mimoto et al. (2013) *Protein. Eng. Des. & Selection* 26:589; международная заявка WO 2012/115241.

Гликозилирование.

Гликозилирование антитела модифицируют с целью усиления или ослабления эффекторной функции. Например, агликозилированное антитело, у которого отсутствуют все эффекторные функции, можно получить посредством мутирования консервативного аспарагинового остатка в положении 297 (например, N297A), тем самым нарушая связывание с комплементом и FcγRI. Bolt et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:403. См. также Tao & Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595 (где использовали N297Q в IgG1 для исключения гликозилирования в положении 297).

Хотя агликозилированные антитела обычно лишены эффекторной функции, для восстановления этой функции могут быть введены мутации. Агликозилированные антитела, например, антитела, полученные в результате мутаций N297A/C/D/ или H или полученные в системах (например, *E. coli*), которые не гликозилируют белки, можно дополнительно мутировать для восстановления связывания с FcγR, например, 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 повышенной ADCC может быть получено посредством изменения гликозилирования. Например, было показано, что удаление фукозы из олигосахаридов, связанных с остатком Asn297 в тяжелой цепи, повышает ADCC, что обусловлено улучшенным связыванием 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 можно получать, например, в нокаутных клетках яичника китайского хомячка (CHO), лишенных фукозилтрансферазы (FUT8) (Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614), или в других клетках, в которых образуются афукозилированные антитела. См., например, Zhang et al. (2011) *mAbs* 3:289; и Li et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210 (в обеих описывается получение антител в подвергнутом воздействию методов гликоинженерии *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; европейский патент EP 1176195B1. ADCC также можно повысить, как описано в PCT публикации международной заявки WO 03/035835, в которой раскрыто применение варианта клеточной линии CHO, Lec13, с уменьшенной способностью к прикреплению фукозы к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит в результате к гипофукозилированию антител, экспрессирующихся в такой клетке-хозяине (см. также, Shields, R.L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). В качестве альтернативы аналоги фукозы можно добавлять в среду культивирования в ходе получения антитела для подавления включения фукозы в углевод на антителе. WO 2009/135181.

Повышение содержания структур с дополнительным остатком GlcNAc в точке ветвления в олигосахаридах, связанных с антителом, также повышает ADCC. В PCT публикации международной заявки WO 99/54342 за авторством Umana et al. описываются клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), таким образом, такие антитела, экспрессирующиеся в сконструированных клеточных линиях, проявляют повышенное содержание структур с дополнительным остатком GlcNAc в точке ветвления, что приводит в результате к повышенной активности ADCC у антител (см. также Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180).

Были разработаны дополнительные варианты гликозилирования, которые лишены остатков галактозы, сиаловой кислоты, фукозы и ксилозы (так называемые GNGN гликоформы), которые проявляют повышенную ADCC и ADCP, но у которых понижена CDC, а также другие, которые лишены сиаловой кислоты, фукозы и ксилозы (так называемые G1/G2 гликоформы), которые проявляют повышенную ADCC, ADCP и CDC. Публикация заявки на патент США № 2013/0149300. Антитела с такими профилями гликозилирования необязательно получают в генетически модифицированных растениях *N. benthamiana*, в которых эндогенные гены ксилозил- и фукозилтрансферазы подверглись нокауту.

Методы гликоинженерии также можно применять для модификации противовоспалительных свойств конструктора IgG посредством изменения содержания α2,6-сиалила в углеводных цепях, прикрепленных к Asn297 в Fc-участках, причем повышенная доля α2,6-сиалилированных форм приводит в результате к повышенным противовоспалительным эффектам. См. Nimmerjahn et al. (2008) *Ann. Rev. Im-*

munol. 26:513. Напротив, снижение доли антител с $\alpha 2,6$ -сиалилированными углеводами может быть полезным в случаях, когда противовоспалительные свойства не требуются. Способы модификации степени $\alpha 2,6$ -сиалилирования антител, например, посредством селективной очистки $\alpha 2,6$ -сиалилированных форм или посредством модификации с помощью фермента, представлены в публикации заявки на патент США № 2008/0206246. В соответствии с другими вариантами осуществления аминокислотная последовательность Fc-участка может быть модифицирована с целью имитации эффекта $\alpha 2,6$ -сиалилирования, например, посредством включения модификации F241 A. WO 2013/095966.

Антитела, описанные в данном документе, могут содержать один или несколько сайтов гликозилирования в вариабельном участке либо легкой, либо тяжелой цепи. Такие сайты гликозилирования могут приводить в результате к повышенной иммуногенности антитела или к изменению pK антитела вследствие измененного связывания с антигеном (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.

Период полувыведения из организма.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело модифицируют для повышения его периода полувыведения из организма. Возможны различные подходы. Например, это может быть выполнено путем повышения аффинности связывания Fc-участка в отношении FcRn. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело изменено в пределах CH1 или CL участка таким образом, чтобы он содержал эпитоп, связывающийся с рецептором реутилизации, заимствованный из двух петель CH2 домена в Fc-участке IgG, как описано в патентах США № 5869046 и № 6121022 за авторством Presta et al. Другие иллюстративные варианты Fc, которые повышают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают в себя замены в положениях 259, 308 и 434, в том числе, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y и 434M. Другие варианты, которые повышают связывание Fc с FcRn, включают в себя: 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. патент США № 8367805.

Модификация определенных консервативных остатков в Fc IgG (I253/H310/Q311/H433/N434), как, например, вариант N434A (Yeung et al. (2009) *J. Immunol.* 182:7663), предлагалась в качестве способа повышения аффинности в отношении FcRn, тем самым повышая период полувыведения антитела из кровотока. WO 98/023289. Было показано, что комбинированный вариант Fc, содержащий M428L и N434S, повышает связывание с FcRn и повышает период полувыведения из сыворотки до пятикратного значения. Zalevsky et al. (2010) *Nat. Biotechnol.* 28:157. Комбинированный вариант Fc, содержащий модификации T307A, E380A и N434A, также увеличивает период полувыведения антител IgG1. Petkova et al. (2006) *Int. Immunol.* 18:1759. Кроме того, было также показано, что комбинированные варианты Fc, содержащие M252Y/M428L, M428L/N434H, M428L/N434F, M428L/N434Y, M428L/N434A, M428L/N434M и M428L/N434S, увеличивают период полувыведения. WO 2009/086320.

Кроме того, комбинированный вариант Fc, содержащий M252Y, S254T и T256E, увеличивает период полувыведения почти в 4 раза. Dall'Acqua et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281:23514. Родственная модификация IgG1, обеспечивающая повышенную аффинность в отношении FcRn, но уменьшенную зависимость от pH (M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F), была применена для создания конструктора IgG1 ("MST-HN Abdeg") для применения в качестве конкурента для предотвращения связывания других антител с FcRn, что приводило к в результате к повышенному клиренсу указанного другого антитела, либо эндогенного IgG (например, в условиях аутоиммунного процесса), либо другого экзогенного (терапевтического) mAb. Vaccaro et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1283; международная заявка WO 2006/130834.

Другие модификации для повышения связывания с FcRn описаны в Yeung et al. (2010) *J. Immunol.* 182:7663-7671; 6277375; 6821505; в международных заявках WO 97/34631; WO 2002/060919.

В соответствии с определенными вариантами осуществления гибридные изотипы IgG можно применять для повышения связывания с FcRn и потенциально возможного увеличения периода полувыведения. Например, гибридный вариант IgG1/IgG3 можно сконструировать, заменяя соответствующие IgG1 положения в CH2 и/или CH3 участках аминокислотами из IgG3 в положениях, по которым два изотипа различаются. Следовательно, можно сконструировать гибридный вариант антитела IgG, который

содержит одну или несколько замен, например, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. В соответствии с другими вариантами осуществления, описанными в данном документе, гибридный вариант IgG1/IgG2 можно сконструировать, заменяя соответствующие IgG2 положения в CH2 и/или CH3 участках на аминокислоты из IgG1 в положениях, по которым два изотипа различаются. Следовательно, можно сконструировать гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или несколько замен, например, одну или несколько из следующих аминокислотных замен:

233E, 234L, 235L, -236G (относится к вставке глицина в положении 236) и 327A. См. патент США № 8629113. Были получены последовательности гибрида IgG1/IgG2/IgG4, которые предположительно повышают период полувыведения из сыворотки и улучшают экспрессию. Патент США № 7867491 (последовательность номер 18 в указанном источнике).

Период полувыведения из сыворотки у антител согласно настоящему изобретению также можно увеличить посредством пегилирования. Антитело можно пегилировать, например, для повышения периода полувыведения антитела из организма (например, из сыворотки). Для пегилирования антитела, как правило, осуществляют реакцию антитела или его фрагмента с полиэтиленгликолем (PEG) реактивом, таким как реакционноспособное сложноэфирное или альдегидное производное PEG, в условиях, при которых одна или несколько групп PEG становятся прикрепленными к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно пегилирование выполняют посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с использованием реакционноспособной молекулы PEG (или аналогичного реакционноспособного водорастворимого полимера). Предполагается, что используемый в данном документе термин "полиэтиленгликоль" охватывает любую из форм PEG, которые использовались для получения производных других белков, как, например, моно(C1-C10)алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, подлежащее пегилированию, представляет собой агликозилированное антитело. Методы пегилирования белков известны в уровне техники, и их можно применять к антителам, описанным в данном документе. См., например, европейский патент EP 0154316 за авторством Nishimura et al. и европейский патент EP 0401384 за авторством Ishikawa et al.

В качестве альтернативы в некоторых обстоятельствах желательным может быть уменьшение периода полувыведения антитела согласно настоящему изобретению, а не его увеличение. Модификации, такие как I253A (Hornick et al. (2000) *J. Nucl. Med.* 41:355) и H435A/R I253A или H310A (Kim et al. (2000) *Em. J. Immunol.* 29:2819), в Fc человеческого IgG1 могут снижать связывание с FcRn, тем самым снижая период полувыведения (повышая клиренс) для применений в ситуациях, когда предпочтительным является быстрый клиренс, как, например, при медицинской визуализации. См. также Kenanova et al. (2005) *Cancer Res.* 65:622. Другие средства для повышения клиренса включают в себя смену формата антигенсвязывающих доменов согласно настоящему изобретению для создания фрагментов антитела, лишенных способности к связыванию с FcRn, таких как Fab фрагменты. Такая модификация может снижать период полувыведения из кровотока у антитела с пары недель до периода порядка нескольких часов. Селективное пегилирование фрагментов антитела можно затем использовать для тонкой настройки (повышения) периода полувыведения фрагментов антитела, если необходимо. Chapman et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:780. Фрагменты антитела также могут быть слиты с человеческим сывороточным альбумином, например, в конструкторе слитого белка, для повышения периода полувыведения. Yeh et al. (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 89:1904. В качестве альтернативы можно сконструировать биспецифичное антитело с первым антигенсвязывающим доменом согласно настоящему изобретению и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывается с человеческим сывороточным альбумином (HSA). См. публикацию международной заявки WO 2009/127691 и ссылки на патентные документы, упоминаемые в ней. В качестве альтернативы для повышения периода полувыведения к фрагментам антител могут быть добавлены специализированные полипептидные последовательности, например полипептидные последовательности "XTEN". Schellenberger et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:1186; публикация международной заявки WO 2010/091122.

Стабильность.

Потенциальный сайт расщепления протеазой в шарнире конструкторов IgG1 можно устранить с помощью модификаций D221G и K222S, что повышает стабильность антитела. WO 2014/043344.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, описанные в данном документе, не содержат сайты изомеризации аспарагина. Дезамидирование аспарагина может происходить в последовательностях N-G или D-G, и оно может приводить в результате к образованию остатка изоаспарагиновой кислоты, который может вносить изгиб в полипептидную цепь и может снижать ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты).

Каждое антитело будет характеризоваться уникальной изоэлектрической точкой (pI), которая обычно попадает в диапазон значений pH от 6 до 9,5. pI для антитела IgG1, как правило, попадает в пределы диапазона значений pH 7-9,5, и pI для антитела IgG4, как правило, попадает в пределы диапазона значений pH 6-8. Существует предположение, что антитела с pI за пределами нормального диапазона могут характеризоваться некоторым разворачиванием и нестабильностью в условиях *in vivo*. Следовательно, предпочтительно иметь антитело, имеющее значение pI, которое попадает в нормальный диапазон. Этого можно достичь либо посредством селекции антител с pI в нормальном диапазоне, либо посредством мутирования заряженных поверхностных остатков.

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

больше чем 70°C. Температуру плавления антитела можно измерить с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al. (2003) *Pharm. Res.* 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999) *Immunol. Lett.* 68:47-52) или кругового дихроизма (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления выбирают антитела, которые не разрушаются быстро. Разрушение антитела можно измерить с помощью капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander A.J. and Hughes D.E. (1995) *Anal. Chem.* 67:3626-32).

При применении константного домена IgG4 предпочтительным обычно является включение замены S228P, которая имитирует последовательность шарнира в IgG1 и тем самым стабилизирует молекулы IgG4, например, снижая обмен Fab-областями между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 у пациента, получающего лечение. Labrijn et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:767; Reddy et al. (2000) *J. Immunol.* 164:1925. Подобным образом, у антител, содержащих шарнир IgG2, мутация C219S и/или C220S стабилизирует антитело, содержащее шарнир IgG2.

Агрегация.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления выбирают антитела, характеризующиеся минимальными эффектами агрегации, которые могут приводить к запуску нежелательной иммунной реакции и/или к измененным или неблагоприятным фармакокинетическим свойствам. Обычно приемлемыми являются антитела с агрегацией, составляющей 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. Агрегацию можно измерить с помощью нескольких методик, в том числе с помощью колоночной гель-хроматографии (SEC), высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) и рассеяния света.

V. Белки, не являющиеся антителами, и производные антител.

Настоящее изобретение, описанное в данном документе, также можно применять к молекулам, которые не являются полноразмерными антителами, при условии, что они содержат шарнир. Например, можно получать слитые белки IgG с повышенной биологической активностью. Соответственно, в данном документе представлены слитые белки, содержащие активный фрагмент, связанный, например ковалентно связанный, с константным участком IgG, например Fc-участком, содержащим шарнир IgG2 и необязательно CH2 и CH3 домены или их части. Fc может представлять собой любой Fc модифицированного константного участка тяжелой цепи, описанного в данном документе, как, например, части Fc модифицированных константных участков тяжелой цепи, изложенных в табл. 5 и 6.

Антитела, описанные в данном документе, также можно применять для образования биспецифичных молекул. Антитела или его антигенсвязывающие части можно дериватизировать или связать с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора) с образованием биспецифичной молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Антитела, описанные в данном документе, можно дериватизировать или связать более чем с одной отличной функциональной молекулой с образованием мультиспецифичных молекул, которые связываются с более чем двумя разными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; также предполагается, что такие мультиспецифичные молекулы охватываются термином "биспецифичная молекула", используемым в данном документе. Для создания биспецифичной молекулы можно обеспечить функциональную связь (например, посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) антитела, описанного в данном документе, с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, таким образом, чтобы в результате образовалась биспецифичная молекула.

VI. Композиции.

Также предполагаются композиции, например фармацевтические композиции, содержащие одно антитело или комбинацию антител или их антигенсвязывающую(антигенсвязывающие) часть(части), описанные в данном документе, составленные вместе фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать в себя одно антитело, или иммуноконъюгат, или биспецифичную молекулу, описанные в данном документе, или комбинацию (например, двух или более различных) антител, или иммуноконъюгатов, или биспецифичных молекул, описанных в данном документе. Например, фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов, или биспецифичных молекул), которые связываются с разными эпитопами на антигене-мишени или которые характеризуются взаимодополняющими активностями.

В соответствии с определенными вариантами осуществления композиция содержит антитело, описанное в данном документе, в концентрации по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 1-300 или 100-300 мг/мл.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, также можно вводить в рамках комплексной терапии, т.е. комбинировать с другими средствами. Например, комплексная терапия может включать в себя антитело, описанное в данном документе, комбинируемое по меньшей мере с одним другим противораковым средством и/или средством, стимулирующим (например, активирующим) Т-клетки. Примеры терапевтических средств, которые можно применять в комплексной терапии, более

подробно описаны ниже в разделе, посвященном применениям антител, описанных в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтические композиции, раскрытые в данном документе, могут включать другие соединения, лекарственные средства и/или средства, применяемые для лечения злокачественной опухоли. Такие соединения, лекарственные средства и/или средства могут включать в себя, например, химиотерапевтические лекарственные средства, лекарственные средства на основе малых молекул или антитела, которые стимулируют иммунную реакцию в отношении заданной злокачественной опухоли. В некоторых случаях терапевтические композиции могут включать в себя, например, одно или несколько из антитела к CTLA-4, антитела к PD-1, антитела к PDL-1, антитела к OX40 (также известен как CD134, TNFRSF4, ACT35 и/или TXGP1L) или антитела к LAG-3.

Как используется в данном документе, "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотоничные средства и средства, задерживающие абсорбцию, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифичную молекулу, можно обеспечить покрытием из материала для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения, описанные в данном документе, могут включать в себя одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не придает каких-либо нежелательных токсических эффектов (см., например, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Примеры таких солей включают в себя соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают в себя соли, полученные с нетоксичными неорганическими кислотами, такими как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т.п., а также с нетоксичными органическими кислотами, такими как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Соли присоединения основания включают в себя соли, полученные с щелочно-земельными металлами, такими как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также с нетоксичными органическими аминами, такими как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглуксамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, также может включать в себя фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат, α -токоферол и т.п. и (3) средства, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях, описанных в данном документе, включают в себя воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные сложные эфиры органических кислот, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования материалов покрытия, таких как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и за счет использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение присутствия микроорганизмов может обеспечиваться как за счет процедур стерилизации, *surgra*, так и за счет включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение в композиции изотоничных средств, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть обусловлена включением средств, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии непосредственно перед приемом. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных субстратов известно в уровне техники. За исключением тех случаев, когда любая общепринятая среда или средство являются несовместимыми с активным соединением, предполагается их применение в фармацевтических композициях, описанных в данном документе. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными при условиях производства и хранения. Композицию можно составить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. 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 предпочтительным является включение в композицию изотоничных средств, например сахаров, многоатомных спиртов, таких как маннит, сорбит, или хлорида натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть обусловлена включением в композицию средства, которое задерживают абсорбцию, например моностеаратных солей и желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно приготовить путем включения активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним из вышеперечисленных ингредиентов или их комбинацией, если это необходимо, с последующей стерилизацией с помощью микрофильтрации. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильную среду, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента, а также любого дополнительного желаемого ингредиента из их раствора, ранее подвергнутого стерилизации фильтрованием.

Количество активного ингредиента, который можно объединить с материалом-носителем с получением лекарственной формы для однократного введения, будет изменяться в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, который можно объединить с материалом-носителем с получением лекарственной формы для однократного введения, обычно будет являться таким количеством композиции, которое обеспечивает терапевтический эффект. В целом, из общего количества в виде ста процентов это количество будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 99% активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 70% в, наиболее предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить одну разовую дозу, несколько разделенных доз можно вводить в течение некоторого времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать, на что указывают потребности терапевтической ситуации. Особенно преимущественным является составление парентеральных композиций в единичной лекарственной форме для упрощения введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, используемая в данном документе, относится к физически раздельным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; причем каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для обеспечения желательного терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Требования в отношении единичных лекарственных форм, описанных в данном документе, диктуются (а) индивидуальными характеристиками активного соединения и конкретным терапевтическим эффектом, который необходимо достичь, и (b) ограничениями в области получения составов, характерными для получения составов с таким активным соединением из соображений чувствительности у индивидов, и напрямую зависят от них.

В случае введения антитела доза находится в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и, как правило, от 0,01 до 5 мг/кг массы тела пациента. Например, дозы 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 диапазона 1-10 мг/кг. Иллюстративная схема дозирования предусматривает введение раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в месяц, раз в три 3 месяца или раз в три-шесть месяцев. Предпочтительные схемы дозирования для антитела, описанного в данном документе, включают в себя 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела посредством внутривенного введения, причем антитело дают с использованием одного из следующих режимов дозирования: (i) каждые четыре недели в ходе введения первых шести доз, затем каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) в дозе 3 мг/кг массы тела однократно с последующим введением в дозе 1 мг/кг массы тела каждые три недели.

В соответствии с некоторыми способами два или более моноклональных антител с разными специфичностями связывания вводят одновременно, в этом случае доза каждого вводимого антитела попадает в указанные диапазоны. Антитело обычно вводят несколько раз. Интервалы между отдельными дозами могут быть, например, недельными, месячными, трехмесячными или годовыми. Интервалы также могут быть неодинаковыми, на что указывает измерение уровней антитела к антигену-мишени в крови пациента. В соответствии с некоторыми способами дозу корректируют для достижения концентрации антитела в плазме, составляющей приблизительно 1-1000 мкг/мл и в соответствии с некоторыми способами приблизительно 25-300 мкг/мл.

Антитело можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, причем в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота изменяются в зависимости от периода полувыведения антитела у пациента. Обычно наибольший период полувыведения проявляют человеческие антитела, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела, не являющиеся человеческими. Дозировка и частота введения могут изменяться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактических применениях относительно низкую дозу вводят с относительно длинными интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. При терапевтических применениях относительно высокая доза с относительно короткими интервалами иногда требуется до тех пор, пока развитие заболевания ограничится или прекратится, и предпочтительно до тех пор, пока у пациента не проявится частичное или полное ослабление симптомов заболевания. После этого введение пациенту можно осуществлять по профилактической схеме.

Фактические уровни дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях, описанных в данном документе, можно изменять с тем, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, при этом не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень дозы будет зависеть от ряда фармакокинетических факторов, в том числе от активности конкретных используемых композиций, описанных в данном документе, или их сложноэфирной, солевой или амидной формы, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента, получающего лечение, и подобных факторов, известных в области медицины.

"Терапевтически эффективная доза" антитела, описанного в данном документе, предпочтительно приводит в результате к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждению ухудшения или инвалидизации, обусловленных поражением заболеванием. В случае злокачественной опухоли терапевтически эффективная доза предпочтительно предотвращает дальнейшее ухудшение физических симптомов, связанных со злокачественной опухолью. Симптомы поражения злокачественной опухолью являются широко известными в уровне техники и включают, например, необычные признаки родинки, изменение внешнего вида родинки, в том числе асимметрии, границ, цвета и/или диаметра, новообразованная пигментированная область кожи, ненормальную родинку, затемненную область под ногтем, уплотнения в молочной железе, изменения соска, кисты в молочной железе, боль в молочной железе, смерть, потерю массы, слабость, переутомление, затруднения с приемом пищи, потерю аппетита, хронический кашель, ухудшенную одышку, харканье кровью, кровь в моче, кровь в кале, тошноту, рвоту, печеночные метастазы, легочные метастазы, метастазы в кости, ощущение переполнения желудка, вздутие, жидкость в брюшной полости, вагинальное кровотечение, констипацию, вздутие живота, перфорацию толстой кишки, острый перитонит (инфекция, лихорадка, боль), боль, рвота с кровью, сильное потоотделение, лихорадка, высокое кровяное давление, анемию, диарею, разлитие желчи, головокружение, озноб, мышечные спазмы, метастазы в толстую кишку, легочные метастазы, метастазы в мочевой пузырь, печеночные метастазы, метастазы в кости, почечные метастазы и метастазы в поджелудочную железу, затрудненное глотание и т.п.

Терапевтически эффективная доза может предупредить или замедлить появление злокачественной опухоли, что может быть желательно, когда присутствуют ранние или предварительные признаки заболевания. Лабораторные анализы, используемые в диагностике злокачественных опухолей, включают в себя химические анализы, гематологические, серологические и радиологические анализы. Соответственно, любой клинический или биохимический анализ, с помощью которого отслеживается любой из вышеизложенных показателей, можно использовать для определения того, присутствует ли конкретное лечебное средство в терапевтически эффективной дозе для лечения злокачественной опухоли. Специалист в данной области техники будет способен определить такие количества, исходя из таких факторов, как размеры субъекта, тяжесть симптомов у субъекта и конкретные выбранные композиция или путь введения.

Композицию, описанную в данном документе, можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из ряда способов, известных в уровне техники. Как будет понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения будет изменяться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения для антител, описанных в данном документе, включают внутривенный, внутримышечный, интрадермальный, внутривнутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в данном документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, за исключением энтерального и местного введения, обычно путем инъекции и включает в себя без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутривнутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную,

эпидуральную и интратеральную инъекцию и инфузию.

В качестве альтернативы описанное в данном документе антители можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения можно приготовить с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, как, например, состав с контролируемым высвобождением, в том числе имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этилен-винилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочную кислоту. Многие способы получения таких составов защищены патентами или являются общеизвестными специалистам в данной области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с использованием медицинских устройств, известных в уровне техники. Например, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления терапевтическую композицию, описанную в данном документе, можно вводить с использованием безыгольного устройства для подкожной инъекции, такого как устройства, раскрытые в патентах США №№ 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры широко известных имплантатов и модулей для применения с антителами, описанными в данном документе, включают в себя патент США № 4487603, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный микронасос для дозирования лекарственного препарата с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарственных препаратов через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыт инфузионный насос для лекарственного препарата для доставки лекарственного препарата с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный аппарат, обеспечивающий переменную скорость течения жидкости для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США № 4439196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства с многокамерными отсеками; и патент США № 4475196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства. Эти патенты включены в данный документ посредством ссылки. Специалистам в данной области техники известны многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антителя, описанные в данном документе, могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить надлежащее распространение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (БВБ) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения пересечения терапевтическими соединениями, описанными в данном документе, БВБ (если это желательно) их можно составить, например, в липосомах. По поводу способов получения липосом, см., например, патенты США №№ 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые селективно транспортируются в конкретные клетки или органы, тем самым повышая целенаправленную доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Иллюстративные нацеливающие фрагменты включают в себя фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 за авторством Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антителя (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор поверхностно-активного белка А (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

VII. Применения и способы.

Антителя, композиции антител и способы, описанные в данном документе, имеют многочисленные применения *in vitro* и *in vivo*, включающие, например, лечение различных нарушений, например, злокачественных опухолей. Например, антителя, описанные в данном документе, можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям, например, *in vivo*. Соответственно, в данном документе представлены способы лечения субъекта, предусматривающие введение субъекту антителя, содержащего модифицированный константный участок тяжелой цепи, таким образом, чтобы происходило лечение. В данном документе также представлены способы модификации иммунной реакции у субъекта, предусматривающие введение субъекту антителя, таким образом, чтобы иммунная реакция у субъекта была модифицированной. Предпочтительно реакцию усиливают, стимулируют или повышают. Тем не менее, в соответствии с другими вариантами осуществления иммунную реакцию подавляют.

Предпочтительные субъекты включают в себя пациентов-людей, у которых было бы желательно усиление иммунной реакции. Способы являются особенно подходящими для лечения пациентов-людей с нарушениями, лечение которых можно осуществлять путем усиления иммунной реакции (например, опосредованной Т-клетками иммунной реакции). В соответствии с конкретным вариантом осуществления способы являются особенно подходящими для лечения злокачественной опухоли *in vivo*. В соответствии с одним вариантом осуществления субъект является субъектом-носителем опухоли, а стимулируется иммунная реакция в отношении опухоли. Опухоль может представлять собой солидную опухоль

или опухолевые заболевания кроветворной и лимфоидной ткани, например гематологическую злокачественную опухоль. В соответствии с определенными вариантами осуществления опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. В соответствии с определенными вариантами осуществления опухоль является неиммуногенной. В соответствии с определенными вариантами осуществления опухоль является положительной по PD-L1. В соответствии с определенными вариантами осуществления опухоль является отрицательной по PD-L1. Субъект также может являться субъектом-носителем вируса, и стимулируется иммунная реакция в отношении вируса.

Дополнительно предполагаются способы подавления роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающие введение субъекту антитела, описанного в данном документе, таким образом, чтобы подавлялся рост опухоли у субъекта. Также предполагаются способы лечения вирусной инфекции у субъекта, предусматривающие введение субъекту антитела, описанного в данном документе, таким образом, чтобы осуществлялось лечение вирусной инфекции у субъекта.

В данном документе также охватываются способы сокращения количества Treg клеток в опухолевом микроокружении у субъекта, имеющего опухоль, например злокачественную опухоль, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела, описанного в данном документе, которое содержит Fc, стимулирующий сокращение количества Treg клеток в опухолевом микроокружении. Fc, например, может представлять собой Fc с эффекторной функцией или усиленной эффекторной функцией, такой как связывание или наличие усиленного связывания с одним или несколькими активирующими Fc-рецепторами.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, связывается со стимулирующей молекулой и подавляет 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 заболевания, при котором иммунная система или иммунная реакция должна подвергнуться понижающей регуляции, например, при аутоиммунных заболеваниях или для предотвращения отторжения трансплантатов.

Злокачественная опухоль.

В данном документе представлены способы лечения субъекта, имеющего злокачественную опухоль, предусматривающие введение субъекту антитела, описанного в данном документе, таким образом, чтобы осуществлялось лечение субъекта, например, чтобы рост злокачественных опухолей подавлялся или замедлялся, и/или чтобы достигалась регрессия опухолей. Например, активация GITR антителами к GITR может усиливать иммунную реакцию в отношении клеток злокачественной опухоли у пациента. Антитело можно применять само по себе для подавления роста злокачественных опухолей. В качестве альтернативы антитело можно применять в сочетании с другим средством, например другими иммуногенными средствами, стандартными средствами для лечения злокачественной опухоли или другими антителами, как описано ниже.

Злокачественные опухоли, чей рост можно подавлять с применением антител, описанных в данном документе, включают в себя злокачественные опухоли, как правило, восприимчивые к иммунотерапии. Неограничивающие примеры злокачественных опухолей для лечения включают в себя плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, ороговевающий немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), не-NSCLC, глиому, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, злокачественную опухоль почки (например, светлоклеточную карциному), злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль толстой и прямой кишки, злокачественную опухоль эндометрия, злокачественную опухоль почки (например, почечноклеточную карциному (RCC)), злокачественную опухоль предстательной железы (например, гормонорезистентную аденокарциному предстательной железы), злокачественную опухоль щитовидной железы, нейробластому, злокачественную опухоль поджелудочной железы, глиобластому (мультиформную глиобластому), злокачественную опухоль шейки матки, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль мочевого пузыря, гепатому, злокачественную опухоль молочной железы, карциному толстой кишки и злокачественную опухоль (или карциному) головы и шеи, злокачественную опухоль желудка, герминогенную злокачественную опухоль, детскую саркому, синоназальную злокачественную опухоль из клеток натуральных киллеров, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как злокачественная меланома кожи или внутриглазная злокачественная меланома), злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль матки, злокачественную опухоль заднепроходной области, злокачественную опухоль яичка, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль тонкого кишечника, злокачественную опухоль эндокринной системы, злокачественную опухоль паразитовидной железы, злокачественную опухоль надпочечника, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль мочеиспускательного канала, злокачественную опухоль полового члена, солидные опухоли детского возраста, злокачественную опухоль мочеточника, карциному почечной лоханки, злокачественное новообразование в центральной нервной системе (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль позвоночника, глиому ствола головного

мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидную злокачественную опухоль, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, злокачественные опухоли, вызванные факторами окружающей среды, в том числе вызванные асбестом злокачественные опухоли, злокачественные опухоли, связанные с вирусом, (например, опухоль, связанная с вирусом папилломы человека (HPV) и гематологические злокачественные опухоли, происходящие из любой из двух основных линий клеток крови, т.е. миелоидной клеточной линии (которая дает гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или лимфоидной клеточной линии (которая дает В, Т, NK и плазматические клетки), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например острые, хронические, лимфоцитарные и/или миелогенные лейкозы, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфолейкоз (CLL) и хронический миелолейкоз (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), выделенная гранулоцитарная саркома и хлорома; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмоцитоидную лимфому, моноцитоидную В-клеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), анапластическую (например, Ki 1+) крупноклеточную лимфому, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, лимфому из клеток мантийной зоны, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, лимфангиому, Т-клеточную лимфому тонкой кишки, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, Т-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников, Т-лимфобластную лимфому/Т-лимфобластный лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическую Т-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, истинную гистиоцитарную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную выпотную лимфому, лимфобластную лимфому (LBL), гемобластозы из лимфоидной линии, острый лимфобластный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную гистиоцитарную лимфому (DHL), иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластную лимфому из клеток предшественников, кожную Т-клеточную лимфому (CTLC) (также называемую микозом грибовидным или синдром Сезари) и лимфоплазмацитоидную лимфому (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как IgG-миелома, миелома легких цепей, несекреторная миелома, тлеющая миелома (также называемая вялотекущей миеломой), единичная плазмоцитома и множественные миеломы, хронический лимфолейкоз (CLL), волосатоклеточную лимфому; гемобластозы из клеток миелоидной линии, опухоли мезенхимального происхождения, в том числе фибросаркому и рабдомиосаркому; семиному, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, в том числе астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, в том числе фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; а также другие опухоли, в том числе меланому, пигментную ксероидерму, кератоакантому, семиному, фолликулярную злокачественную опухоль щитовидной железы и тератокарциному, гемобластозы из клеток лимфоидной линии, например, Т-клеточные и В-клеточные опухоли, в том числе без ограничения Т-клеточные нарушения, такие как Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), в том числе мелко-клеточного и мозговидного типа; лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (LGL), предпочтительно Т-клеточного типа; a/d T-NHL печеночно-селезеночную лимфому; периферическую Т-клеточную лимфому/ Т-клеточную лимфому из клеток, вышедших за пределы тимуса (плеоморфный и иммунобластный подтипы); Т-клеточную лимфангиому (назальную); злокачественную опухоль головы и шеи, злокачественную опухоль шеи, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных злокачественных опухолей. Способы, описанные в данном документе, также можно применять для лечения метастазирующих злокачественных опухолей, рефрактерных злокачественных опухолей (например, злокачественных опухолей, невосприимчивых к проводимой ранее иммунотерапии, например, с использованием блокирующего антитела к CTLA-4 или к PD-1 антителу) и рецидивирующих злокачественных опухолей.

Методы комплексной терапии.

В дополнение к методам терапии, представленным выше, антитела, описанные в данном документе, также можно использовать в сочетании с другим методом терапии. Например, в случае лечения злокачественной опухоли антителом, описанное в данном документе, можно вводить субъекту, который также получает другое лечение злокачественной опухоли, такое как химиотерапия, облучение, хирургическое вмешательство или генная терапия.

Способы лечения могут включать в себя совместное введение антитела, описанного в данном документе (например, антагонистического антитела, агонистического антитела и ADC, имеющих модифицированный константный участок тяжелой цепи), с другой молекулой, например, антителом (например, антагонистическим антителом, агонистическим антителом и ADC). Антитело, описанное в данном документе, которое стимулирует иммунную систему, можно вводить с другой молекулой, которая стимулирует иммунную систему, например молекулой, которая является агонистом костимулирующей молекулы или ингибитором ингибирующей молекулы.

Антитело, которое описано в данном документе, само по себе или с одним или несколькими допол-

нительными стимулирующими иммунную систему антителами (например, блокада CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3), можно комбинировать со стандартными методами лечения злокачественных опухолей. Например, антитело, описанное в данном документе, само по себе или с одним или несколькими дополнительными антителами можно эффективно комбинировать с химиотерапевтическими схемами. В этих случаях представляется возможным снижение дозы другого химиотерапевтического реагента, вводимого с комбинацией согласно настоящему раскрытию (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является комбинация антитела, описанного в данном документе, с дополнительным антителом или без него, причем в данную комбинацию дополнительно входит декрабазин или IL-2 для лечения меланомы.

Антитело, описанное в данном документе, можно комбинировать с антителом против злокачественных новообразований, таким как Rituxan® (ритуксимаб), Herceptin® (трастузумаб), Vectra® (тоситумаб), Zevalin® (ибритумаб), Campath® (алемтузумаб), Lymphocide® (эпртузумаб), Avastin® (бевацизумаб) и Tarceva® (эрлотиниб) и т.п. Антитела, описанные в данном документе, также можно комбинировать с одним или несколькими из следующих химиотерапевтических средств: кампотecin (CPT-11), 5-фторурацил (5-FU), цисплатин, доксорубин, иринотекан, паклитаксел, гемцитабин, цисплатин, паклитаксел, карбоплатин-паклитаксел (Taxol), доксорубин, 5-fu или кампотecin + apo21/TRAIL (6-кратное комбинированное применение)); ингибитор протеасомы (например, бортезомиб или MG132); ингибитор Bcl-2 (например, BH3I-2' (ингибитор bcl-xl), ингибитор индоламиндиоксигеназы-1 (IDO1) (например, INCB24360), AT-101 (R(-)-госипольное производное), AVT-263 (малая молекула), GX-15-070 (обатоклак) или антагонисты MCL-1 (белок дифференцировки клетки миелолейкоза 1)), антагонисты iAP (ингибитор белков апоптоза) (например, smac7, smac4, малая молекула-миметик 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 (например, ритуксимаб), ингибиторы ангиогенеза (например, бевацизумаб), антиангиогенные средства, целенаправленно воздействующие на VEGF и VEGFR (например, авастин), синтетические тритерпеноиды (см. Huer et al., *Cancer Research* 2005; 65:4799-808), модуляторы c-FLIP (клеточный белок-ингибитор FLICE) (например, натуральные и синтетические лиганды PPAR γ (γ рецептор, активируемый пролифератором пероксисом), 5809354 или 5569100), ингибиторы киназ (например, 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.

Антитела и комбинацию терапевтических средств на основе антител, описанных в данном документе, можно дополнительно применять в комбинации с одним или несколькими антипролиферативными цитотоксическими средствами. Классы соединений, которые можно применять в качестве антипролиферативных цитотоксических средств, включают в себя без ограничения следующие.

Алкилирующие средства (в том числе без ограничения азотистые иприты, этилениминовые производные, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урамустин, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN™) фосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилендиофосфорамин, бусульфид, кармустилин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

Антиметаболиты (в том числе без ограничения антагонисты фолиевой кислоты, пиримидиновые аналоги, пуриновые аналоги и ингибиторы аденозиндезаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабин фосфат, пентостатин и гемцитабин.

Подходящие антипролиферативные средства для комбинирования с антителами, описанными в данном документе, включают в себя без ограничения таксаны, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен как TAXOL™), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пелорусид А, эпотилоны, эпотилон А, эпотилон В, эпотилон С, эпотилон D, эпотилон Е, эпотилон F, фураноэпотилон D, дезоксиэпотилон В1, [17]-дегидродезоксипотилон В, [18]дегидродезоксипотилоны В, С12,13-циклопропил-эпотилон А, С6-С8-мостиковый эпотилон А, транс-9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-дезметилэпотилон В, эпотилон В10, дискодермолид, патупилон (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, AVJ-789, ХАА296А (дискодермолид), TZT-1027 (соблидотин), ILX-651 (тасидотин гидрохлорид), халихондрин В, эрибулин мезилат (E-7389), гемиастерлин (HTI-286), E-7974, криптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты с майтанзиноидом (DM-1), MKC-1, AVT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (испинесиб), SB-743921, MK-0731, STA-5312, элеутеробин, 17- β -ацетокси-2-этокси-6-оксо-В-гомо-эстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклостерпин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-дидеметил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1 в дополнение к другим средствам, стабилизирующим микротрубочки, известным в уровне техники.

Методы комплексного лечения можно применять одновременно или последовательно. В определенных примерах комбинации представляют собой комбинированные препараты с фиксированными дозами.

В случаях, когда желательно сделать aberrantly пролиферирующие клетки неактивными совместно с лечением с использованием антител, описанных в данном документе, или перед ним, гормоны и сте-

роиды (в том числе синтетические аналоги), такие как 17 α -этинилэстрадиол, диэтилстильбестрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместрон, дромостанолон пропионат, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоклутетимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, леупролид, флутамид, торемифен, ZOLADEX™, также можно вводить пациенту. При использовании способов или композиций, описанных в данном документе, в случае необходимости также можно вводить другие средства, применяемые в модулировании роста или метастазирования опухоли в клинических условиях, такие как антимиметики.

Способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических средств известны специалистам в данной области техники. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих из химиотерапевтических средств описано в Настольном справочнике врача (Physicians' Desk Reference (PDR)), например, редакции 1996 г. (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки на него.

Химиотерапевтическое средство(средства) и/или лучевую терапию можно назначать в соответствии с терапевтическими протоколами, широко известными в уровне техники. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что назначение химиотерапевтического средства(средств) и/или лучевой терапии может изменяться в зависимости от заболевания, подлежащего лечению, и от известных эффектов химиотерапевтического средства(средств) и/или лучевой терапии в отношении данного заболевания. В соответствии со знаниями клинического врача терапевтические протоколы (например, величины дозы и время введения) также можно изменять, принимая во внимание наблюдаемые воздействия вводимых терапевтических средств на пациента и принимая во внимание наблюдаемые реакции заболевания на вводимые терапевтические средства.

Настоящее раскрытие дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не следует толковать как дополнительное ограничение. Содержание всех фигур и всех источников, последовательности из Genbank, патенты и опубликованные патентные заявки, цитируемые в данной заявке специально включены в данный документ посредством ссылки. В частности, раскрытия PCT публикаций международных заявок WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546, WO 09/054863 и PCT/US 2013/072918 и публикация заявки на патент США № 2011/0150892 специально включены в данный документ посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Повышенная интернализация антител к CD73 с шарниром IgG2 по сравнению с такими же антителами с шарниром, не относящимся к IgG2.

Наблюдали, что полученное с использованием гибридомы антитело 11F11 к CD73, которое имеет константный участок IgG2, является более сильнодействующим в клеточных анализах ингибирования CD73, чем антитело 11F11 в форме IgG1 или IgG1.1 (IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией), и более сильнодействующим, чем другие антитела к CD73, имеющие константные участки IgG1. Основываясь, по меньшей мере, на этом наблюдении, выдвинули гипотезу, что повышенная ингибирующая активность антител к CD73, имеющих шарниры IgG2, по сравнению с антителами, имеющими шарниры, не относящиеся к IgG2, такие как шарниры IgG1, обусловлена повышенной интернализацией антител. Для проверки этой гипотезы антитела к CD73, имеющие константные участки IgG1 или IgG2 или их части, исследовали в анализах интернализации.

Антитела, которые использовали, перечислены в табл. 7, в которой представлена идентификационная информация для каждого из доменов константных участков (все они являются человеческими) у каждого антитела, в том числе конкретные мутации, если они присутствуют.

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	CD73.1 0	IgG2	IgG2 (C219S)	IgG2	IgG2	47	72
CD73.10-IgG2-C219S-IgG1.1	CD73.1 0	IgG2	IgG2 (C219S)	IgG1.1 (A330S/P331 S)	IgG2	48	72
CD73.10-IgG1.1	CD73.1 0	IgG1	IgG1.1 (L234A/L23 5E/G237A)	IgG1.1 (A330S/P331 S)	IgG1 .1	49	72
CD73.4-IgG2-C219S	CD73.1 0	IgG2	IgG2 (C219S)	IgG2	IgG2	50	72
CD73.3-IgG1.1	CD73.3	IgG1	IgG1.1 (L234A/L23 5E/G237A)	IgG1.1 (A330S/P331 S)	IgG1 .1	51	73

¹ SEQ ID NO полноразмерной тяжелой цепи

² SEQ ID NO полноразмерной легкой цепи

Антитела получали посредством экспрессии тяжелых и легких цепей в HEK293-6E клетках, и среду культивирования собирали через 5 суток после трансфекции.

Измеряли связывание конструкторов с Fc γ R. Данные связывания с hCD64 и hCD32a-H131 для молекул IgG1.1 и IgG2 согласовались с ожидаемыми величинами для разных Fc. IgG1.1f является наиболее инертным Fc. IgG2 и IgG2-C219S показывали типичное связывание с FcR для IgG2. Как ожидалось, данные для IgG2-C219S-G1.1f говорят о значительно более слабом связывании, чем у IgG1 или IgG2 дикого типа, но повышенном связывании в сравнении с IgG1.1f.

Аффинность антител в отношении человеческого CD73 измеряли для определения, будет ли изменение константного участка оказывать воздействие на нее. Значения аффинности определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) следующим образом. Кинетические характеристики и аффинность связывания с CD73 исследовали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при использовании инструмента Biacore T100 (GE Healthcare) при 25°C. В этом эксперименте исследовали связывание N-концевого домена hCD73 (состоящий из остатков 26-336 в человеческом CD73; названный N-hCD73) с антителами, которые были захвачены на поверхностях с иммобилизованным белком А. Для этих экспериментов белок А (Pierce) иммобилизовали до плотности 3000-4000 RU (относительные единицы) на поверхности проточных кювет 1-4 сенсорного чипа CM5 (GE Healthcare) с использованием стандартного химического процесса на основе этил(диметиламинопропил)карбодиимида (EDC)/N-гидроксисукцинилимида (NHS) при блокировании этаноламином в подвижном буфере с 0,01M HEPES с pH 7,4, 0,15M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% об./об. tween 20. Кинетические эксперименты проводили, вначале захватывая антитела (5-10 мкг/мл) на поверхностях с белком А с использованием времени контактирования 30 с при скорости потока 10 мкл/мин, причем связывание осуществляли с 600, 200, 66,7, 22,2, 7,4 и 2,5 нМ N-hCD73-his при использовании времени ассоциации 180 с и времени диссоциации 360 с при скорости потока 30 мкл/мин. Подвижный буфер для кинетических экспериментов представлял собой 10 mM фосфат натрия, 130 mM хлорид натрия, 0,05% tween 20, pH 7,1. Поверхности регенерировали после каждого цикла с использованием двух 30 с импульсных введений 10 mM глицина с pH 1,5 при скорости потока 30 мкл/мин. Данные сенсограммы сравнивали с двумя совокупностями, а затем подгоняли к модели связывания 1:1 Ленгмюра с использованием программного обеспечения для оценки Biacore T100 версии 2.0.4 для определения константы скорости ассоциации (ka), константы скорости диссоциации (kd) и равновесной константы диссоциации (KD).

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

Таблица 8

mAb	Fc	ka (1/M c)	kd (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 указывают на то, что присутствие разных константных участков в антителе, например CD73.10, не изменяло аффинность антитела в отношении человеческого CD73.

Интернализацию антител к CD73 измеряли в двух различных анализах.

А. Анализ интернализации при высоком содержании (анализ с 2-часовым фиксированным периодом времени).

Антитела к CD73 использовали для исследования зависимой от антитела к CD73 интернализации CD73 в Calu6 клетках посредством оценки экспрессии клетками после 2 ч инкубирования с антителом. Клетки (2000 клеток/лунка) в 20 мкл полной среды (среда RPMI 1640 Gibco с 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки) высевали в 384-луночный планшет BD Falcon и выращивали в течение ночи при 37°C с 5% CO₂ и 95% влажности. Антитела к CD73 серийно разводили PBS буфером, содержащим 0,2% BSA, и добавляли в количестве 5 мкл/лунку в планшет с клетками. Клетки инкубировали с антителами в течение 2 ч при 37°C с 5% CO₂ и 95% влажности с последующим однократным промыванием PBS буфером. Формальдегид (конечная концентрация 4% в PBS) затем добавляли в планшет с клетками в количестве 20 мкл/лунка и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. После этого всю жидкость отсасывали и клетки однократно промывали 30 мкл PBS. Выявляющее антитело (2,5 мкг/лунка антитела Ab CD73.10.IgG2C219S к CD73) добавляли в количестве 15 мкг/лунка в планшет с зафиксированными клетками. Клетки инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день планшет дважды промывали PBS буфером с последующим добавлением вторичного антитела, содержащего козье антитело к человеческому антителу, конъюгированное с Alexa-488, и DAPI, окрашивание проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. После 3 промываний в PBS буфере визуализацию планшета осуществляли на Agtayscan Vti (Cellomics, Питтсбург, Пенсильвания). Измеряли IC₅₀ и Y_{max}. Y_{max} определяли посредством сравнения с 100 нМ дозой 11F11 в качестве внутреннего максимума. Все расчетные значения определяли в виде процента интернализации в сравнении с этим контролем, который принимали за 100%.

Результаты представлены в табл. 9.

Таблица 9

mAb	Константный участок	Группа эпитопа	EC50 (нМ)	Y _{max}
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 выявлялось

NA = не применялось

Результаты показывают, что антитела к CD73, имеющие шарнир IgG2, характеризуются более низкой EC₅₀ и более высокой Y_{max}.

Исследования кинетических характеристик интернализации проводили для оценки скорости интернализации. Исследовали несколько клеточных линий: H2228 клетки, HCC15 клетки, Calu6 клетки и NCI-H2030. Клетки (2000 клеток/лунка) в 20 мкл полной среды (среда RPMI 1640 Gibco с 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки) высевали в 384-луночный планшет BD Falcon и вы-

ращивали в течение ночи при 37°C с 5% CO₂ и 95% влажности. Антитела к CD73 разводили PBS буфером, содержащим 0,2% BSA, до концентрации 10 мкг/мл и добавляли в количестве 5 мкл/лунку в планшет с клетками. Клетки инкубировали с антителами в течение периода времени от 0 до 2 ч при 37°C с последующим однократным промыванием PBS буфером. Клетки затем фиксировали с использованием формальдегида (конечная концентрация 4% в PBS) при комнатной температуре в течение 10 мин, а затем однократно промывали 30 мкл PBS. Выявляющее антитело (2,5 мкг/лунка антитела Abs CD73.10.IgG2C219S к CD73) разводили PBS буфером, содержащим 0,2% BSA, и добавляли в количестве 15 мкл/лунка в планшет с зафиксированными клетками. Планшет инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день после 3 промываний в PBS буфере добавляли вторичное козье антитело к человеческому антителу, конъюгированное с Alexa-488, с DAPI. Клетки окрашивали в течение 60 мин при комнатной температуре, после 3 промываний получали изображения с использованием ArtaScan Vti (Cellomics, Питтсбург, Пенсильвания). Результаты представлены на фиг. 1A-J и в табл. 10 и 11. Значения в табл. 10 получены на основе данных, показанных на фиг. 1A-J.

Таблица 10

Клеточная линия	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	Нет данных	Нет данных
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 % интернализации антител к CD73 в 4 линиях клеток человека

	H228 клетки		HCC15 клетки		Calu6 клетки		H2030 клетки	
	T _{1/2} мин.	% интернализации						
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 указывают на то, что 11F11 (антитело IgG2) интернализировалось за минуты, достигая плато через 30 мин, тогда как 6E11 (антитело IgG1) интернализировалось медленнее, достигая плато приблизительно через 1 ч (фиг. 1A-J). Подобным образом, 11F11 с константным участком IgG1 интернализировалось медленнее, чем 11F11 с константным участком IgG2. Эту тенденцию наблюдали в нескольких клеточных линиях (табл. 10 и 11 и фиг. 1A-J).

В. Интернализация, измеренная с помощью проточной цитометрии.

Опосредованную антителом к CD73 интернализацию CD73 также исследовали с помощью проточной цитометрии. Указанные клетки инкубировали с указанным антителом в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин на льду, промывали несколько раз и переносили в среду температурой 37°C в течение указанного времени. Клетки собирали одновременно после указанного времени инкубирования. Клетки

вновь окрашивали первичным антителом (тем же антителом, используемым для первоначального инкубирования) с последующим окрашиванием вторичным антителом к человеческому антителу. Клетки затем анализировали в отношении экспрессии CD73 с помощью проточной цитометрии.

Результаты, которые показаны на фиг. 1Е и в табл. 11, согласуются с полученными в анализах интернализации, описанных выше, и указывают на то, что все антитела с шарниром и CH1 IgG2, индуцировали быструю и полную интернализацию. Уровни CD73 оставались низкими спустя 22 ч после отмывки, указывая на то, что интернализация является длительной.

Подобные результаты, показанные на фиг. 1F и в табл. 11, получали в клеточной линии NCI-H292, в которой антитело сохранялось в культуре в течение времени инкубирования (без отмывки). Опять-таки, эти данные указывают на быструю и значительную интернализацию и сохранение понижающей регуляции эндогенного CD73.

Анализы интернализации также проводили с использованием человеческих SNU-C1 (линия клеток злокачественной опухоли толстой кишки) и NCI-H1437 (линия клеток немелкоклеточной карциномы легкого) клеток. Результаты, которые показаны на фиг. 1I и J, также указывают на быструю интернализацию, причем максимальный уровень достигался за 5 ч, а максимальный уровень интернализации составлял приблизительно 50% для CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1fB SNU-C1 и 60% в NCI-H1437 клетках. На фиг. 1G и H показаны подобные кинетические характеристики интернализации для CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f в Calu6 и NCI-H292 клетках. Для графиков, на которых показан % интернализированного CD73, эта величина была получена следующим образом:

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

где для каждого антитела $MFI_{t=x}$ представляет собой MFI (средняя интенсивность флуоресценции) в заданный момент времени, и $MFI_{t=0}$ представляет собой максимальную флуоресценцию при $t=0$, и $MFI_{\text{фон}}$ представляет собой MFI только вторичного Ab.

Таблица 12

EC₅₀ для опосредованной антителом интернализации CD73
в нескольких клеточных линиях (данные с фиг. 1G-I)

	Calu6		NCI-H292		SNU-C1		SNU-C1 (без отмывки)		NCI-H1437		NCI-H1437 (без отмывки)	
	Y _{max} (%)	T _{1/2} (часы)	Y _{max} (%)	T _{1/2} (часы)								
mAb- CD73 4- IgG2- IgG1 1f	76,8	0,56 61	77,64	0,2633	48,96	0,4954	38,39	1,025	63,12	0,3164	62,78	0,3418
mAb- CD73 4- IgG2	75,59	0,60 03	78,42	0,2766	-	-	-	-	-	-	-	-
mAb- CD73 4- IgG1 1f	44,99	1,73 7	51,49	0,2087	30,58	0,9915	33,16	2,33	49,76	0,4915	49,95	0,5384

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

Пример 2. Повышенная агонистическая активность антител к GITR с шарниром IgG2 по сравнению с такими же антителами с шарниром IgG1.

В этом примере демонстрируется, что антитела к GITR, содержащие шарнир IgG2, характеризуются повышенной способностью индуцировать секрецию IL-2 и IFN-γ из Т-клеток в сравнении с такими же антителами, которые имеют шарнир IgG1.

В вышеописанных анализах с CHO-ОКТ3 и 3 А9 клетками наблюдали, что полученные из гибридомы антитела, имеющие константный участок IgG2, являются более активными в стимуляции секреции цитокинов, чем такие же антитела, в которых константный участок тяжелой цепи был "переключен" на таковой из IgG1 или из IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией (IgG1.1). Таким образом, в данных анализах эффект константного участка или шарнира IgG2 дополнительно исследовали на антителах к GITR.

Вариабельный участок тяжелой цепи антитела к человеческим GITR (SEQ ID NO: 75) был связан с константными участками тяжелой цепи, приведенными в табл. 13. Легкая цепь антител к GITR содержала SEQ ID NO: 77. В табл. 13 показана идентификационная информация для каждого домена константных участков.

Константные участки тяжелой цепи антител, используемые в этом примере

Название антитела	СН1	Шарнир	СН2	СН3	SEQ ID NO*
Антитело к 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
Антитело к 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
Антитело к 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
Антитело к 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
Антитело к GITR -IgG2-IgG1 или антитело к 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
Антитело к GITR -IgG2-IgG1.1 или антитело к 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 полноразмерного константного участка тяжелой цепи.

Вначале, аффинности связывания у этих антител к GITR сравнивали с аффинностями связывания у антител к GITR, имеющих шарнир IgG1. Значения аффинности связывания антител к GITR с растворимым GITR определяли с помощью метода Вiascore следующим образом. Антитела к GITR захватывали на чипах, покрытых человеческими к-цепями (~5 KRU; Southernbiotech, № в каталоге 2060-01), и обеспечивали поток рекомбинантного человеческого GITR (rHGITR/Fc: R&D systems, № в каталоге 689-GR) вдоль чипа в концентрациях 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62 нМ и 31 нМ. Концентрация захватываемого mAb в объеме составляла 2-40 мкг/мл (5 мкл при 10 мкл/мин). Время ассоциации с антигеном составляло 5 мин при 15 мкл/мин., время диссоциации с антигеном составляло 6 мин, а регенерацию осуществляли с использованием 50 мМ HCl/50 мМ NaOH (12 мкл каждый при 100 мкл/мин).

Результаты, которые показаны на фиг. 2, указывают на то, что все три антитела к GITR, имеющие шарнир IgG2, характеризовались значениями аффинности в отношении активированных Т-клеток, подобными таковым у антител к GITR, которые имеют константный участок IgG1 или IgG1.1.

Затем антитела к GITR, имеющие константный участок IgG1 или шарнир IgG2/Fc-домен IgG1 исследовали в отношении их способности индуцировать секрецию IL-2 и IFN- γ из человеческих Т-клеток донора, которые стимулировали CHO клетками, экспрессирующими антитело scFv к CD3 (ОКТ3). CHO клетки экспрессировали низкие уровни ОКТ3 для содействия субоптимальной стимуляции, чтобы было возможно наблюдать агонизм со стороны антител к GITR. CD4+ Т-клетки от донора стимулировали CHO клетками, экспрессирующими ОКТ3, и антителом к GITR и измеряли секрецию IL-2 и IFN- γ . Эксперименты проводили следующим образом. В случае экспериментов с CD4+ Т-клетками CD4+ Т-клетки получали из человеческих PBMC с использованием коктейля для обогащения человеческих CD4+ Т-клеток RosetteSep (StemCell Technology#15062) в соответствии с протоколом производителя. CHO клетки, экспрессирующие scFv к CD3 (ОКТ3), (CHO-ОКТ3) дважды промывали средой RPMI и подвергали облучению дозой 50 тысяч Рад. Клетки собирали и ресуспендировали в среде культивирования (RPMI-1640, дополненная 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамином, 55 нМ β -меркаптоэтанолом, 1 мМ пируватом натрия и 100 д./мл пенициллина/стрептомицина) в концентрации $2,5 \times 10^5$ /мл. Высеивали $2,5 \times 10^4$ CHO-ОКТ3 клеток и 1×10^5 Т-клеток на лунку в 96-луночном плоскодонном планшете, относящемся к классу, подходящему для тканевой культуры (TC) (Costar). Клетки инкубировали с 4-кратным титрованием антителом к GITR в 8 разных концентрациях, начиная с 40 мкг/мл. Нерелевантный hIgG1 добавляли в концентрации 40 мкг/мл в качестве изотипического контроля. Образец, содержащий только клетки, включали для того, чтобы показать фоновую активность без какой-либо обработки. Супернатант из каждого образца собирали в день 2 для измерения уровня IL-2 (только для анализов с использованием CD4+ Т-клеток) (набор BD opt EIA Human IL-2 ELISA kit; BD Bioscience#555190) и в день 3 для измерения IFN- γ (набор BD optEIA human IFN- γ ELISA Kit; BD Bioscience#555142).

Как показано на фиг. 3А и В, антитело с шарниром IgG2/Fc-доменом IgG1 (anti-GITR.g2.g1) индуцировало секрецию как IL-2, так и IFN- γ из Т-клеток в большей степени, чем антитело с константным

участком IgG1 (anti-GITR.g1). Аналогичные результаты получали с вариантами этих константных доменов с отсутствующей эффекторной функцией (фиг. 3С).

Чтобы дополнительно подтвердить повышенную активацию Т-клеток антителами к GITR, содержащими шарнир IgG2, исследовали секрецию IL-2 в разных форматах эксперимента. В этом эксперименте способность антител к GITR индуцировать секрецию IL-2 из 3A9-hGITR клеток (клеточная линия 3A9 мышины Т-клеточной гибридомы, эктопически экспрессирующая человеческий GITR) исследовали следующим образом. Клетки линии 3A9 мышины Т-клеточной гибридомы, которая эктопически экспрессирует человеческий GITR (3A9-hGITR), культивировали на планшетах, покрытых моноклональным антителом к CD3, в присутствии возрастающих количеств указанных антител. 5×10^4 3A9-hGITR клеток культивировали на планшетах, покрытых 1 мкг/мл антитела к CD3 (клон 145-2C11; BD Biosciences), и обрабатывали идентичными концентрациями антител в течение 7 ч.

Как показано на фиг. 4, все антитела, имеющие шарнир IgG2 (anti-GITR.g2, anti-GITR.g2.g1f и anti-GITR.g2.g1.f), индуцировали секрецию IL-2 из 3A9-hGITR клеток в большей степени, чем их аналоги, содержащие константный участок IgG1 (anti-GITR.g1f и anti-GITR.g1.f).

В совокупности, данные результаты говорят о том, что антитела к GITR, имеющие шарнир IgG2 и константные участки g1 или g1.1, являются более активными, чем те же антитела, имеющие шарнир IgG1.

Пример 3. Воздействие разных комбинаций шарнир/Fc на размер комплексов антитело/антиген.

Как показано в вышеприведенных примерах, антитела к CD73 с шарниром IgG2 являются лучшими ингибиторами клеточной активности CD73 и интернализируются лучше, чем такие же антитела с шарниром IgG1, и антитела к GITR с шарниром IgG2 являются более сильными агонистами, чем такие же антитела с шарниром IgG1. Исходя из этого наблюдения и того факта, что шарнир IgG2 является более жестким, чем шарнир IgG1, выдвинули гипотезу, что большие комплексы образуются между антигеном и антителами, имеющими шарнир IgG2, по сравнению с антителами, имеющими шарнир IgG1. Следующий эксперимент проводили для анализа этой гипотезы.

Структуру и олигомерное строение комплексов CD73/антитело в растворе оценивали с помощью SEC-MALS и DLS. Для этих исследований антитела, содержащие константный участок либо IgG1, либо IgG2, смешивали в изменяющихся молярных отношениях с рекомбинантными белками, содержащими либо полноразмерный внеклеточный домен человеческого CD73, содержащий С-концевую полигистидиновую метку (аминокислотные остатки 26-546 в человеческом CD73, называемый hCD73-his), либо фрагмент, соответствующий N-концевому домену человеческого CD73 (аминокислотные остатки 26-336, называемый N-hCD73-his).

Олигомерное строение комплексов CD73/антитело оценивали с помощью гель-хроматографии в сочетании с подключенным к системе детектором многоугольного рассеяния света (SEC-MALS). Изократические разделения проводили на колонке Shodex PROTEIN KW-803, соединенной с прибором Prominence Shimadzu UFLC, в буфере содержащем 200 мМ K_2HPO_4 , 150 мМ NaCl, pH 6,8, содержащем 0,02% азида Na (отфильтрованный через фильтр с размером ячейки 0,1 мкм), который прогоняли со скоростью потока 0,5 мл/мин. Образцы впрыскивали на колонку с использованием автоматического дозатора SIL-20AC Prominence Shimadzu и получали данные от трех детекторов, работающих в реальном масштабе времени и соединенных последовательно: спектрофотометр Prominence SPD-20AD с диодной матрицей для измерения в УФ/видимой областях спектра, за которым следовал детектор многоугольного рассеяния света Wyatt miniDAWN™ TREOS, а затем рефрактометрический детектор Wyatt Optilab T-rEX. Данные собирали и анализировали с использованием программного обеспечения Astra (Wyatt) и Labsolutions (Shimadzu).

Исследования динамического рассеяния света (DLS) проводили на планшет-ридере Wyatt DynaPro в 384-луночных планшетах при 25°C. Параметры эксперимента предусматривали 20 сборов данных по 5 с каждый на измерение, и измерения записывали в четырех повторностях, причем приводили среднее значение и стандартное отклонение. Автокорреляционные функции для интенсивности подбирали с использованием алгоритма "регуляризации" в программном обеспечении Dynamics (Wyatt Technologies).

Краткое изложение данных SEC-MALS и DLS представлено на фиг. 6 и 7. Анализ антитела отдельно показал значения времени удержания (приблизительно 16-17 мин), массы (140-150 кДа) и гидродинамические радиусы (5,0-5,4 нм) для каждого антитела, что является типичным для мономерного моноклонального антитела. Данные для белка hCD73-his согласовались с тем, что белок принимает ожидаемую димерную структуру в растворе, в частности масса, определенная на основе данных SEC-MALS (120 кДа), соответствовала ожидаемой для димера CD73-his (117 кДа) и не соответствовала той, которая ожидалась бы для мономера hCD73-his (58,5 кДа). Данные для N-hCD73 соответствовали рекомбинантному белку N-домена, который является мономерным в растворе (измеренная с помощью SEC-MALS масса = 38 кДа в сравнении с ожидаемой массой в мономерной форме = 35,0 кДа), что ожидалось, поскольку участок внеклеточного домена полноразмерного CD73, который отвечает за димеризацию белка, содержится в С-концевом домене без вклада остатков в N-домене.

Было выявлено, что эквимоллярные смеси заданного антитела с N-hCD73-his элюируются в виде

единой частицы в SEC с меньшим временем удержания, чем антитело или N-hCD73-his по отдельности, о том же говорили и большие гидродинамические радиусы (Rh), измеренные с помощью DLS, которые соответствовали образованию комплексов. Данные MALS указывают массы для этих комплексов, составляющие примерно 210 кДа. Это согласуется с тем, что одна молекула N-hCD73-his связывается с каждым из двух Fab доменов заданного антитела с образованием комплекса 1:2 антитело : N-hCD73-his.

Данные SEC-MALS для смесей антител к CD73 с димером hCD73-his показывают, что смесь элюируется раньше, чем любое из hCD73-his или антитела отдельно, это говорит о том, что образуются комплексы. Сравнение данных для mAb, которые содержат одинаковый вариабельный участок, но разные константные домены, показывает, что значения времени элюирования для комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константные домены IgG2 (IgG2-C219S, IgG2-C219S-IgG1.1f), меньше, чем для комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константный домен IgG1.1f. Кроме того, определенные с помощью MALS значения массы для комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константный домен IgG2, являются большими, чем для комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константный домен IgG1. Данные DLS дополнительно показывают, что гидродинамический радиус у комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константный домен IgG2, является большим, чем у комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константный домен IgG1. Например, данные SEC-MALS и DLS для CD73.4 с тремя разными константными участками (IgG2-C219S, IgG2-C219S-IgG1.1f или IgG1.1f) показаны на фиг. 5. На ней можно увидеть, что комплекс hCD73-his с CD73.4, содержащим константный домен IgG2, характеризуется меньшими значениями времени удержания (фиг. 5A), большими гидродинамическими радиусами (фиг. 5B) и большими значениями массы, определенными с использованием MALS (фиг. 5C), в сравнении с комплексами hCD73-his с CD73.4-IgG1.1f. Основанная на значениях массы, полученных с использованием MALS, схематическая модель для структуры и стехиометрического состава комплексов между hCD73-his и антителами показана на фиг. 5D, причем комплексы, содержащие CD73.4-IgG1.1f, преимущественно образуют меньшие 2:2 (пик 1 = ~550 кДа) или 4:4 mAb/CD73 димерные комплексы (пик 2 = ~1300 кДа), тогда как CD73.4-IgG2-C219S или CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f образуют намного большие комплексы (>3000 кДа) с hCD73-his, для которых невозможно уверенно смоделировать точную структуру и стехиометрический состав.

В совокупности данные SEC-MALS и DLS демонстрируют, что комплексы большего размера образуются между hCD73-his и mAb, содержащими шарнирный участок IgG2 (IgG2-C219S или IgG2-C219S-IgG1.1f), в сравнении с содержащими шарнирный участок IgG1 (IgG1.1f).

Пример 4. CH1 изоформа IgG2 дополнительно улучшает опосредованную антителом интернализацию CD73.

Дополнительные анализы интернализации проводили на Calu6 и H292 клетках для того, чтобы дополнительно выделить роль изоформы при интернализации. Анализы интернализации проводили, как описано в примере 1A и 1B (протокол проточной цитометрии без стадии отмывки от антител), и антитела различных гибридных изоформ, показанные в табл. 14, поддерживали в культуре в концентрации 10 мкг/мл в течение времени инкубирования. В случае экспериментов с проточной цитометрией способ из примера 1B адаптировали к анализу с высокой пропускной способностью в 96-луночных планшетах (в отличие от 48-луночных планшетов) и с 50000 клетками на лунку.

Константные участки, исследуемые с вариабельными участками CD73.4

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

Было показано, что связывание с FcγR являлось таким, как ожидалось для каждого конструкта, т.е. связывание FcγR обусловлено нижним шарниром/CH2 участком.

Результаты показаны на фиг. 8А, В и С и в табл. 15 и 16. Данные, приведенные в табл. 15, получали с использованием того же протокола, что описан в примере 1В (без отмывки от антител). Данные, приведенные в табл. 16, получали с использованием того же протокола, что описан в примере 1А.

Таблица 15

Y_{max} и $T_{1/2}$ для опосредованной антителом интернализации CD73 в Calu6 и NCI-292 клетках

	Calu6		NCI-H292	
	Y_{max} (%)	$T_{1/2}$ (часы)	Y_{max} (%)	$T_{1/2}$ (часы)
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 участками в Calu6 клетках

Клоны mAb к CD73	Интернализация	
	Максимальная	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	++++	++++

Фиг. 8А-С и табл. 15 и 16 указывают на то, что антитела, имеющие шарнир и СН1 домен изотипа IgG2, являются наиболее эффективными в возбуждении интернализации CD73, тогда как антитела, которые имеют шарнир и СН1 домен IgG1, соответствуют более низким кривым на фигуре, т.е. более низкой степени интернализации. Кроме того, антитела только с шарниром от IgG2 характеризуются повышенной интернализацией в сравнении с шарниром человеческого IgG1. Следовательно, антитела, имеющие шарнир и СН1 домен изотипа IgG2, обладают лучшими характеристиками интернализации по сравнению

с антителами с изотипом IgG1.

Таким образом, антитело к CD73 mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (имеющее шарнир IgG2 с заменой C219S и CH1 домен IgG2) индуцировало быструю интернализацию, зависимую от исследуемой клеточной линии. Значение $T_{1/2}$ для интернализации варьировало от нескольких минут до периода менее часа. Большинство исследуемых клеточных линий имели $T_{1/2}$ менее 10 мин. Практически полная интернализация индуцировалась для некоторых клеточных линий, и у большинства исследуемых клеток присутствовало по меньшей мере 50% снижение экспрессии CD73 на поверхности, которое, как правило, достигало максимальных уровней к 5 ч, а в некоторых случаях гораздо раньше.

Пример 5. CH1 IgG2 повышает индуцируемую Ab к GITR секрецию IL-2 CD4+ Т-клетками.

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

Те же модифицированные константные участки тяжелой цепи, которые использовались в примере 4, связывали с переменными участками антитела к GITR (из примера 2). Донорские CD4+ Т-клетки инкубировали с CHO клетками, экспрессирующими ОКТ3-scFv, и различными антителами к GITR и измеряли уровень секретируемого IL-2. Эксперимент проводили, как описано в примере 2.

Результаты, которые показаны на фиг. 9, указывают на то, что все антитела к GITR, имеющие CH1 домен изотипа IgG2 дополнительно к шарниру изотипа IgG2, являются более эффективными при стимуляции секреции IL-2 из CD4+ Т-клеток, чем антитела, имеющие шарнир и CH1 IgG1.

Таким образом, в этом примере показано, что присутствие шарнира IgG2 и CH1 домена IgG2 в агонистическом антителе к GITR дополнительно повышает агонистическую активность антитела по сравнению с таким же антителом, которое не имеет шарнир и/или CH1 домен изотипа IgG2. Антитело, имеющее и шарнир, и CH1 домен изотипа IgG2, характеризуется более сильным агонистическим эффектом по сравнению с антителом, имеющим шарнир изотипа IgG2, но не имеющим CH1 изотипа IgG2. Кроме того, антитело с CH1 доменом из IgG2 характеризуется более сильной агонистической активностью, чем антитело с CH1 доменом изотипа IgG1. Антитело с шарниром из IgG2 и CH1 доменом из IgG1 характеризуется более сильной агонистической активностью, чем антитело с CH1 и шарниром изотипа IgG1.

Пример 6. Значимость определенных аминокислотных остатков в CH1 и шарнире IgG2 в улучшении опосредованной антителом интернализации CD73.

Антитела к CD73 (CD73.4) с константными участками тяжелой цепи, приведенными в табл. 17, получали и исследовали, как описано выше, в анализах опосредованной антителом интернализации CD73.

Таблица 17

Константные участки тяжелой цепи, которые были слиты с переменными участками антитела к CD73

Описание	Конструкты	SEQ ID NO константного участка
CH1 домен IgG2, все остальные IgG1. Также, мутант Cys>Ser для снижения потенциальной неравномерности дисульфидных связей	G2-G1-G1-G1	94
	G2.5-G1-G1-G1	95
CH1 домен IgG2, все остальные IgG2.3:	G1-G2.3-G2-G2	96
Замена CH1 участков в IgG1 на CH1 участки IgG2 либо по отдельности, либо вместе:	G1-KRGE GSSNLF	97
	G1-KRGE GS	98
	G1-SNLF	99
	IgG1-ITNDRTPR	100
	G1-SNLFPR	101

Замена CH1 участков в IgG2 на CH1 участки IgG1 либо по отдельности, либо вместе:	G2-RKEGSGNSFL	102
	G2-RKEGSG	103
	G2-NSFL	104
	IgG2-TIDNTRRP	105
	G2-NSFLRP	106
IgG1 с остатками IgG2 в CH2 домене	G1-G1-G2-G1-AY	107
	G1-G1-G2-G1-KH	108
IgG2 с остатками IgG1 в CH2 домене	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
Обмен шарнирными участками 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
Укорочения шарниров	IgG1-delta-шарнир	119
	IgG2-delta-шарнир	120
	IgG2.5-delta-шарнир	121
	IgG1-deltaG237	122
	IgG2-plusG237	123
Другие	IgG2.4	124
	IgG2.3/4	125

Эквиваленты.

Результаты, которые показаны на фиг. 10, обеспечивают следующую информацию в отношении интернализации CD73.

Оказывается, что CH2 домен не оказывает воздействие, на что указывает следующие факты:

- наблюдалось очень небольшое различие в способности к интернализации у антител, содержащих модифицированный константный участок тяжелой цепи с форматом "AY" (имеющий шарнир IgG2 ERKCCVVECPSPAPPVAG (SEQ ID NO: 8), по сравнению с участком с форматом "KH" (ERKCCVVECPSPAPPELLGG (SEQ ID NO: 22) (набор 5, 6 и 7);
- участки с замененным CH2 сравнимы с G1 или G2 дикого типа (наборы 5 и 6); и
- остаток 237 не оказывает влияние на интернализацию: ни добавление остатка "G" к шарниру IgG2, ни удаление C-концевого "G" в шарнире IgG1 не оказывали воздействие на интернализацию (набор 9).

Это говорит о том, что CH2 домен не оказывает воздействие на интернализацию (т.е. CH2 домен может происходить от IgG1 или IgG2).

Замена CH1 участков, указанная в наборе 3 (KRGE GSSNLF; KRGE GS; SNLF; ITNDRTPR и SNLFPR), в IgG1 на CH1 участки из IgG2 обеспечивает незначительное преимущество, т.е. интернализация остается подобной интернализации IgG1; см. набор 3).

Замена CH1 участков, указанных в наборе 4 (RKEGSGNSFL; RKEGSG; NSFL; TIDNTRRP и NSFLRP), в IgG2 на CH1 участки из IgG1 оказывала различное воздействие: изменение NSFL не оказывало воздействие, тогда как другие 2 участка (RKEGSG и RP) были задействованы (см. набор 4). На основании результатов для наборов 3 и 4 оказывается, что существует взаимодействие между CH1 участком и шарниром, причем RKEGSG и RP участки являются более важными, чем NSFL участок.

Шарнирный участок оказывает воздействие 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-delta-шарнир) улучшает интернализацию в сравнении с IgG1. IgG2 с делецией (G2-delta-шарнир) обеспечивает подобный уровень интернализации по сравнению с уровнем интернализации для шарнира IgG2. Это говорит о том, что шарнирный участок оказывает влияние на интернализацию, причем данный эффект усиливается CH1 IgG2 (G2-G1-G2-G2-AY является сравнимым G1-G2-G1-G1-AY).

IgG2.4 (C220S) характеризуется подобной или пониженной интернализацией в сравнении с IgG2.3 (C219S). IgG2.3/4 (C219S/C220S) характеризуется значительно пониженной интернализацией в сравнении с IgG2.3 или IgG2.4 самими по себе (см. набор 10). Это говорит о том, что интернализация антитела с шарниром IgG2 и C219S является приблизительно такой же, что и у антитела с шарниром IgG2 с C220S, причем в обоих случаях результат значительно лучше, чем у антитела с шарниром IgG2 с обеими из C219S и C220S.

IgG2.5 (мутация C131S) характеризовался пониженной интернализацией в сравнении с конструктами с C131 (см. наборы 1, 6 и 7).

Таким образом, эти результаты указывают на то, что как CH1 домен, так и шарнир являются значимыми в опосредованной антителом интернализации CD73, и что антитело, имеющее последовательности

IgG2 из этих доменов, интернализируется с большей эффективностью по сравнению с антителом, имеющим эти участки из IgG1.

Пример 7. Антитела, имеющие шарнир и/или CH1 домен IgG2, образуют высокомолекулярные комплексы.

Антитела CD73.4, имеющие константные участки тяжелой цепи, изложенные в табл. 14, также исследовали в отношении образования высокомолекулярных комплексов с помощью экспериментов SEC-MALS и DLS, как описано в примере 3.

Три из 16 антител в этом исследовании исследовались ранее: CD73.4-IgG1.1, 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 для антител самих по себе показывали значения времени удержания, массы и гидродинамические радиусы для каждого антитела, которые являются типичными для мономерного моноклонального антитела. Эквивалентные комплексы каждого антитела (5,5 мкМ) с hCD73-his (5,5 мкМ) показывали большие значения времени удержания для всех комплексов в сравнении с антителом или hCD73-his самим по себе, что указывает на образование комплексов. Наложение данных с SEC хроматограммы для каждого из 16 комплексов, показано на фиг. 11А. Данные с хроматограммы можно поделить на 4 отдельных пика, которые показаны на фиг. 11В. Пик 1 содержит наиболее крупные частицы, причем определенные с использованием MALS значения массы предполагают комплексы с эквивалентной массой, большей, чем комплексы 4:4 hCD73-his:mAb. Пик 2 содержит частицы с определенными с использованием MALS значениями массы, которые предполагают комплексы, примерно соответствующие комплексам 2:2 hCD73-his:mAb. Пик 3 представляет собой меньшие частицы с низким уровнем сигнала и определенными с использованием MALS значениями массы, которые предполагают комплексы, примерно соответствующие комплексам 1:1 hCD73-his:mAb. Пик 4 соответствует элюированию отдельных mAb, причем определенные с использованием MALS значения массы соответствуют несвязанному антителу. Для количественного определения относительных количеств каждой из частиц, 4 пика с 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). Интегрирование также включало дополнительный интегрированный диапазон, называемый пиком 5 (>19,3 мин), чтобы учесть любые низкомолекулярные частицы, которыми, как оказалось, можно пренебречь (<3,5% для всех комплексов). Процентное содержание каждого вида частиц из этого интегрирования приведено в табл. 18. Все комплексы содержали малый процент пика 3 (приблизительно 6-9%), но переменные количества других пиков. Наиболее примечательным является то, что все комплексы между hCD73-his и антителами, содержащими CH1 домен из hIgG1, имели значительно большее процентное содержание комплексов меньшего размера (пик 2), тогда как комплексы, содержащие CH1 домен из hIgG2, имели большее процентное содержание комплексов большего размера (пик 1) (табл. 18 и фиг. 11С). Это говорит о важной роли не только шарнирного участка, но также и CH1 домена в образовании комплексов более высокого порядка.

Таблица 18

Значения времени удержания для антител CD73.4 с модифицированными константными участками тяжелой цепи

Комплексы	% UV				
	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5
	<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 Fc рецептором для антител со сконструированными константными доменами.

В этом примере демонстрируется, что антитела, имеющие модифицированные константные участки тяжелой цепи, которые содержат CH1 и шарнир IgG2, связываются с Fc γ R, когда они содержат CH2 и CH3 домены IgG1.

В дополнение к связыванию антигена вариабельными доменами антитела могут захватывать Fc- γ рецепторы (Fc γ R) посредством взаимодействия с константными доменами. Эти взаимодействия опосредуют эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Активность эффекторной функции является высокой в случае изотипа IgG1, но является очень низкой или отсутствует в случае IgG2 и IgG4 вследствие того, что эти изотипы характеризуются более низкой аффинностью в отношении Fc γ R. Кроме того, эффекторная функция IgG1 может быть модифицирована посредством мутации аминокислотных остатков в константных участках для изменения аффинности и селективности в отношении Fc γ R.

Связывание антител с Fc- γ рецепторами (Fc γ R или Fc γ R) исследовали с использованием технологий на основе биосенсоров, в том числе метода измерения поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore и метода интерферометрии в биослое (BLI) Fortebio. Исследования SPR проводили на инструменте Biacore T100 (GE Healthcare) при 25°C. Fab-фрагмент из мышинового антитела к метке из 6 \times His иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с использованием EDC/NHS до плотности ~3000 RU. Различные his-меченые Fc γ R (7 мкг/мл) захватывали посредством C-концевой his-метки с использованием времени контактирования 30 с при скорости потока 10 мкл/мин и связывание антитела в концентрации 1,0 мкМ оценивали в подвижном буфере с 10 мМ NaPO₄, 130 мМ NaCl, 0,05% p20 (PBS-T) и с pH 7,1. Fc γ R, используемые для этих экспериментов, включали в себя CD64 (Fc γ RI), CD32a-H131 (Fc γ RIIa-H131), CD32a-R131 (Fc γ RIIa-R131), CD32b (Fc γ RIIb), CD16a-V158 (Fc γ RIIIa-V158), CD16b-NA1 (Fc γ RIIIb-NA1) и CD16B-NA2 (Fc γ RIIIb-NA2).

Эксперименты BLI проводили на инструменте Fortebio Octet RED (Pall, Fortebio) при 25°C в 10 мМ NaPO₄, 130 мМ NaCl, 0,05% p20 (PBS-T) и с pH 7,1. Антитела захватывали из неразбавленных супернатантов экспрессионной среды на покрытые белком А сенсоры с последующим связыванием аналитов hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158 в концентрации 1 мкМ или hCD64 в концентрации 0,1 мкМ.

Вначале получали связывающиеся с различными мишенями антитела, которые содержат модифицированные Fc-домены IgG1, в том числе замены S267E (SE) и S267E/L328F (SELF), а также различные комбинации мутаций P238D, P271G, H268D, A330R, G237D, E233D, называемые V4, V7, V8, V9 и V12. Связывание этих антител исследовали с помощью Biacore SPR в сравнении с антителами IgG1f, IgG2.3 (IgG2-C219S) и IgG4.1 (IgG4-S228P), а также антителом IgG1.1f, которое было подвергнуто воздействию методов генной инженерии для снижения связывания со всеми Fc γ R. Результаты, которые показаны на фиг. 12, демонстрируют ожидаемые свойства связывания с Fc γ R для IgG1f, IgG2.3 и IgG4.1 и мутантных антител IgG1, в том числе 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 в сравнении с CD32a-H131 и CD32a-R131, фиг. 12.

Следующий набор конструкторов использовали для обеспечения с помощью методов генной инженерии эффекторной функцией изотипа IgG2, у которого в ином случае эффекторная функция отсутствует. Для этого исследования мутации, описанные выше, вводили в контекст константного участка IgG2.3 или гибрида IgG2.3/IgG1f, названного IgG2.3G1-AY, табл. 19. Антитела экспрессировали в малом масштабе в виде супернатантов и исследовали в отношении связывания с Fc γ R с использованием технологии на основе биосенсора для интерферометрии в биослое методом Fortebio Octet. Поскольку антитела присутствовали в супернатантах в низкой концентрации, эксперимент проводили, захватывая антитела из супернатантов с использованием сенсоров, покрытых белком А, с последующим связыванием с аналитами Fc γ R в растворе. Контроль с очищенным IgG1f и IgG1f из супернатанта, в том числе с антителами IgG1 дикого типа, SE, P238D, V4 и V12, также включали для сравнения, и каждое из этих контрольных антител демонстрировало ожидаемые свойства связывания с Fc γ R, фиг. 13. Антитело IgG2.3 также демонстрировало ожидаемый профиль связывания с заметным связыванием только с CD32a-H131. Тем не менее, все мутации для введения мутаций S267E, L328F, P238D, P271G, H268D, A330R, G237D или E233D в IgG2.3 оказались неспособны рекапитулировать аффинность в отношении Fc γ R у соответствующих сконструированных mAb IgG1, фиг. 13. В отличие от этого, конструктор IgG2.3G1-AY был способен полностью сохранить свойства связывания с Fc γ R у IgG1 дикого типа при сохранении CH1 и шарнирного участков IgG2.3. Кроме того, все мутанты IgG2.3G1-AY, содержащие S267E, L328F, P238D, P271G,

H268D, A330R, G237D и E233D демонстрировали свойства связывания с FcγR, сравнимые с вариантами mAb IgG1, содержащими те же мутации, фиг. 13. Это демонстрирует успешное конструирование антител с CH1 и шарнирными участками IgG2, сочетающимися с эффекторной функцией IgG1 дикого типа или мутантного IgG1.

Таблица 19

Конструкты IgG2 полученные с помощью методов конструирования

Набор	ID	Конструкт	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	

Эту стратегию конструирования дополнительно изучали путем конструирования других антител в формате IgG2.3G1-AY, IgG2.3G1-AY-S267E (IgG2.3G1-AY-V27), а также вариантов в В-форме IgG2 (IgG2.5G1-AY и IgG2.5G1-AY-V27) и других гибридных антител, содержащих разные комбинации константных доменов IgG1 и IgG2 и исследования связывания этих антител с his-мечеными FcγR, захваченными на Fab к his, с использованием технологии SPR Biacore. В соответствии с данными Octet для супернатанта данные SPR показывали, что антитела IgG2.3G1-AY и IgG2.3G1-AY-V27 характеризовались свойствами связывания с FcγR, сравнимыми с IgG1f и IgG1f-S267E, соответственно, несмотря на содержание CH1 и шарнирных участков у антитела IgG2 в А-форме (IgG2.3) (фиг. 14А и В и табл. 20). Подобные данные также получали при использовании антител IgG2.5G1-AY и IgG2.5G1-AY-V27, они демонстрировали успешное конструирование антител IgG2 в В-форме (содержащих мутацию C131S, называемых IgG2.5), имеющих эффекторные функции, подобные IgG1f или модифицированному IgG1f. Данные для нескольких других антител с константными участками IgG2.3G1-AY, IgG2.3G1-AY-V27, IgG2.5G1-AY или IgG2.5G1-AY-V27, но отличающимися вариабельными участками, показывают, что эта стратегия конструирования является широко применимой к другим антителам независимо от вариабельных доменов (фиг. 14А и В и табл. 20). Другие конструкты, которые демонстрируют свойства связывания с FcγR, подобные IgG1f, представляют собой IgG1-G2.3G1-AY и IgG1deltaTHT, тогда как несколько из конструктов с модифицированными константными участками были неспособны сохранять свойства связывания с FcγR, подобные IgG1f, в том числе конструкты IgG2.3G1-KH, IgG2.5G1-KH, IgG2.3plusTHT, IgG2.5plusTHT и IgG2.3plusGGG (фиг. 14А и В и табл. 20).

Таблица 20

Значения %Rmax для связывания антител в концентрации 1 мкМ с FcγR-his белками, захваченными на Fab к 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%
G1TR.6-IgG1f	66%	35%	25%	8%	41%	19%
CD73.4-IgG1.1f	2%	0%	2%	1%	0%	0%
G1TR.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%

В своей совокупности эти данные показывают, что последовательность, находящаяся непосредственно со стороны С-конца от консервативного мотива CPPCPAP в шарнирном участке, придает опосредованную FcγR эффекторную функцию, тогда как СН1 и верхние части шарнира антитела могут быть заменены на последовательности IgG2 или модифицированного IgG2, чтобы потенциально объединить эффекторные функции IgG1 и модифицированного IgG1 с лучшими свойствами интернализации или передачи сигнала у антител, содержащих СН1 и/или шарнирные участки IgG2.

Пример 9. Интернализация агонистического Ab к GITR является улучшенной у антител, имеющих шарнир и СН1 домен IgG2.

Для индукции экспрессии GITR клетки инкубировали в течение 72 ч при 37°C с 20 нг/мл антитела к CD3+ 1000 нг/мл CD28. В качестве альтернативного способа активации Т-клеток большие партии активированных CD4+ Т-клеток получали с помощью трехстадийного протокола культивирования. Вкратце, CD4+ Т-клетки стимулировали с использованием связанного с планшетом CD3 (1,5 мкг/мл), дополненного растворимым CD28 в концентрации 1 мкг/мл, в течение 72 ч при 37°C, разрабатывали в культуре в течение 14 суток в присутствии 20 мкг/мл IL2 и в конце подвергали еще одному раунду активации посредством добавления 10 мкг/мл РНА, 2 мкг/мл IL2 и 1 мкг/мл CD28 в течение 72 ч при 37°C. Простимулированные Т-клетки высевали в 384-луночные PDL-планшеты для визуализации на 2 ч для адгезии клеток, охлаждали в течение 15 мин при 4°C, а затем антитела к GITR, меченные Alexa 488, добавляли по отдельности в течение 1 ч. Планшеты в конце визуализировали с использованием HCS, и данные представлены в виде суммарной интенсивности на клетку.

Три разных антитела к GITR оценивали с использованием вышеупомянутых способов активации Т-клеток. Они представляли собой антитело GITR.6 в виде изоформа G1 и инертный изотип (IgG1.1), неспособный к связыванию с Fc рецепторами, а также химеру с шарниром IgG2 вместо шарнира IgG1.

Интернализацию, индуцируемую антителом к GITR, оценивали в стимулируемых CD3 CD4+ Т-клетках с использованием формата анализа гашения флуоресценции Alexa. Свежеполученные CD4-положительные Т-клетки инкубировали в условиях, которые описаны выше для индукции экспрессии GITR. После стимуляции клетки ресуспендировали в свежей среде и высевали для анализов интернализации, как описано ниже. Клетки инкубировали с антителом, как описано выше, промывали теплой средой и инкубировали при 37°C в течение указанных периодов времени до фиксации и гашения. Интернализированное антитело измеряли в виде повышенной флуоресценции выше небольшого негасимого сигнала, наблюдаемого в момент начала отсчета времени, а затем нормализовали к суммарной флуоресценции "контроля без гашения", первоначально связанного с клетками. Как показано на фиг. 15, лигирование GITR приводило в результате к быстрой интернализации, достигающей пика между 30 и 60 мин для

каждого исследуемого антитела, тогда как контрольные антитела, как оказалось, сохраняют локализацию в плазматической мембране. Результаты указывают на то, что шарнирный участок IgG2 повышает индуцируемую лигированием GITR интернализацию.

Для дополнительного анализа подробных механизмов интернализации и динамических характеристик ассоциации анализировали эндоцитоз и доставку антитела в компартменты ранних эндосом. В этом эксперименте клетки подвергали анализу вытеснения метки с использованием немеченых антител. После фиксации клетки пермеабелизировали и окрашивали в отношении маркера ранних эндосом EEA1 (cell signaling technology), промывали, а затем выявляли с использованием вторичного кроличьего антитела, конъюгированного с alexa fluor - 488 (EEA1), и человеческого антитела (GITR), конъюгированного с alexa fluor - 647. Планшеты визуализировали на конфокальной системе Opera с 60X водно-иммерсионным объективом. Результаты указывали на четкое разделение между окрашиванием мембраносвязанного антитела к GITR и внутриклеточным сигналом EEA1. После подогрева культур выявляли агрегацию для некоторых антител, которые, как оказывается, локализуются совместно с эндосомальными белками. Количественное определение эндосомальной совместной локализации осуществляли с использованием программного обеспечения HCS Studio и результаты наносили на график в виде отношения интенсивности совместно локализованных пикселей к общему окрашиванию (фиг. 16). Совместная локализация антитела к GITR и ранних эндосом является наиболее выраженной через 30 мин. В этот исследуемый момент времени GITR.6.G2.G1f показывало большую долю совместно локализованных молекул, чем антитело GITR.6.G1f. Результаты совместной локализации коррелируют с наблюдениями, сделанными с использованием метода с гашением флуоресценции alexa, описанного выше, и подтверждают модель, предполагающую, что шарнир G2 имеет потенциальное преимущество перед G1 в индукции интернализации GITR.

Пример 10. Передача сигнала с участием агонистического Ab к GITR в активированных T-клеточным рецептором CD4+ и CD8+ T-клетках является повышенной у антител, имеющих шарнир и CN1 домен IgG2.

Для дополнительного изучения механизмов у агонистических антител к GITR отслеживали несколько путей передачи сигнала, вовлеченных в активацию T-клеток, таких как пути передачи сигнала с участием NFkB и P38.

CD4+ и CD8+ T-клетки от здорового донора (M6576) активировали с использованием планшета, покрытого 0,4 мкг/мл антитела к CD3 и 0,4 г/мл антитела к CD28. Спустя 3 суток клетки собирали и высеивали на 384-луночные планшеты для визуализации для активации передачи сигнала. После того как клетки оседали в планшете в течение 2 ч, их обрабатывали антителами к GITR в течение 15 мин и процессы передачи сигнала завершали путем добавления формальдегида до конечной концентрации 10% в анализируемые планшеты. Затем клетки пермеабелизировали и окрашивали меченым фосфором антителом к p65 NFkB для выявления передачи сигнала. Как показано на фиг. 17, антитела GITR.6.G2 и GITR.6.G2.G1f характеризовались более высоким влиянием на передачу сигнала в сравнении с GITR.6.G1f как в CD4+, так и в CD8+ T-клетках. Хотя не существует непосредственного доказательства связи интернализации и активации путей передачи сигнала, интерес вызывает то, что изотип G2, по всей видимости, улучшает оба аспекта функциональных активностей антитела в сравнении с IgG1 в случае GITR.6.

Для количественного определения активностей в отношении передачи сигнала для каждого антитела как EC_{50} , так и E_{max} , рассчитывали для каждого антитела, поскольку оба параметра являются критически важными для определения полной меры явления передачи сигнала. Уровень ответа GITR.6.G2.G1f выбран в качестве 100% контрольного значения, и все остальные антитела нормализовали относительно него. Как показано в табл. 21, у популяций как CD4+, так и CD8+ T-клеток, активируемых антителами к CD3 и антителами к CD28, присутствовал ряд активностей для антител к GITR, выраженных как через активность (EC_{50}), так и эффективность (E_{max} %). Хотя GITR.6.G2, GITR.6.G2.G1f и GITR.6.G1f показывали подобные значения активности (EC_{50}) в диапазоне примерно 10 нМ, эффективность (E_{max}) несколько отличалась для разных изотипов, это говорит о том, что антитело G1 не участвует в передаче столь же эффективно, как G2 или химерные изотипы.

Краткое изложение активностей HuMab к GITR в отношении передачи сигнала с участием NFκB в активированных TCR CD4+ и CD8+ Т-клетках

Антитело	CD4+ Т-клетки		CD8+ Т-клетки	
	EC50 (нМ)	E _{max} (%)	EC50 (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

Чтобы дополнительно подтвердить, ограничивается ли различие в передаче сигнала GITR.6.G2 и GITR.6G2.G1f в сравнении с GITR.6.G1f только передачей сигнала с участием NFκB, или оно также распространяется на другие явления передачи сигнала, изучали полученные данные для передачи сигнала с участием p38 MAPK. Как показано на фиг. 18, антитела GITR.6.G2 и GITR.6.G2.G1f характеризовались более высоким влиянием на передачу сигнала в сравнении с антителом GITR.6.G1f в анализе с активацией p38 MAPK CD4+ клеток. Таким образом, лучшие активности в отношении передачи сигнала для изотипа G2 GITR.6 в сравнении с изотипом G1 не ограничиваются только передачей сигнала с участием NFκB.

В дополнение к повышенной агонистической активности и активности в отношении интернализации также было показано, что модифицированные константные участки тяжелой цепи могут придавать повышенную ADCC (например, агонисту стимулирующего рецептора), а также предоставлять антителу новую активность. Например, было обнаружено, что замена константного домена тяжелой цепи антитела, которое связывается с ингибирующей молекулой клеточной поверхности и предотвращает ингибирующую активность молекулы клеточной поверхности (антагонист), на модифицированный константный участок тяжелой цепи, описанный в данном документе, давала в результате антитело, потерявшее свою способность действовать в качестве антагониста, и вместо этого наделяла его агонистической активностью (по отношению к ингибирующей активности).

Пример 11. Подтверждение дисульфидных связей в конструктах IgG2.3 и IgG2.5.

Правильность структур дисульфидных связей в антителе, содержащем константный домен IgG2.3 (А-форма), IgG2.3G1 (А-форма) и IgG2.5 (В-форма), подтверждали посредством сравнения невосстановленных фрагментов, полученных в результате расщепления Lys-C, с восстановленными.

Образцы антитела расщепляли с использованием Lys-C, которая специфично расщепляет пептидные связи с карбоксиконцевой стороны остатков лизина (K, Lys). Пептиды в продукте расщепления разделяли с использованием C18 колонки Waters ACQUITY VEN, 1,7 мкм, 2,1×150 мм, колонки для обращенно-фазовой HPLC и выявляли с использованием ультрафиолетового (UV) детектора при длине волны 214 нм и масс-спектрометра Thermo LTQ.

Ферментативное расщепление Lys-C и восстановление дисульфидных связей. В пузырек, содержащий 100 мкг образца антитела, добавляли 120 мкл денатурирующего буфера, что давало в результате раствор 3,7М GuHCl, 0,2М Tris с pH 7,0. Смесь инкубировали при 55°C в течение 30 мин. Алкилирование белка выполняли посредством добавления 1 мкл 50 мМ йодацетамида в вышеуказанный раствор с последующим инкубированием в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Алкилированный образец разводили в 80 мкл dH₂O и добавляли Waco Lys-C при отношении фермента к субстрату, составляющем 1:10. Расщепление антител осуществлялось в течение ночи при комнатной температуре. После расщепления 100 мкл аликвоту удаляли из расщепленного Lys-C образца и к ней добавляли 10 мкл 0,5М DTT. Этот образец инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч для восстановления дисульфидных связей.

Были получены следующие результаты.

Структура дисульфидных связей у антител IgG2.3 и IgG2.3G1 (А-форма). В пределах Fab-участка тяжелой цепи Cys22 (H) связан с Cys98 (H), и Cys151 (H) связан с Cys207 (H). В пределах Fc-участка тяжелой цепи Cys265 (H) связан с Cys325 (H), и Cys371 (H) связан с Cys429 (H). В пределах Fab-участка легкой цепи Cys23 (L) связан с Cys88 (L), и Cys134 (L) связан с Cys194 (L). С-концевой Cys214 (L) легкой цепи связан с тяжелой цепью в Cys138 (H). Шарнирный участок тяжелой цепи содержит три цистеиновых остатка Cys227 (H), Cys230 (H) и Cys233 (H), которые обеспечивают три дисульфидные связи между цепями. Наиболее вероятно, мостиком связаны Cys227 (H) с Cys227 (H), Cys230 (H) с Cys230 (H) и Cys233 (H) с Cys233 (H), что представляет собой правильное теоретическое расположение дисульфидных связей в А-форме IgG2.

Структура дисульфидных связей у антитела IgG2.5 (В-форма). В пределах Fab-участка тяжелой цепи Cys22 (H) связан с Cys98 (H), и Cys151 (H) связан с Cys207 (H). В пределах Fc-участка тяжелой цепи Cys264 (H) связан с Cys324 (H), и Cys370 (H) связан с Cys428 (H). В пределах Fab-участка легкой цепи

Cys23 (L) связан с Cys88 (L), и Cys134 (L) связан с Cys194 (L). Шарнирный участок тяжелой цепи содержит четыре цистеиновых остатка Cys226 (H), Cys227 (H), Cys230 (H) и Cys233 (H). С-концевой Cys214 (L) легкой цепи связан с цистеиновым остатком тяжелой цепи в шарнирном участке, а остальные три цистеиновых остатка обеспечивают три дисульфидных связи между цепями. Наиболее вероятно, мостиком связаны Cys214 (L) с Cys226 (H), затем Cys227 (H) с Cys227 (H), Cys230 (H) с Cys230 (H) и Cys233 (H) с Cys233 (H), что представляет собой правильное теоретическое расположение дисульфидных связей в В-форме IgG2. Кроме того, дисульфидные мостики в шарнирном участке подтверждали с использованием иницируемой диссоциацией с переносом электронов (ETD) тандемной масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра на основе ионной ловушки.

Пример 12. Значимость определенных аминокислотных остатков в CH1 и шарнире IgG2 в улучшении агонизма GITR на Т-клетках.

Антитела к GITR (GITR.6) с константными участками тяжелой цепи, приведенными в табл. 17, получали и исследовали в анализах продуцирования IL-2, как описано в примере 2, но при этом супернатанты собирали через 40 ч, а не через 48 ч.

Результаты, которые показаны на фиг. 20A-D, по большей части согласовались с результатами интернализации CD73 (см. фиг. 10), которые получали с антителами к CD73, имеющими такие же константные участки тяжелой цепи, что и используемые в этом примере.

Таблица с последовательностями

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Полноразмерный IgG1 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
2	CH1 IgG1 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
3	Шарнир IgG1 дикого типа	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
4	CH2 IgG1 дикого типа	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
5	CH3 IgG1 дикого типа	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV D KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6	Полноразмерный IgG2 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP CPA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTV D K SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	CH1 IgG2 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
8	Шарнир IgG2 дикого типа	ERKCCVECP CPA PPVAG
9	CH2 IgG2 дикого типа	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF N WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK

10	CH3 IgG2 дикого типа	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
11	Полноразмерный IgG3 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV <u>ELKTPLGDTTHT</u> <u>CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKS</u> <u>CDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE</u> VTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFQK LSLSPGK
12	CH1 IgG3 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV
13	Шарнир IgG3 дикого типа	ELKTPLGDTTHTCPRCPE
14	CH2 IgG3 дикого типа	PKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPP CPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKTK
15	CH3 IgG3 дикого типа	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFQKLSLSPGK
16	Полноразмерный IgG4 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPA <u>PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE</u> <u>DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISAK</u> GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLSDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGGK
17	CH1 IgG4 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
18	Шарнир IgG4 дикого типа	ESKYGPPCPCPAPEFLGG
19	CH2 IgG4 дикого типа	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISAK

20	CH3 IgG4 дикого типа	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
21	Модифицированный шарнир IgG2 (C219S)	ERK <u>S</u> CV <u>E</u> CP <u>P</u> CP <u>A</u> PP <u>V</u> AG
22	Гибридный шарнир IgG2/IgG1	ERKCC <u>V</u> EC <u>P</u> PC <u>A</u> PE <u>L</u> LG <u>G</u>
23	Гибридный шарнир IgG2 C219S/IgG1	ERK <u>S</u> CV <u>E</u> CP <u>P</u> CP <u>A</u> PE <u>L</u> LG <u>G</u>
24	Модифицированный CH2 IgG1 (A330S/P331S)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALP <u>S</u> IEKTISKAK
25	Шарнир IgG1.1 (L234A/L235E/G237A)	EPKSCDKTHTCP <u>P</u> CP <u>A</u> PE <u>A</u> EG <u>A</u>
26	IgG1-IgG2-IgG1 (IgG1-IgG2/IgG1 (SEQ#22)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK <u>VERKCCVECPCP</u> <u>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH</u> EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK <u>TISKA</u> KGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
27	IgG1-IgG2-IgG12 (IgG1-IgG2 (SEQ#8)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK <u>VERKCCVECPCP</u> <u>APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH</u> EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK <u>TISKA</u> KGQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
28	IgG2-IgG1 (IgG2-IgG2/IgG1 (SEQ#22)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK <u>TVERKCCVECPCPA</u> <u>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH</u> DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK <u>TISKAK</u> GQPREPQVYTLPPS <u>REEM</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	IgG2-IgG12 (IgG2-IgG2 (SEQ#8)-IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK <u>TVERKCCVECPCPA</u>

		<u>PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP</u> EVTCVVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	IgG1-IgG2-IgG1 1 (IgG1-IgG2(SEQ#8)- IgG1(A330S/P331S)- IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKCCVECPCP <u>APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP</u> EVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	IgG2-IgG1 1 (IgG2-IgG2(SEQ#8)- IgG1(A330S/P331S)- IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPCPA <u>PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP</u> EVTCVVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	IgG1-IgG2CS-IgG1 (IgG1-IgG2(C219S)- IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKSCVECPCPA <u>PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP</u> EVTCVVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
33	IgG1-IgG2CS-IgG12 (IgG1-IgG2(C219S)- IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKSCVECPCPA <u>PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP</u> EVTCVVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
34	IgG2CS-IgG1 (IgG2-IgG2(C219S)- IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPCPA <u>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP</u> EVTCVVVDVDSHE

		DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR <u>EE</u> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
35	IgG2CS-IgG12 (IgG2-IgG2(C219S)- IgG1-IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV <u>ERK</u> SCVECP <u>PCPA</u> PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSR <u>EE</u> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
36	IgG1-IgG2CS-IgG1.1 (IgG1-IgG2(C219S)- IgG1(A330S/P331S)- IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>VERK</u> SCVECP <u>PCPA</u> PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP <u>SS</u> IEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSR <u>EE</u> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
37	IgG2CS-IgG1.1 (IgG2-IgG2(C219S)- IgG1(A330S/P331S)- IgG1)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV <u>ERK</u> SCVECP <u>PCPA</u> PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP <u>SS</u> IEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSR <u>EE</u> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
38	VH Ab 11F11	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMHW VRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDS FDIWGQGTMTVTVSS
39	VH Ab 4C3	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVSGISWKSIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVKGYVILTGLD YWGQGTMTVTVSS
40	VH Ab CD73.10	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA <u>AS</u> GFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVA <u>VIW</u> Y <u>DE</u> SNKYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYP DSFDIWGQGTMTVTVSS
41	VH Ab CD73.3 (4C3 / V94A)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVSGISWKSIGYADSVKGRFTISR

		NAKNSLYLQMNSLRAEDT V LYYCVKGYVILTGLD YWGQGLTVTVSS
42	VH Ab 6E11	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVSGITWNSGGIGYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDRYYSSWLL FDNWGQGILTVTVSS
43	VH Ab CD73 4	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPD SFDIWGQGTMTVTVSS
44	Полноразмерная HC Ab 11F11	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMHW VRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDS FDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK TVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNK GLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
45	Полноразмерная HC Ab 4C3	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVSGISWKSIGYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVKGYVILTGLD YWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
46	Полноразмерная HC Ab 6E11	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVSGITWNSGGIGYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDRYYSSWLL FDNWGQGILTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCK KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL

		KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPP VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
47	Полноразмерная HC Ab CD73.10-IgG2-C219S	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVA VIWYDESNKYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYP DSFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVD KTVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
48	Полноразмерная HC Ab CD73.10-IgG2-C219S- IgG1.1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVA VIWYDESNKYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYP DSFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVD KTVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
49	Полноразмерная HC Ab CD73.10-IgG1.1 (IgG1.1 – IgG1.1(L234A/L235E/G2 37A)- IgG1.1(A330S/P331S)- IgG1.1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVA VIWYDESNKYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYP DSFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK DTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
50	Полноразмерная HC Ab CD73.4-IgG2-C219S	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVA VILYDGSNKYYPDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPD SFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA

		ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDK TVERKSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPAIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKLSLSLSPG
51	Полноразмерная HC Ab CD73.3-IgG1.1 (IgG1.1 – IgG1.1(L234A/L235E/G2 37A)- IgG1.1(A330S/P331S)- IgG1.1)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVSGISWKSIGYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTVLYYCVKGYVILTGLD YWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK EPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKLSLSLSPG
52	Полноразмерный константный участок тяжелой цепи IgG2- IgG2-IgG2-IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDK TVERKCCVECPCPA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSH DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
53	Полноразмерный константный участок тяжелой цепи IgG1- IgG1-IgG1-IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG K
54	Полноразмерный константный участок тяжелой цепи IgG1- IgG1.1(L234A/L235E/G2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY

	37A)-IgG1.1 (A330S/P331S)-IgG1	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEK TIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG
55	Полноразмерный константный участок тяжелой цепи IgG2- IgG2/IgG1 гибрида-IgG1- IgG1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVVERKCCVECP PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG
56	Полноразмерный константный участок тяжелой цепи IgG2- IgG2- IgG1.1(A330/P331S)- IgG1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVVERKCCVECP PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG
57	Таблица 2 – шарнирный домен	VDKRV
58	Таблица 2 – шарнирный домен	VDKTV
59	Таблица 2 – шарнирный домен	EPKSCDKTHT
60	Таблица 2 – шарнирный домен	ERK
61	Таблица 2 – шарнирный домен	ELKTPLGDTTHT
62	Таблица 2 – шарнирный домен	EPKS
63	Таблица 2 – шарнирный домен	ESKYGPP
64	Таблица 2 – шарнирный домен	CPPCP
65	Таблица 2 – шарнирный домен	CCVECP CPPCP
66	Таблица 2 – шарнирный домен	CPRCP
67	Таблица 2 – шарнирный домен	EPKSCDTPPPCPRCP
68	Таблица 2 – шарнирный домен	CDTPPPCPRCP

69	Таблица 2 – шарнирный домен	CPSCP
70	Таблица 2 – шарнирный домен	APELLGG
71	Таблица 2 – шарнирный домен	APPVAG
72	Легкая цепь 11F11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
73	Легкая цепь 4C3	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSPLTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
74	Легкая цепь 6D11	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTIS RLEPEDFAVYYCQHYGSSFTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
75	VH Ab к GITR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHW VRQAPGKGLEWVAIVWYEGSNKYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDY YYGMDVWGQGTITVTVSS
76	VL Ab к GITR	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQ KPGKAPKLLIYDASSLESVPSRFRSGSGSGTDFLTIS LQPEDFATYYCQQFNYPYTFGQGTKEIK
77	LC Ab к GITR	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQ KPGKAPKLLIYDASSLESVPSRFRSGSGSGTDFLTIS LQPEDFATYYCQQFNYPYTFGQGTKEIKRTVAAPS <u>VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV</u> <u>NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK</u> <u>HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
78	IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL

		TVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
79	IgG2 3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECP PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
80	IgG2 3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECP PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
81	IgG2 3G1-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECP PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
82	IgG2 5	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
83	IgG1 1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCP CPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY

		PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
84	IgG2 3G1 1f-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPPCA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
85	IgG1-deltaTHT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSN SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKCPCPCA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
86	IgG2 3-plusTHT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVETHCPC CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
87	IgG2 3-plusGGG	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVEGGGCP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
88	IgG2 5G1 1f-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

		<p>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
89	IgG2 5G1-AY	<p>ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPCCA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
90	IgG2 5G1-KH	<p>ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPCCA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
91	IgG2 5-plusTHT	<p>ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVETHTCPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
92	IgG1-G2 3G1-AY	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCVECPCCA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
93	IgG1-G2 3G1-KH	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCVECPCCA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</p>

		GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	G2-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DH KPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS R TPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	G2 5-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNV DH KPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS R TPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
96	G1-G2 3-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHK PSNTKVDKRV KSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDS DGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
97	G1-KRGE GSSNLF	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYICNV NH KPSNTKVDKRV

		<p>KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
98	G1-KRGEES	<p>ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
99	G1-SNLF	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
100	IgG1-ITNDRTPR	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNDH KPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC</p>

		LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
101	G1-SNLFPR	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNVNH KPSNTKVDKERVER KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
102	G2-RKEGSGNSFL	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKERVER KSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
103	G2-RKEGSG	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKERVER KSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
104	G2-NSFL	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKERVER

		<p>KSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
105	IgG2-TIDNTRRP	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEP KSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
106	G2-NSFLRP	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNDH KPSNTKVDKRVPEP KSCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
107	G1-G1-G2-G1-AY	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEP KSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK</p>

		EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
108	G1-G1-G2-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKREVP KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVDS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
109	G2-G2 3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVR KSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
110	G2 5-G2 3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVR KSCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
111	G2-G2 3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSV

		HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVR KSCVECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP VTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
112	G2 5-G2 3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVR KSCVECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP VTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
113	G1-G2 3-G1-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRV KSCVECPCPAAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP VTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	G2-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK

		EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSVMSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	G2 5-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSVMSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
116	G1-G2-G1-G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRV KSCVECPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP VTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSVMSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
117	G2-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSVMSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
118	G2 5-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSKV

		HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVR KSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
119	IgG1-delta-шарнир	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEP KCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	IgG2-delta-шарнир	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVR KCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
121	IgG2 5-delta-шарнир	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVR KCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK

		EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
122	IgG1-deltaG237	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPG
123	IgG2-plusG237	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVNDH KPSNTKVDKTVR KSCVECPAPPVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
124	IgG2 4	ASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCSVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKLSLSPGK
125	IgG2 3/4	ASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG

		CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKSSVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSFLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSGDGFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNYHT QKSLSLSPGK
126	Шарнир IgG2 C220S	ERKCSVECPPCPAPPVAG
127	Гибридный шарнир IgG2/IgG1 C220S	ERKCSVECPPCPAPELLGG
128	Часть шарнира IgG2 дикого типа	ERKCCVECPPCPAP
129	Часть шарнира IgG2 C219S	ERKSCVECPPCPAP
130	Часть шарнира IgG2 C220S	ERKCSVECPPCPAP
131	Часть шарнира IgG2 C219X	ERKXCVECPPCPAP
132	Часть шарнира IgG2 C220X	ERKCXVECPPCPAP
133	IgG2 CH1+шарнир IgG2 (дикого типа)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVVSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPA PPVAG
134	IgG2 с C219X	ERKXCVECPPCPAPPVAG
135	IgG2 с C220X	ERKCXVECPPCPAPPVAG
136	Гибрид IgG2/IgG1 с C219X	ERKXCVECPPCPAPELLGG
137	Гибрид IgG2/IgG1 с C220X	ERKCVVECPPCPAPELLGG
138	Гибрид IgG2/IgG1 deltaG	ERKCCVECPPCPAPELLG
139	Гибрид IgG2/IgG1 с C219S deltaG	ERKSCVECPPCPAPELLG
140	Гибрид IgG2/IgG1 с C220S deltaG	ERKCSVECPPCPAPELLG
141	Гибрид IgG2/IgG1 с C219X deltaG	ERKXCVECPPCPAPELLG
142	Гибрид IgG2/IgG1 с C220X deltaG	ERKCXVECPPCPAPELLG

143	IgG2 дикого типа с C-концевой X	ERKCCVECPCPAPPVAGX
144	IgG2 с C219S с C-концевой X	ERKSCVECPCPAPPVAGX
145	IgG2 с C220S с C-концевой X	ERKCSVECPCPAPPVAGX
146	IgG2 с C219X с C-концевой X	ERKXCVECPCPAPPVAGX
147	IgG2 с C220X с C-концевой X	ERKCXVECPCPAPPVAGX
148	Часть шарнира IgG2	PVAG
149	Часть шарнира IgG1	SCDKTHT
150	Часть 1 шарнира IgG1	ELLG
151	Часть 2 шарнира IgG1	ELLG
152	IgG2.3-V13	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKRSKSCVECP PPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV DGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
153	IgG2.3-V14	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKRSKSCVECP PPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV DGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
154	IgG2.3-V15	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKRSKSCVECP PPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV DGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
155	IgG2.3-V16	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKRSKSCVECP PPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV DGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVV

		<p>VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPRPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
156	IgG2 3-V17	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPCPA PPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD DGEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPRPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
157	IgG2 3-V18	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPCPA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
158	IgG2 3-V19	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPCPA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
159	IgG2 3G1	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
160	IgG2 3G1-V20	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPCPA PELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</p>

		KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
161	IgG2 3G1-V21	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPA PELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
162	IgG2 3G1-V22	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPA PELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD EDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
163	IgG2 3G1-V23	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPA PELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
164	IgG2 3G1-V24	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPA PELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD EDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
165	IgG2 3G1-V25	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPA PELLGDDSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD EDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD

		IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
166	IgG2.3G1-V26	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKSCVECP PAPCPA PDLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD EDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
167	IgG2.3G1-V27	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKSCVECP PAPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
168	IgG2.3G1-V28	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKSCVECP PAPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

Специалист в данной области техники поймет или будет способен определить многие эквиваленты описанных в данном документе конкретных вариантов осуществления с использованием не более чем стандартного экспериментирования. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются следующими пунктами формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее модифицированный константный участок тяжелой цепи, причем модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH1 домен, шарнир, CH2 домен и CH3 домен в порядке от N- к C-концу, при этом

(a) шарнир содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 130 или SEQ ID NO: 127;

(b) CH1 домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

(c) CH2 домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и

(d) CH3 домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 5 с аминокислотными заменами E356D и M358L;

или в котором модифицированный константный участок тяжелой цепи, содержащий CH1 домен, шарнир, CH2 домен и CH3 домен, которые определены в (a), (b), (c) и (d), не имеет C-концевых GK или K,

причем антитело проявляет повышенную интернализацию или агонистическую активность по сравнению с антителом, имеющим константный участок IgG1 или IgG2 дикого типа.

2. Антитело по п.1, причем антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 34, 35, 37, 55, 80, 81, 84 и 159.

3. Антитело по п.1 или 2, которое (i) специфично связывается с костимулирующим рецептором; (ii) специфично связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает опосредованную антителами интернализацию молекулы клеточной поверхности; (iii) специфично связывается с ингибирующим рецептором; (iv) специфично связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает внутриклеточную передачу сигнала; (v) специфично связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает образование высокомолекулярных комплексов антитело-молекула клеточной поверхности; или (vi) специфично связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает агрегацию или олигомеризацию молекулы клеточной поверхности.

4. Антитело по п.3, причем костимулирующий рецептор представляет собой GITR, OX40, 4-1BB, CD28, ICOS, CD40L, CD27 или любой другой член суперсемейства TNFR; молекула клеточной поверхности представляет собой CD73; ингибирующий рецептор представляет собой CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, галектин-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4; или внутриклеточная передача сигнала опосредует агонистиче-

скую активность, антагонистическую активность, интернализацию молекулы клеточной поверхности или ADCC.

5. Антитело по п.3 или 4, причем антитело проявляет усиленную или измененную агонистическую активность по сравнению с антителом, имеющим такие же переменные участки и легкую цепь, но содержащим константный участок тяжелой цепи IgG1; антитело характеризуется улучшенными или измененными свойствами интернализации по сравнению с антителом, имеющим такие же переменные участки и легкую цепь, но содержащим константный участок тяжелой цепи IgG1; антитело проявляет более сильную или измененную антагонистическую активность или приносит новую активность по сравнению с таким же антителом, имеющим константный участок тяжелой цепи IgG1; антитело запускает более сильную внутриклеточную передачу сигнала по сравнению с антителом, имеющим такие же переменные участки и легкую цепь, но содержащим константный участок тяжелой цепи IgG1; антитело запускает образование комплексов с более высокой молекулярной массой по сравнению с антителом, имеющим такие же переменные участки и легкую цепь, но содержащим константный участок тяжелой цепи IgG1; или антитело запускает большую агрегацию или олигомеризацию молекулы клеточной поверхности по сравнению с антителом, имеющим такие же переменные участки и легкую цепь, но содержащим константный участок тяжелой цепи IgG1.

6. Биспецифичная молекула, содержащая антитело по любому из предыдущих пунктов, связанное с молекулой, характеризующейся второй специфичностью связывания, где молекула представляет собой другое антитело, фрагмент антитела или пептид.

7. Биспецифичная молекула по п.6, причем вторая специфичность связывания представляет собой антитело, которое (i) специфично связывается с костимулирующим рецептором; (ii) специфично связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает опосредованную антителами интернализацию молекулы клеточной поверхности; (iii) специфично связывается с ингибирующим рецептором; (iv) специфично связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает внутриклеточную передачу сигнала; (v) специфично связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает образование высокомолекулярных комплексов антитело-молекула клеточной поверхности; или (vi) специфично связывается с молекулой клеточной поверхности и запускает агрегацию или олигомеризацию молекулы клеточной поверхности.

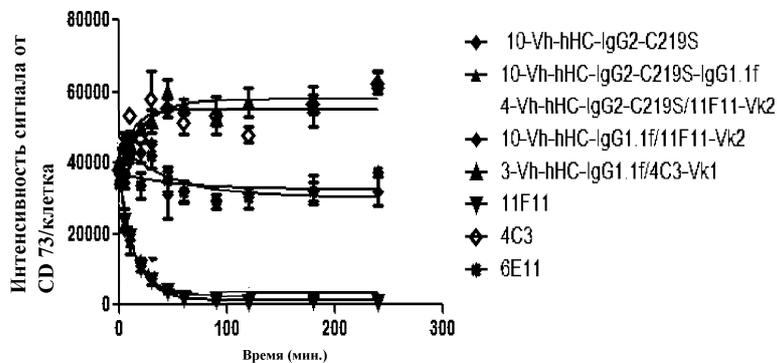
8. Иммуноконъюгат для лечения рака, содержащий антитело по любому из предыдущих пунктов, связанное с цитотоксическим средством.

9. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая антитело по любому из пп.1-5, биспецифичную молекулу по любому из пп.6-7 или иммуноконъюгат по п.8 и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Композиция по п.9, дополнительно содержащая одно или несколько дополнительных терапевтических средств, причем средства представляют собой химиотерапевтические лекарственные средства, лекарственные средства на основе малых молекул или антитела, которые стимулируют иммунную реакцию в отношении заданной злокачественной опухоли.

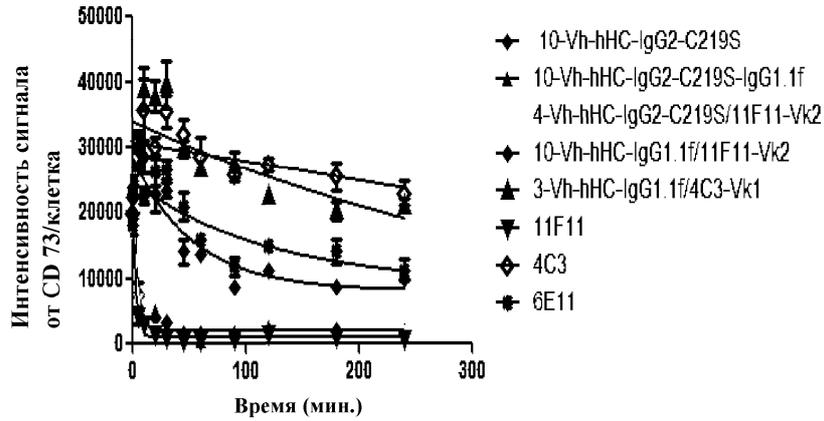
11. Композиция по п.10, причем антитела, которые стимулируют иммунную реакцию в отношении заданной злокачественной опухоли, представляют собой антитела к CTLA-4, антитела к PD-1, антитела к PDL-1, антитела к OX40 или антитела к LAG-3.

Ab-опосредованная интернализация рецептора (H2228 клетки)



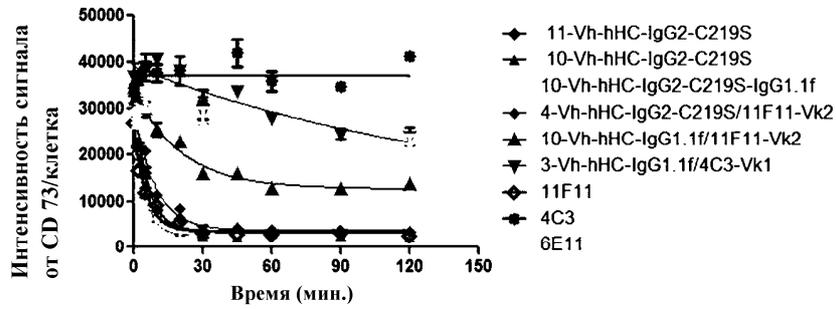
Фиг. 1А

Аб-опосредованная интернализация рецептора (HCC15 клетки)



Фиг. 1B

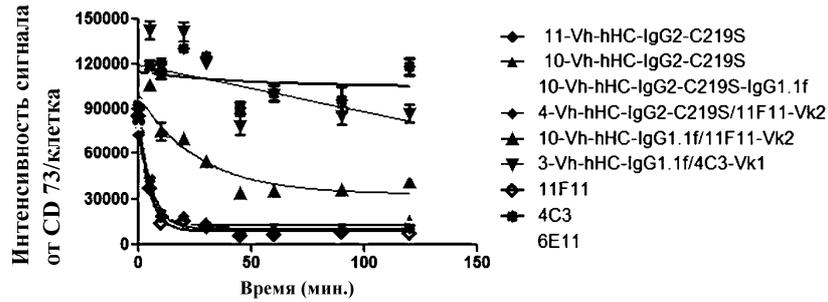
Аб-опосредованная интернализация рецептора (Calu-6 клетки)



Антитела в концентрации 2 мкг/мл

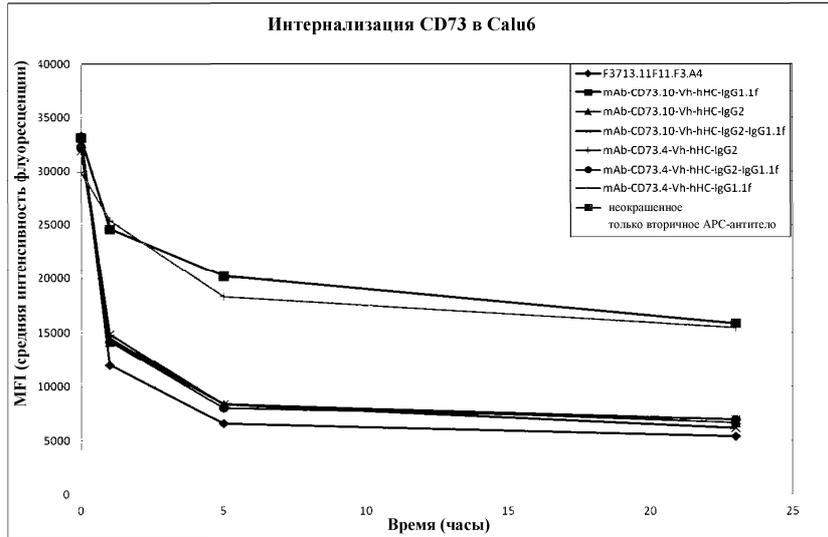
Фиг. 1C

Аб-опосредованная интернализация рецептора (NCI-H2030 клетки)

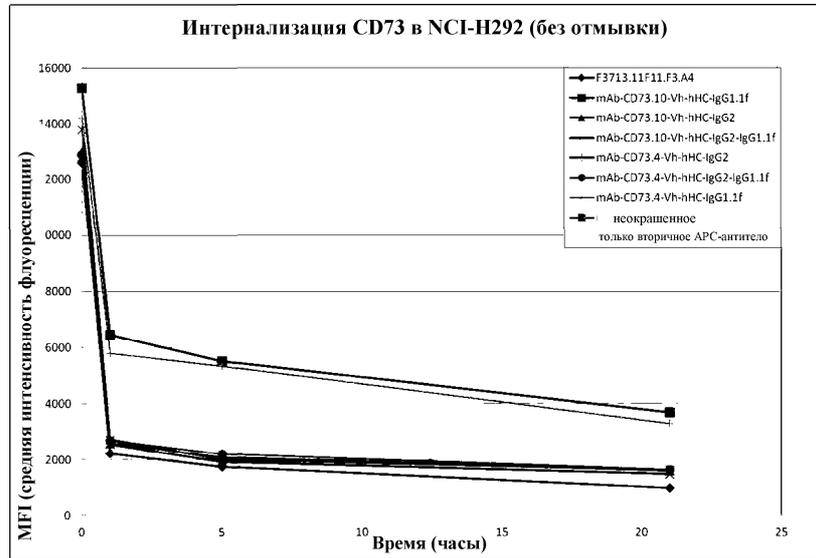


Антитела в концентрации 2 мкг/мл

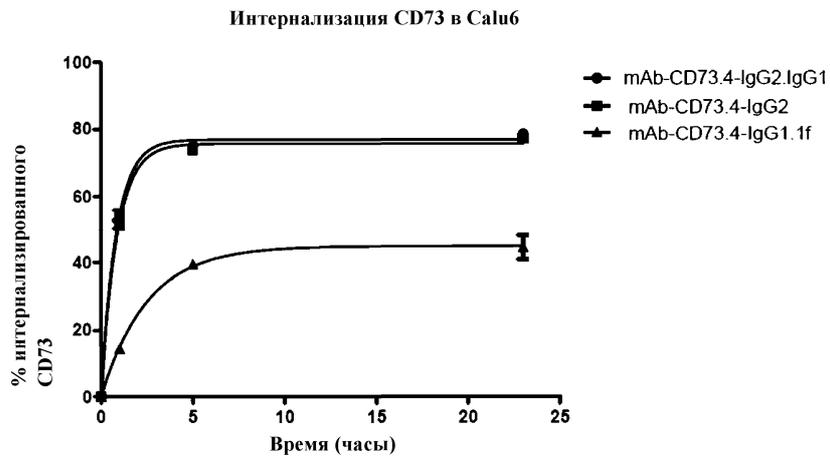
Фиг. 1D



Фиг. 1E

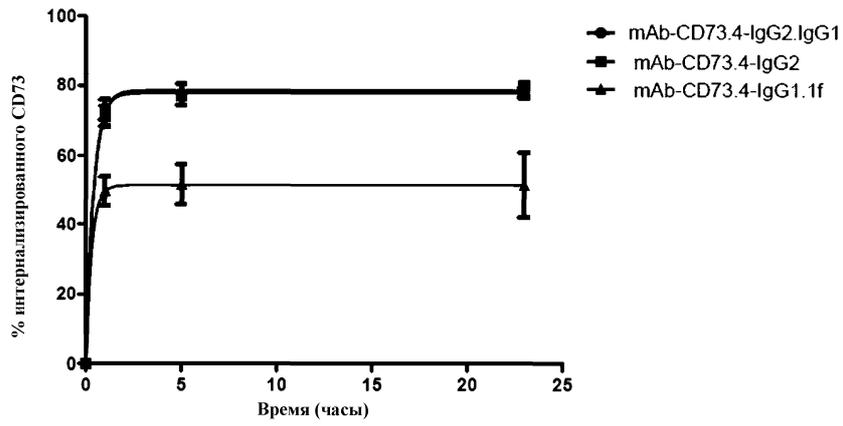


Фиг. 1F



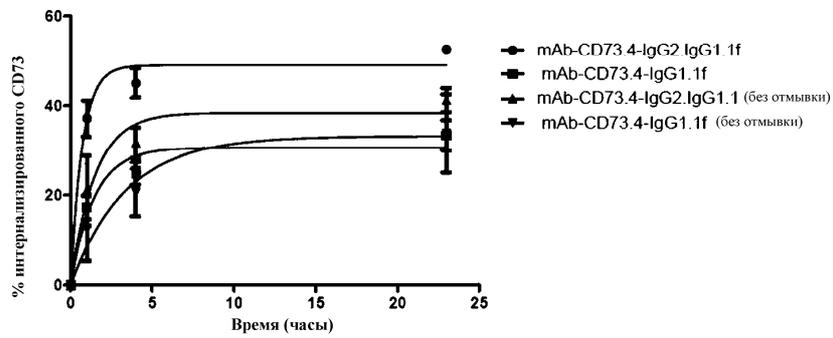
Фиг. 1G

Интернализация CD73 в NCI-H292



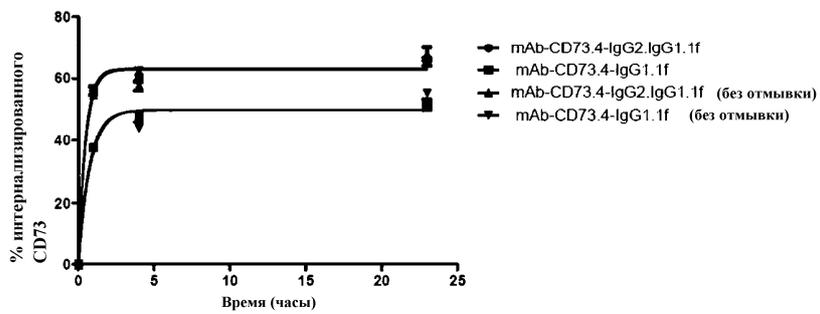
Фиг. 1H

Интернализация в SNU-C1

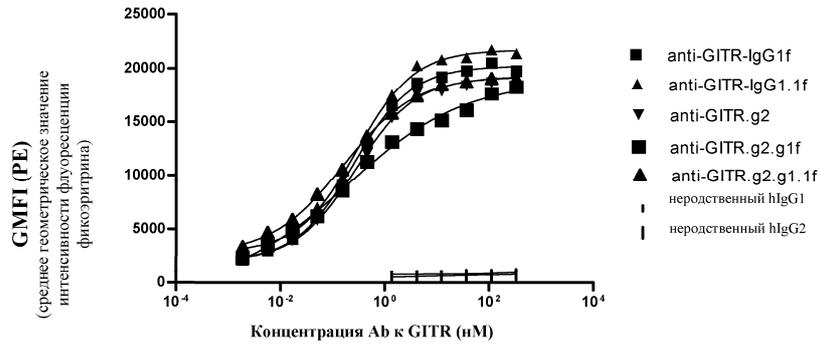


Фиг. 1I

Интернализация в NCI-H1437



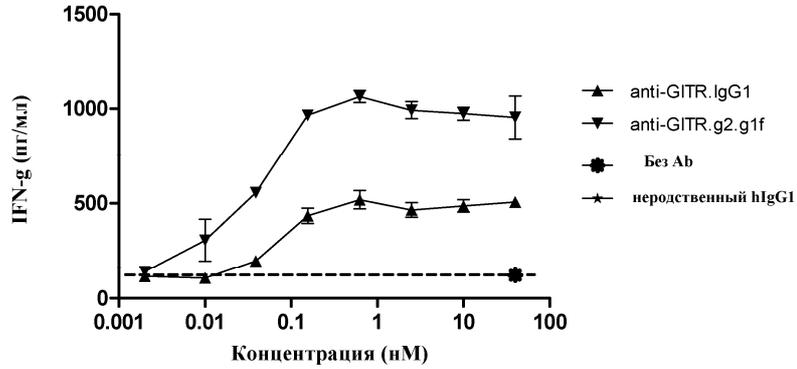
Фиг. 1J



	EC50
anti-GITR-IgG1f	0.2566
anti-GITR-IgG1.1f	0.2865
anti-GITR.g2	0.2773
anti-GITR.g2.g1f	0.2034
anti-GITR.g2.g1.1f	0.1628
неродственный hlgG1	131.8
неродственный hlgG2	6.725

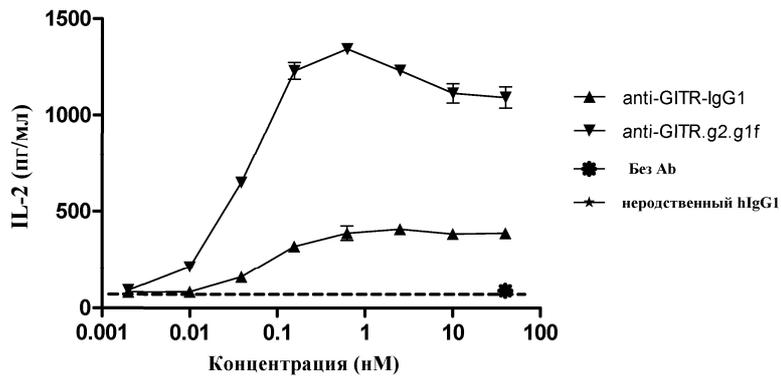
Фиг. 2

Влияние Аб к GITR на секрецию IFN-g CD4 T-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3 – Донор.№2



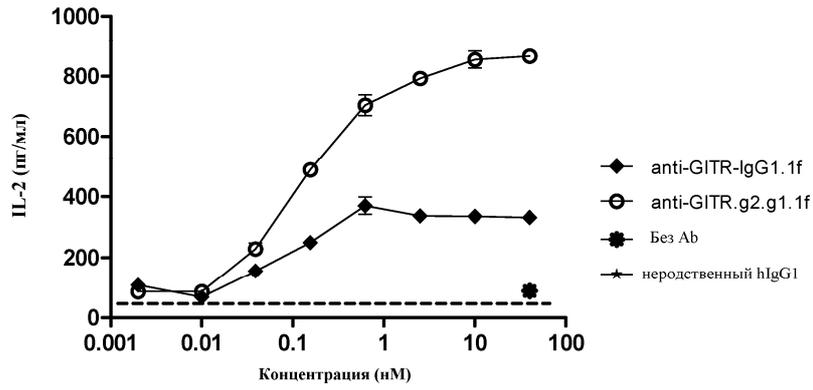
Фиг. 3А

Влияние Аб к GITR на секрецию IL-2 CD4 T-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3 – Донор.№3

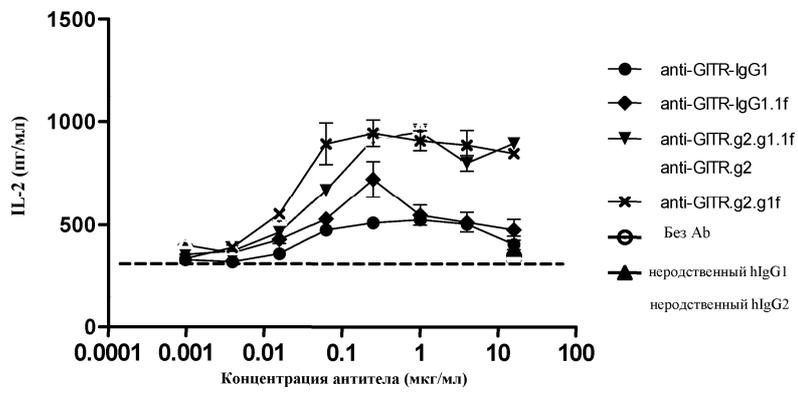


Фиг. 3В

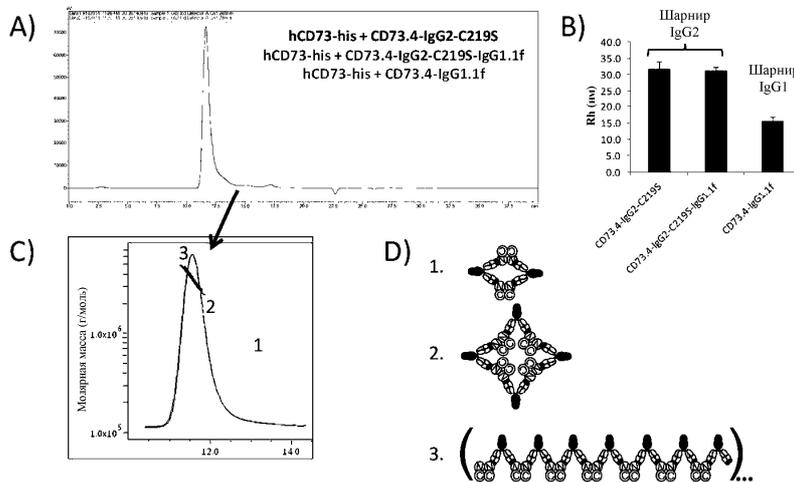
Влияние Аб к GITR на секрецию IL-2 CD4 Т-клетками, стимулируемыми СНО клетками, экспрессирующими ОКТ3 – Донор.№3



Фиг. 3С



Фиг. 4



Данные SEC-MALS для комплексов CD73/mAb

[mAb]
(мкМ)

Фиг. 5

Мишень	mAb	Молярное отношение	[Мишень] (мкМ)	[mAb] (мкМ)	UV - время элюирования (мин.)				SEC UV - интегрирование в %				MW(сДл)				
					Пик1	Пик2	Пик3	Пик4	Пик1	Пик2	Пик3	Пик4	Пик1	Пик2	Пик3	Пик4	
	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-C2195	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-C2195	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-C2195	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-гибрид	1.0 2.5	2.5	0.625	~11.8	~13.4	~17.1		42.0	21.6	36.4		1200	520	120	
	hCD73	CD73 4-гибрид	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-гибрид	1.1	2.5	2.5	~11.5	~13.4	~17.1		95.3	1.9	2.8		3300	1000	530	
	hCD73	CD73 4-гибрид	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-гибрид	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 2.5	2.5	0.625	~12.3	~13.1	~17.1		11.8	49.5	38.6		890	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-гибрид	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		
	N-hCD73	CD73 4-гибрид	0.1	0	5	~15.9	~16.9			0.4	99.6			290	140		
	N-hCD73	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-C2195	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-C2195-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-C2195	1.1	2.5	2.5	~11.8	~16.9			96.2	3.2			2000	310		
	hCD73	CD73 10-IgG2-C5-1 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-C2195-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-C2195-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 для мономера N-hCD73, мономера 11F11-Fab, димера hCD73-his и mAb (бивалентного)

Данные DLS для комплексов CD73/mAb:

Молярное отношение

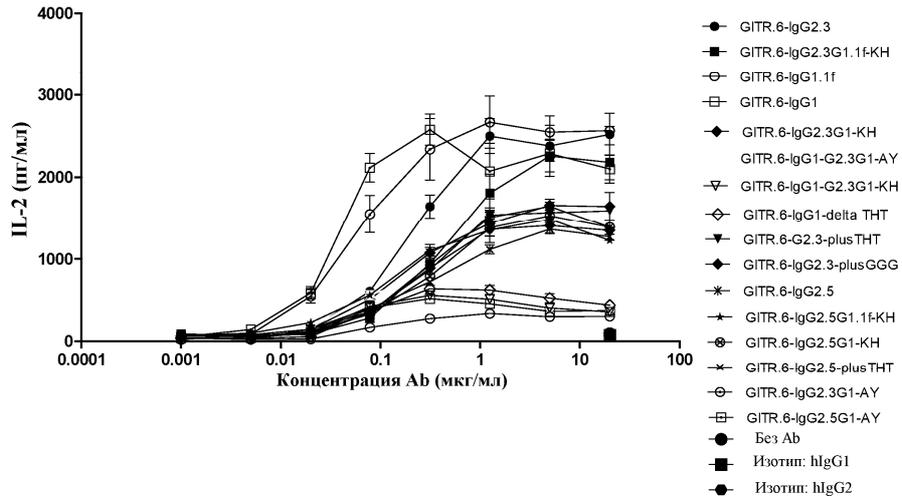
Фиг. 6

Мишень	mAb	Molar ratio	[Мишень] (мкМ)	[mAb] (мкМ)	DLS						
					Rh	Rh SD	%Pd	%Pd SD	Масса, %	SD масса, %	
	CD73 10-IgG1 1f	0.1		4	5.0	0.6	11.0	6.0	100.0	0.0	
	CD73 10-IgG2-C2195	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-C2195	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-C2195	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-гибрид	1.0 2.5	2.5	0.625	13.2	1.7	46.5	5.9	99.9	0.1
	hCD73	CD73 4-гибрид	1.0 5	2.5	1.25	17.5	1.0	31.7	8.8	62.6	25.8
	hCD73	CD73 4-гибрид	1.1	2.5	2.5	29.9	1.0	25.1	2.1	22.3	4.9
	hCD73	CD73 4-гибрид	1.2	2.5	5	14.4	0.1	31.3	5.5	68.7	25.8
	hCD73	CD73 4-гибрид	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 2.5	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-гибрид	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
	N-hCD73	CD73 4-гибрид	0.1	0	5	5.4	0.2	15.7	5.7	99.9	0.1
	N-hCD73	CD73 4-IgG1 1f	0.1	0	5	5.3	0.4	13.6	7.9	100.0	0.0
	hCD73	CD73 4-IgG2-C2195	1.1	2.5	2.5	31.7	2.4	31.6	11.4	19.3	12.2
	hCD73	CD73 4-IgG2-C2195-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-C2195	1.1	2.5	2.5	23.9	1.2	26.7	4.4	36.3	5.3
	hCD73	CD73 10-IgG2-C5-1 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-C2195-IgG1 1f	1.1	5	5	35.3	3.8	35.2	13.9	6.7	4.4
	hCD73	CD73 4-IgG2-C2195-IgG1 1f	1.1	1	1	25.5	3.2	32.9	2.9	60.7	27.5

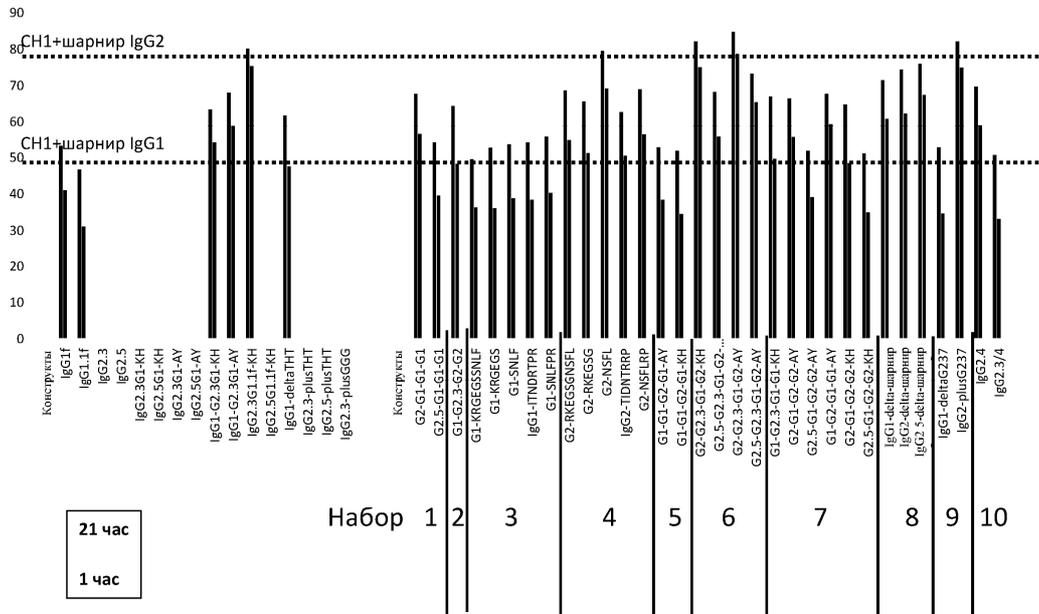
* Молярные концентрации определены для мономера N-hCD73, мономера 11F11-Fab, димера hCD73-his и mAb (бивалентного)

Фиг. 7

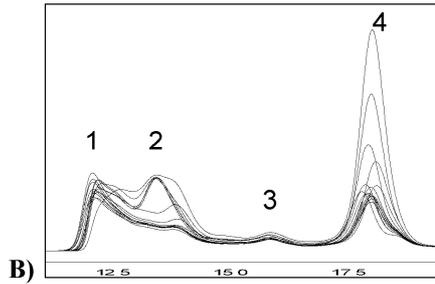
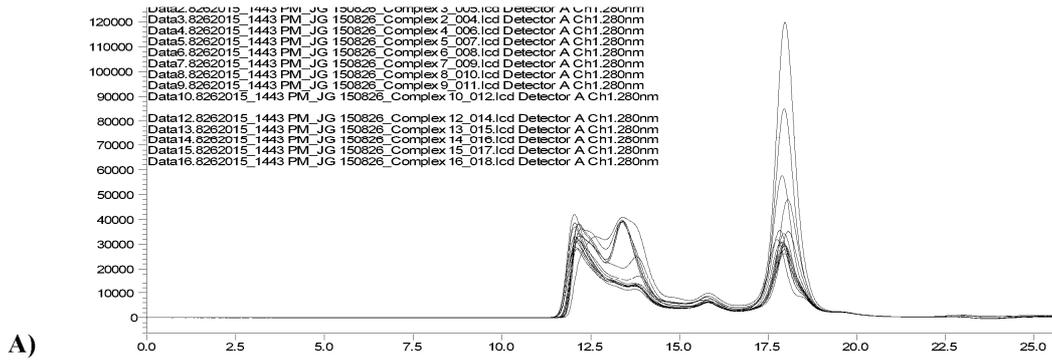
Влияние вариантов GITR.6 на секрецию IL-2 CD4+ Т-клетками в совместной культуре с СНО-ОКТ3



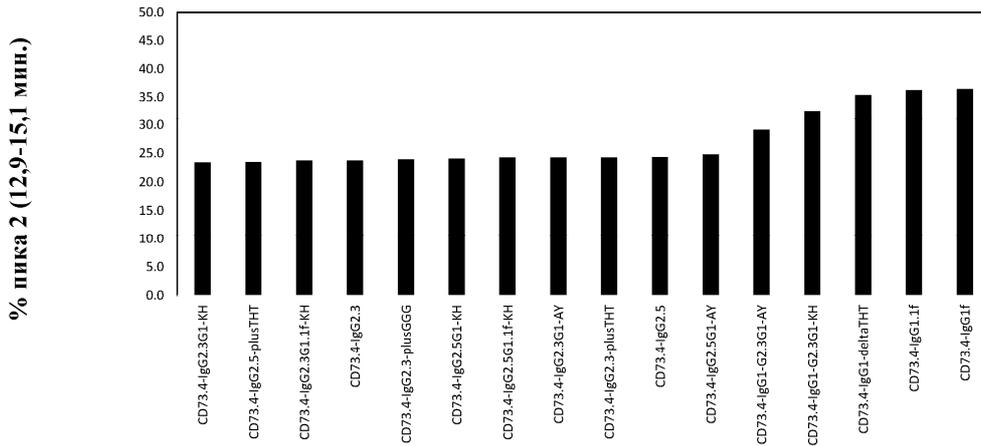
Фиг. 9



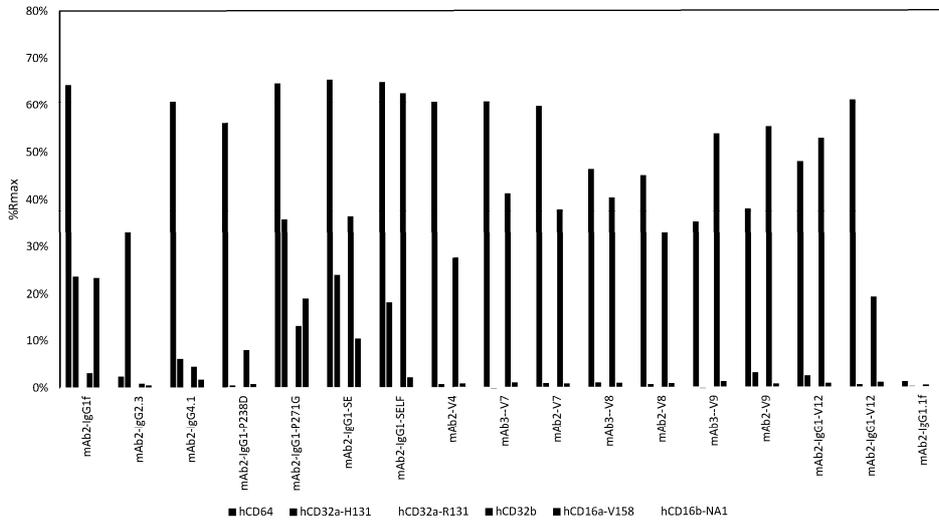
Фиг. 10



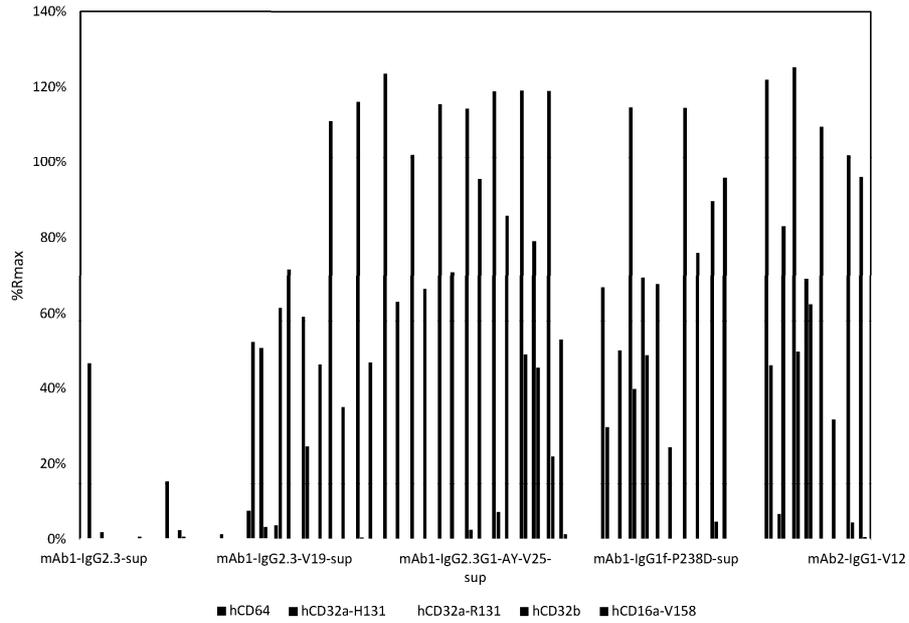
Фиг. 11



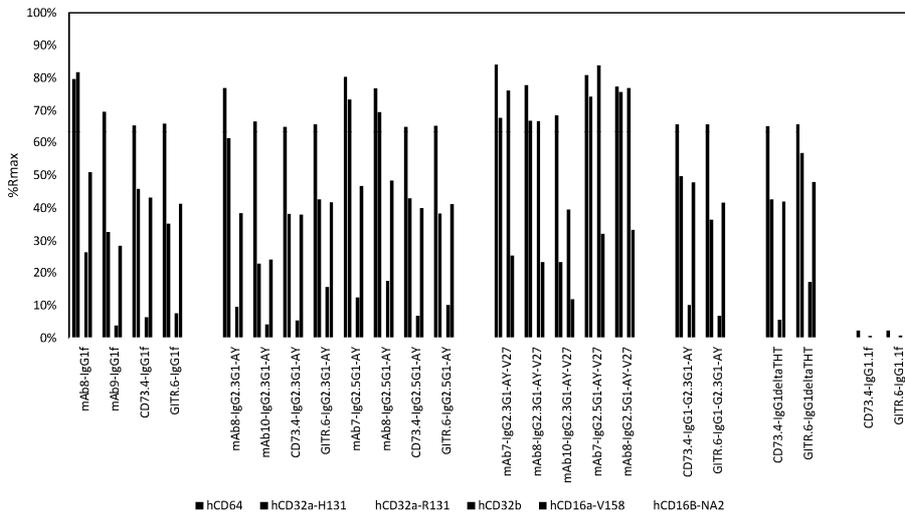
Фиг. 11C



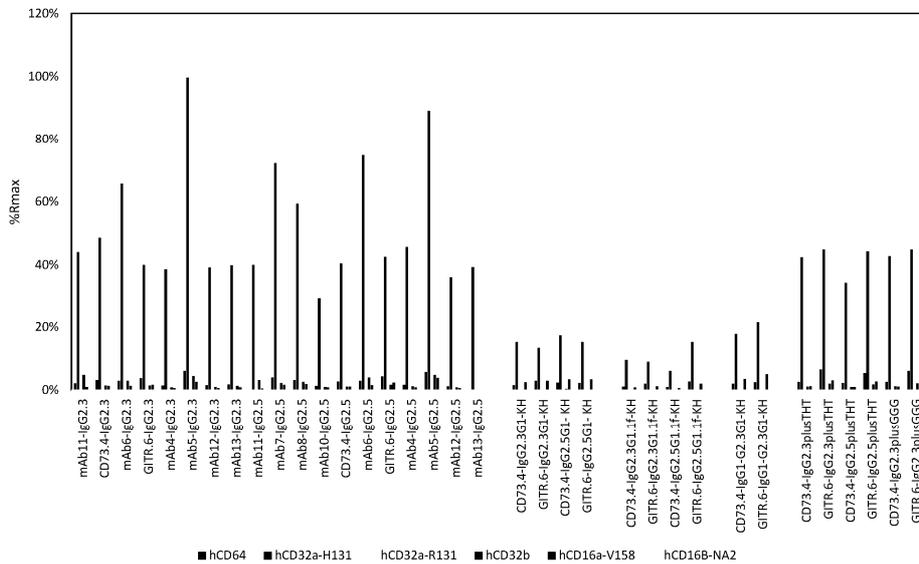
Фиг. 12



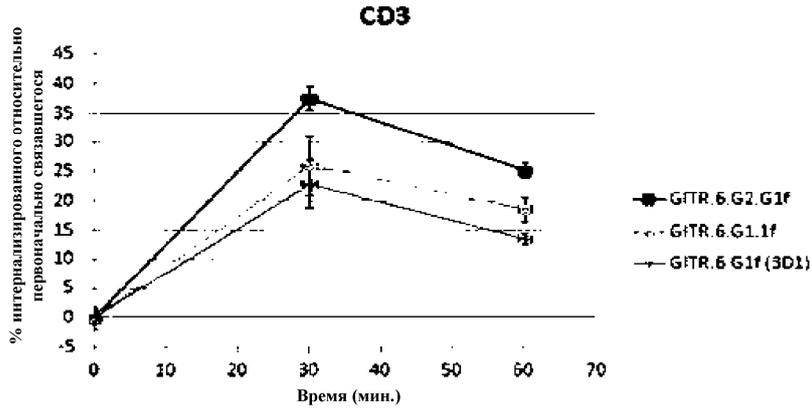
Фиг. 13



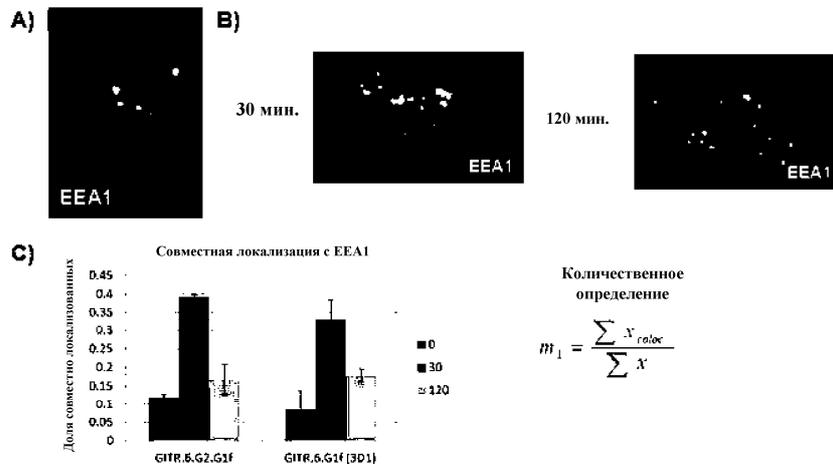
Фиг. 14A



Фиг. 14B

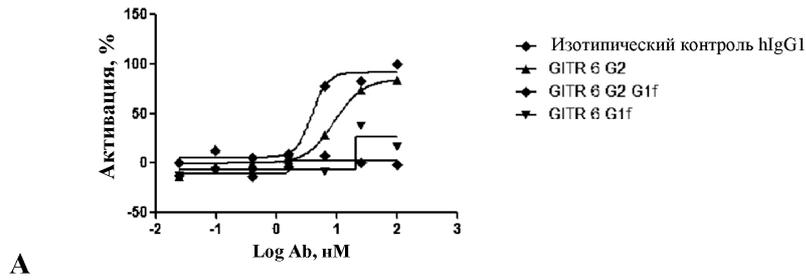


Фиг. 15

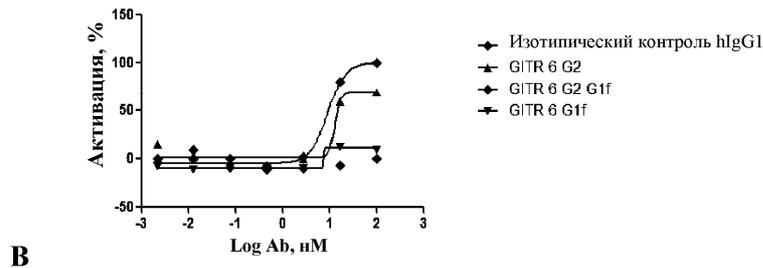


Фиг. 16

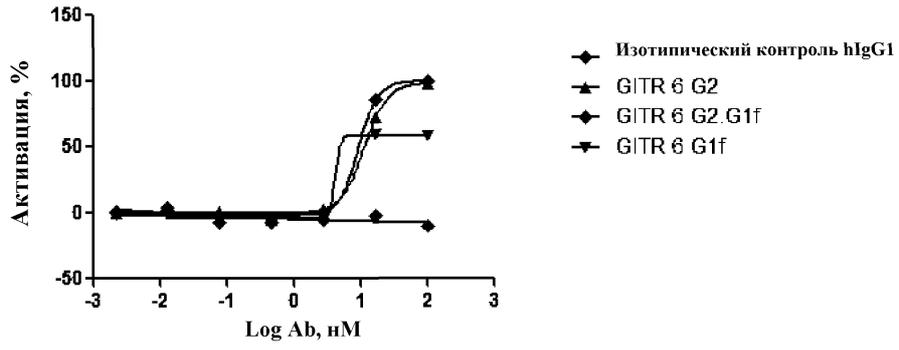
Передача сигнала с участием NFKB в активированных CD8+ клетках



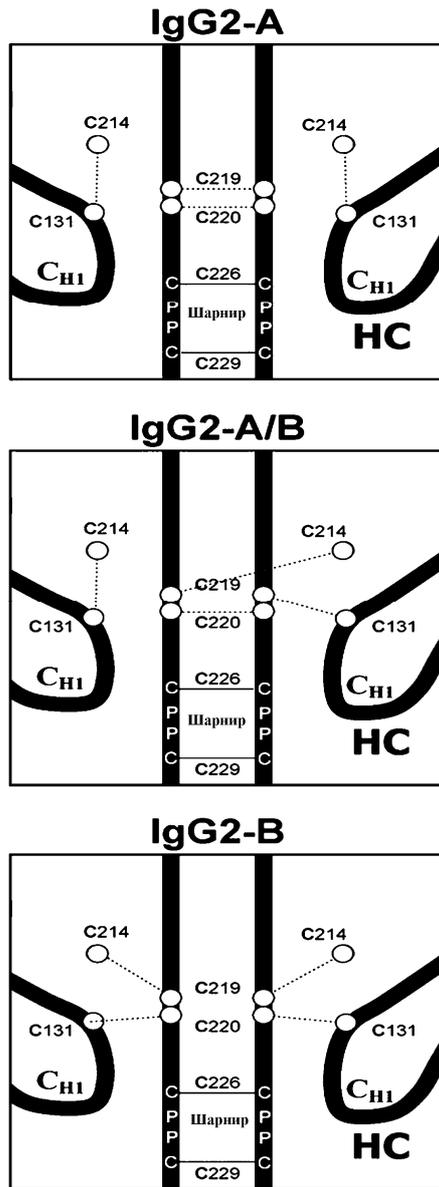
Передача сигнала с участием NFKB в активированных CD4+ клетках



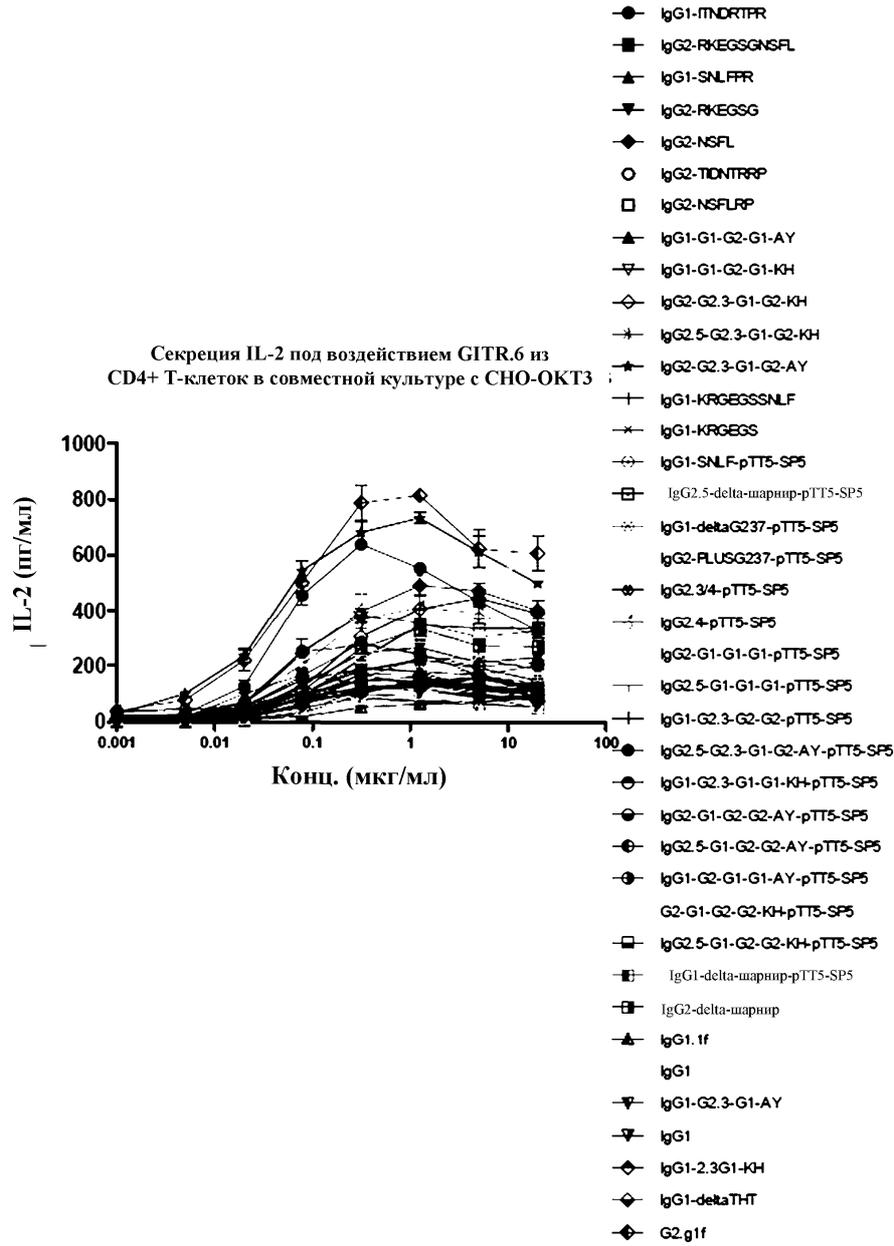
Фиг. 17



Фиг. 18

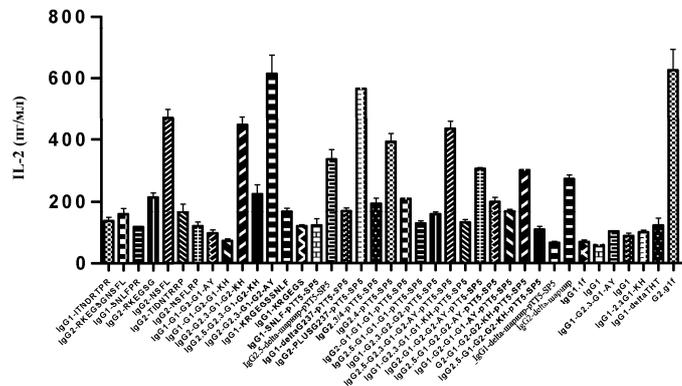


Фиг. 19



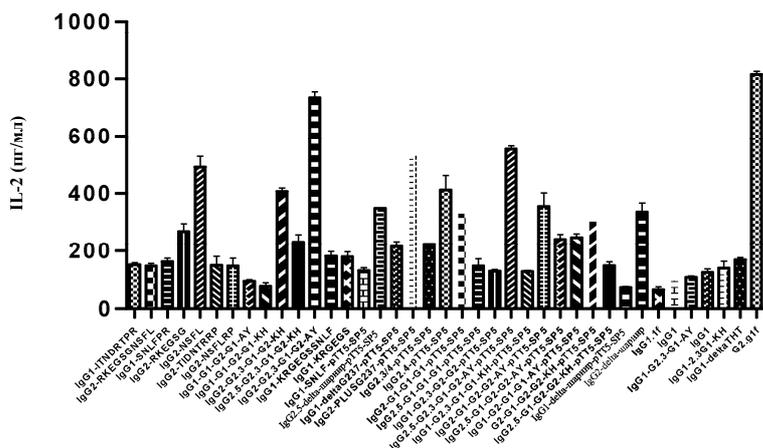
Фиг. 20А

Секреция IL-2 под воздействием варианта GITR.6 из CD4+ Т-клеток в совместной культуре с CHO-ОКТ3 (стимулируемые концентрацией 5 мкг/мл)



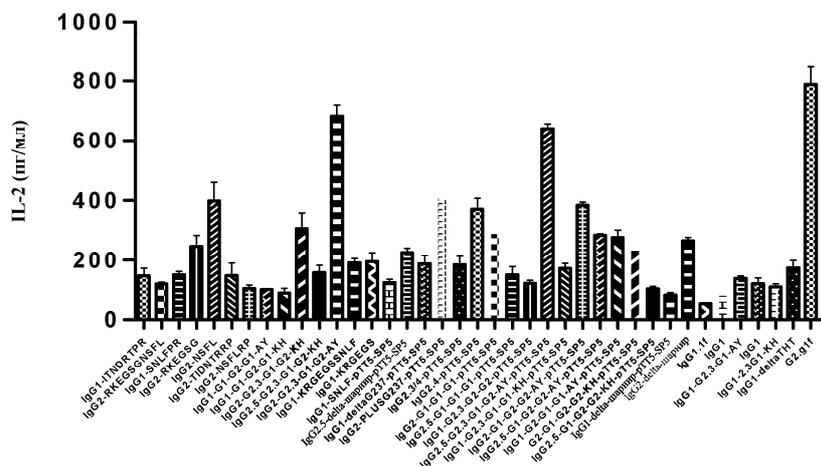
Фиг. 20В

Секреция IL-2 под воздействием варианта G1TR.6 из CD4+ Т-клеток в совместной культуре с СНО-ОКТЗ (стимулируемые концентрацией 1,25 мкг/мл)



Фиг. 20С

Секреция IL-2 под воздействием варианта G1TR.6 из CD4+ Т-клеток в совместной культуре с СНО-ОКТЗ (стимулируемые концентрацией 0,313 мкг/мл)



Фиг. 20D



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2